

**ANNA PAULA GUIMARÃES FARIA SOUZA**

**EFEITOS DA *Casearia sylvestris* Swartz(GUAÇATONGA) E DO  
LASER In Ga P NAS DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DÉRMICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VICOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2010**

**ANNA PAULA GUIMARÃES FARIA SOUZA**

**EFEITOS DA *Casearia sylvestris* Swartz(GUAÇATONGA) E DO LASER In Ga P NAS DIFERENTES FASES DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DÉRMICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA:5 de março de 2010

---

**Prof. Elirez Bezerra da Silva**  
(co-orientador)

---

**Prof. João Paulo Viana Leite**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Marlene Isabel V.Vilória**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Márcia R.A.Lamego**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Tânia Toledo de Oliveira**  
(orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sempre possibilitar as minhas conquistas estando presente em minha vida.

À minha família, pelo constante incentivo e apoio ,meu porto seguro!

Ao Luciano pelo apoio incondicional, carinho, respeito, paciência e amor a mim dedicados. Amo-te!

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Tânia Toledo de Oliveira, por acreditar na possibilidade do desenvolvimento deste projeto, pelo apoio e pelos ensinamentos durante este tempo de convivência. Adorável professora, orientadora e pessoa.

Ao Prof. José do Carmo, pelos conhecimentos e pelo exemplo de dedicação.

Ao Prof.Elirez Bezerra da Silva, pela co-orientação e, por mais uma vez, compartilhar o conhecimento e a experiência.

Aos Profs. Tânus Jorge Nagem, João Paulo V.Leite , Marlene Isabel V.Vitória e Marisa A.N.Diaz, pela colaboração.

Ao Eduardo, “Edu”, pelas informações, declarações e carinho com o qual sempre me atendeu.

Ao José Geraldo Pinto, pela disposição em ajudar na realização das minhas análises bioquímicas e hematológicas, mesmo de madrugada.

Ao Luis Eugenio e à Vanessa, pela dedicação ao meu experimento e pela competência e preocupação ao lidar com os animais.

Aos estagiários Patrícia, Vitor, Fabiana, Fernanda, pelo tempo e dedicação na realização dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório Biofármacos, pela convivência, troca de anseios, esperança.....

Ao Adão, técnico do Biotério Central da UFV, pela disponibilidade dos animais utilizados no experimento.

Ao Adão e Cláudio, pela disponibilidade em receber e preparar as minhas lâminas histológicas.

Ao Aécio, Lucinda e Luis Márcio, pelos ensinamentos no laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Veterinária.

Ao Fábio, pelas informações sobre o Programa Quantiporo.

A Janilde, Soninha, Leandro e Celina pela paciência nos momentos de aperto.

Aos meus amigos, pelo incentivo e carinho durante esta jornada.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram na elaboração e execução deste projeto.

*A coragem contém em si, o poder, o gênio e a magia.*  
**Goethe**

## CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS-----	viii
LISTA DE FIGURAS -----	ix
LISTA DE TABELAS -----	xi
RESUMO -----	xii
ABSTRACT-----	xiii
I – INTRODUÇÃO-----	1
II- OBJETIVOS -----	2
II.1 - Objetivo geral-----	2
II.2 - Objetivos específicos -----	2
III- REVISÃO DE LITERATURA -----	3
III.1- Anatomia e fisiologia da pele -----	3
III.2 – Ferida-----	5
III.3 – Cicatrização -----	7
III.3.1- Fase inflamatória -----	7
III.3.2 – Fase proliferativa -----	10
III.3.3- Angiogênese-----	11
III.3.4 – Epitelização -----	12
III.3.5 – Fase de remodelamento ou maturação-----	14
III.4 – Mediadores químicos envolvidos na cicatrização-----	15
III.4.1 Fatores de crescimento-----	15
III.4.2 – Fator de crescimento transformante (TGF) -----	15
III.4.3 – Fator de crescimento epidérmico (EGF) -----	15
III.4.4 – Fator de crescimento fibroblástico (FGFs)-----	16
III.4.5 - Interleucina I e Fator de necrose tumoral (IL-1 e TNF)-----	16
III.5 – Tipos de cicatrização-----	17
III.6- Deficiência de cicatrização -----	17
III.7 – Principais recursos para auxiliar na cicatrização -----	18
III.8 – Laser-----	19
III.9 – Guaçatonga -----	34
IV - MATERIAL E MÉTODOS -----	44
IV.1 – Animais -----	44
IV.2 – Indução de feridas -----	45

IV.3 – Tratamento -----	47
IV.3.1 – Tratamento tópico -----	47
IV.3.2 – Preparação do creme -----	47
IV.3.3 – Aplicação do creme -----	48
IV.3.4 – Aplicação do laser -----	48
IV.3.5 – Tratamento oral -----	48
IV.3.6 – Preparação da tintura -----	48
IV.3.7 – Aplicação da tintura -----	48
IV.4 – Eutanásia dos animais -----	49
IV.5 – Avaliação da cicatrização -----	49
IV.5.1 – Análise macroscópica -----	49
IV.5.2 – Análise hematológica -----	49
IV.5.3 – Análise bioquímica -----	50
IV.5.4 – Análise histológica -----	50
IV.6- Análise estatística -----	50
V -RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	51
V.1 – Avaliação clínica dos animais -----	51
V.2 – Área da ferida -----	56
V.3 – Contração da ferida -----	58
V.4 – Parâmetro hematológico de leucócitos global (WBC) -----	60
V.5 – Parâmetro hematológico de linfócitos (LYM) -----	62
V.6 – Parâmetro hematológico de granulócitos (GRAN) -----	64
V.7 – Parâmetro hematológico de eritrócitos (RBC) -----	66
V.8 – Parâmetro hematológico de plaquetas (PLT) -----	68
V.9 – Parâmetro bioquímico de glicose -----	70
V.10 – Parâmetro bioquímico de LDH -----	72
V.11 – Parâmetro bioquímico de TGO -----	74
V.12 – Hemorragia -----	76
V.13 – Edema -----	78
V.14 – Neutrófilos -----	81
V.15 – Macrófagos -----	85
V.16 – Fibroblastos -----	88
V.17 – Angiogênese -----	91
V.18 – Colágeno -----	94

VI - CONCLUSÕES -----	98
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	99

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

LLLT: Terapia laser de baixa potência ou laserterapia

LLT: Terapia laser de alta potência

TGF: Fatores de crescimento transformadores

EGF: Fator de crescimento epidérmico

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

FGFs: Fatores de crescimento dos fibroblastos

IL-1: Interleucina I

TNF: Fator de necrose tumoral

RBC: Eritrócitos

PLT: Plaquetas

WBC: Leucócitos global

GRAN: Granulócitos

LYM: Linfócitos

LDH: Desidrogenase láctica

TGO: Aspartato aminotransferase

PMNN: Células polifomonucleares (neutrófilos)

HE: Hematoxilina e Eosina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da pele -----	4
Figura 2	Neoformação capilar-----	12
Figura 3	Neoformação capilar-----	12
Figura 4	Tecido cicatricial -----	14
Figura 5	Tipos de cicatrização-----	17
Figura 6	Perfil espacial gaussiano de um feixe laser-----	20
Figura 7	Arbusto Casearia Sylvestris-----	37
Figura 8	Folhas da Casearia Sylvestris-----	37
Figura 9	Animais acondicionados no Laboratório Biofarmacos-----	44
Figura 10	Animal anestesiado após a indução de ferida-----	45
Figura 11	Excicata-----	47
Figura 12	Animal do grupo 1 após a indução da ferida-hemorragia-----	53
Figura 13	Animal do grupo 2 no tempo 12 horas-edema e hiperemia-----	53
Figura 14	Animal do grupo 5 no tempo – crosta espessa-----	53
Figura 15	Animal do grupo 3 no tempo 3 dias-crosta fina-----	53
Figura 16	Animal do grupo 10 no tempo 3 dias- presença de crosta e infiltrado inflamatório-----	54
Figura 17	Animal do grupo 6 no tempo 7 dias- crosta espessa-----	54
Figura 18	Animal do grupo 6 no tempo 15 dias- novo tecido-----	54
Figura 19/20	Animal do grupo 2 e 10 no tempo 15 dias-cicatrização completa-----	55
Figura 21/22	Animal do grupo 7 e 10 no tempo 20 dias-cicatriz-----	55
Figura 23	Gráfico- Área inicial e final da ferida-----	56
Figura 24	Gráfico: Contração-----	58
Figura 25	GráficoWBC-----	60
Figura 26	Gráfico: LYM-----	62
Figura 27	Gráfico: GRAN-----	64
Figura 28	Gráfico: RBC-----	66
Figura 29	Gráfico: PLT-----	68
Figura 30	Gráfico: Glicose-----	70
Figura 31	Gráfico: LDH-----	72
Figura 32	Gráfico: TGO-----	74
Figura 33	Gráfico: hemorragia-----	76

Figura 34/35	Animal do grupo 2 e 6 no tempo 12 horas-hemorragia-----	77
Figura 36	Gráfico: edema-----	78
Figura 37/38	Animal do grupo 2 e 8 no tempo 3 dias-edema -----	80
Figura 39	Gráfico: neutrófilos -----	81
Figura 40/41	Animal do grupo 2 e 5 no tempo 3 dias-infiltrado polimorfonuclear-----	83
Figura 42/43	Animal do grupo 2 e 7 no tempo 7 dias- infiltrado polimorfonuclear----	84
Figura 44	Gráfico: macrófagos -----	85
Figura 45/46	Animal do grupo 6 e 8 no tempo 3 dias-presença de macrófagos-----	87
Figura 47	Gráfico: fibroblastos -----	88
Figura 48/49	Animais do grupo 3 nos tempos 7 e 15 dias-tecido de granulação, fibroblastos (A), neoformação capilar(B), e colágeno(C) -----	90
Figura 50	Gráfico angiogênese-----	91
Figura 51/52	Animais do grupo 3 nos tempos 7 e 15 dias – neoformação capilar -----	93
Figura 53	Gráfico: colágeno-----	94
Figura 54/55/56	Animais do grupo 10 nos tempos 7,15 e 20 dias-colágeno-----	96
Figura 57	Animal do grupo 4 no tempo 20 dias. Epitélio pavimentoso Estratificado (A), com a camada queratinizada (B) da pele, papilas dérmicas (C) e anexos cutâneos-----	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos grupos e seus respectivos tratamentos -----	46
Tabela 2	Distribuição dos subgrupos e os respectivos animais de cada grupo - ----	46
Tabela 3	Médias e desvios-padrões da área inicial e final da ferida-----	56
Tabela 4	Médias e desvios-padrões da contração da ferida-----	58
Tabela 5	Médias e desvios-padrões de leucócitos globais (WBC) -----	60
Tabela 6	Médias e desvios-padrões de linfócitos (LYM) -----	62
Tabela 7	Médias e desvios-padrões de granulócitos (GRAN) -----	64
Tabela 8	Médias e desvios-padrões de eritrócitos (RBC) -----	66
Tabela 9	Médias e desvios-padrões de plaquetas (PLT) -----	68
Tabela 10	Médias e desvios-padrões de glicose -----	70
Tabela 11	Médias e desvios-padrões da desidrogenase láctica (LDH) -----	72
Tabela 12	Médias e desvios-padrões da aspartato aminotransferase (TGO) -----	74
Tabela 13	Médias e desvios-padrões de hemorragia -----	76
Tabela 14	Médias e desvios-padrões de edema-----	78
Tabela 15	Médias e desvios-padrões de neutrófilos-----	81
Tabela 16	Médias e desvios-padrões de macrófagos-----	85
Tabela 17	Médias e desvios-padrões de fibroblastos -----	88
Tabela 18	Médias e desvios-padrões de capilares -----	91
Tabela 19	Médias e desvios-padrões de colágeno-----	94

## RESUMO

SOUZA, Anna Paula Guimarães Faria. D.Sc. , Universidade Federal de Viçosa, março de 2010. **Efeitos da Guaçatonga e do Laser In Ga P nas diferentes fases do processo de cicatrização de feridas dérmicas.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadores: Márcia Rogéria Lamêgo e Tanus Jorge Nagem.

O processo de reparo tecidual envolve eventos celulares, tissulares e bioquímicos afim de restaurar a continuidade do tecido. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da Guaçatonga e do laser In Ga P nas diferentes fases do processo de cicatrização de feridas. Foram utilizadas 150 ratas Wistar com 60 dias de idade pesando, em média, 200g e medindo 15 cm da orelha ao início da cauda. Os animais foram anestesiados por Xilazina (2%) 10mg/Kg associada a Quetamina (10%) 100mg/Kg via intramuscular no membro inferior. Procedeu-se à exereses com lâmina de bisturi 21 e pinça criando uma ferida cirúrgica de 2cm<sup>2</sup> no dorso do animal. Os animais foram divididos em 10 grupos de 15 animais de acordo com o tratamento e foram realizadas 5 eutanásias: 12h, 3dias, 7dias, 15dias e 20dias após a indução cirúrgica. Foi coletado material para as análises: clínica, hematológica, bioquímica e histológica. Para determinar as médias e desvios-padrões, foi utilizada análise estatística descritiva e para verificar se houve diferença entre os tratamentos aplicados nos tempos determinados, pré e pós a indução das feridas, a análise de variância. Precedendo a análise de variância, utilizou-se o teste de Levene, para verificar a homogeneidade de variância e covariância, e, para determinar as diferenças estatísticas, utilizou-se o teste *post hoc* de Tukey, a 5% de significância. Os resultados demonstraram a eficiência da Guaçatonga para contenção hemorrágica, resolução do edema, síntese e depósito de colágeno e estimulação da angiogênese, bem como a eficiência do laser In Ga P para resolução do edema, proliferação fibroblástica, síntese e depósito de colágeno e estimulação da angiogênese.

## ABSTRACT

SOUZA, Anna Paula Guimarães Faria.D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2010. **Effects of the Guaçatonga and the Laser In Ga P on the different phases of wounds healing.**Advisor: Tânia Toledo de Oliveira. Co-advisors: Márcia Rogéria Lamêgo e Tanus Jorge Nagem.

The aim of this study was to evaluate the effects of Guaçatonga and the laser In Ga P on the different phases of the process of wounds healing. Sixty female mice of the race Wistar with the age of 60 days and weighing an average of 200g and measuring 15cm from the ear to the beginning of the tail were used. The animals were anesthetized with Xilazin (2%) 10mg/Kg associated to Quetamin (10%) 100mg/Kg via intramuscular in the lower limb. The exeresis took place using scalpel blade 21 and caliper producing a surgical wound of 2cm<sup>2</sup> on the back of the animal. The animals were divided into 10 groups of 15 animals according to the treatment and 5 euthanasia were carried out; 12h, 3 days, 7 days, 15 days and 20 days after the surgical induction. Clinical, hematological, biochemical and histological material for the analysis were collected. The descriptive statistics was used to determine the averages and the standard deviation as well as the variance analysis in order to verify whether there was difference among the treatments that were applied in the determined time, pre and post-induction of the wounds. After the variance analysis, the Levene test was used to verify the variance and co-variance homogeneity and to determine the statistical differences the Tukey *post hoc* test was used, showing the significance level of 0.05. The results have shown the efficiency of the Guaçatonga for hemorrhage contention, edema resolution, and collagen synthesis and deposit as well as angiogenesis stimulation. It has also shown the laser In Ga P efficiency for the edema resolution, fibroblast proliferation, and collagen synthesis and deposit as well as angiogenesis stimulation.

## I – INTRODUÇÃO

A habilidade do corpo em substituir células lesionadas ou mortas e reparar tecidos após a inflamação é crítica à sobrevivência. Quando agentes lesivos danificam as células e os tecidos, o hospedeiro responde estabelecendo em movimento uma série de eventos que servem para eliminar esses agentes, conter o dano e preparar as células sobreviventes a replicação (ROBBINS, 2008).

A cicatrização de ferida é um processo biológico por meio do qual é restaurada a continuidade do tecido, morfologia e função dos órgãos destruídos, envolvendo eventos celulares, tissulares e bioquímicos (COTRAN, 1990). Está dividida em três fases: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento e maturação.

Atualmente, tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais e terapêuticos auxiliares de baixo custo e pouco invasivos para o tratamento de feridas, mesmo com todos os recentes avanços da farmacologia e da biotecnologia no desenvolvimento de novos fármacos e curativos.

Seguindo esta perspectiva e considerando os relatos científicos e de uso popular da *Casearia sylvestris* Swartz com a finalidade de cicatrização, optou-se por essa planta medicinal, conhecida popularmente como Guaçatonga, café-do-diabo, pau-de-largato, erva-de-bugre de uso tradicional, com grande ocorrência em todo o território brasileiro. Estudos farmacológicos têm comprovado as atividades cicatrizante, antiulcerogênica, antiofídica, citotóxica em células tumorais, dentre outras, apresentadas por extratos de suas folhas, raízes e cascas. (CARVALHO, 2004).

E os lasers de baixa intensidade, como o hélio-neônio, índio-gálio-fósforo, arseneto-gálio e arseneto-gálio-alumínio, utilizados pelos fisioterapeutas e dermatologistas no tratamento de feridas, já que apresentam efeito fotobiológico que promove o processo de cicatrização (ERDLEY BJ, 2008).

O presente estudo avaliou os efeitos cicatrizantes da espécie vegetal (*Casearia sylvestris* Swartz), uso tópico e oral em 3 doses distintas e do laser índio-gálio-fósforo (670nm), como terapêutica isolada e associada nas diferentes fases do processo de cicatrização de feridas, induzidas cirurgicamente em ratas fêmeas (*Rattus navegicus albinos*, Rodentia mammalia), da linhagem Wistar.

## **II – OBJETIVOS**

### **II.1- OBJETIVO GERAL**

O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos cicatrizantes da espécie vegetal (*Casearia sylvestris* Swartz) uso tópico e oral em 3 doses distintas e do laser In Ga P, como terapêutica isolada e associada nas diferentes fases do processo de cicatrização de feridas, induzidas cirurgicamente em ratas fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), da linhagem Wistar.

### **II.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

-Avaliar a ação cicatrizante da Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz), uso tópico nas doses 5,10 e 20% nas diferentes fases do processo de cicatrização em modelos animais.

-Avaliar a ação cicatrizante da Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz), uso oral nas doses 0, 20 e 30% nas diferentes fases do processo de cicatrização em modelos animais.

-Avaliar a ação cicatrizante do laser In Ga P na dose de 4j/cm<sup>2</sup> nas diferentes fases do processo de cicatrização, em modelos animais.

-Avaliar a ação cicatrizante da Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz), associada ao uso do laser In Ga P, nas diferentes fases do processo de cicatrização em modelos animais.

### III - REVISÃO DE LITERATURA

#### III.1 – ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE

A pele, também conhecida como o sistema tegumentar, é o maior órgão de absorção do corpo, correspondendo a, aproximadamente, 16% do peso corporal e a uma área total de 2m<sup>2</sup>; sua espessura, elasticidade e distensibilidade variam de acordo com vários fatores, como: a idade, grau de nutrição e hidratação, riscos externos a que está exposta, dentre outros. Desempenha múltiplas funções, tais como: proteção do organismo contra perda de água e lesões ocasionadas pelo atrito, função homeostática, constituindo importante barreira física contra a invasão do nosso organismo por patógenos, funcionando como barreira imunológica (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

Apresenta três camadas distintas: epiderme, derme e tecido conjuntivo subcutâneo, que se encontram firmemente unidas entre si. A epiderme, camada mais externa da pele, tem uma espessura que varia de 0,04mm nas pálpebras a 1,6 mm nas regiões palmares e plantares. É avascular, estratificada, constituída basicamente de 80% de células denominadas queratinócitos e composta de 5 subcamadas a saber: o estrato córneo, mais externa, o estrato lúcido, o estrato granuloso, o estrato espinhoso e o estrato basal, que é a mais interna e liga a epiderme à derme. Nas camadas inferiores da epiderme, estão os melanócitos, células que produzem melaninas, pigmento que determina a coloração da pele (ROBBINS, 2008).

A derme é a camada mais profunda e espessa da pele; é composta de fibroblastos, fibras elásticas e de colágeno, os quais totalizam cerca de 95% deste tecido. Esta camada contém vasos sanguíneos, folículos pilosos, vasos linfáticos, terminações nervosas, órgãos sensoriais, glândulas sebáceas e sudoríparas, e está dividida em duas subcamadas: a papilar e a reticular (ROBBINS, 2008).

A derme está sobre a hipoderme ou tecido subcutâneo, que é um tecido conjuntivo frouxo constituído de tecido adiposo, unindo os tecidos vizinhos à subcamada reticular da derme (ROBBINS & COTRAN, 2005).

O tecido subcutâneo contribui para impedir a perda de calor e constitui reserva de material nutritivo, além de conferir proteção contra traumas mecânicos; subjacente à pele encontram-se outras estruturas, como fáscia muscular, músculos, articulações, cartilagens, tendões e ossos.

Os receptores nervosos presentes na pele são responsáveis por sua sensibilidade, recebendo informações do meio ambiente que são enviadas para o sistema nervoso

central, e colaboram na termorregulação tornando-a um órgão sensorial extremamente sofisticado e especializado, são eles; corpúsculo de Meissner (responsável pelo tato), corpúsculo de Ruffini (responsável pela sensação de calor), corpúsculo de Krauser (responsável pela sensação de frio), corpúsculo de Pacini (responsável pela pressão), discos de Merkel (tato e pressão), e as terminações livres (responsáveis pela sensação dolorosa) (ROBBINS, 2008).

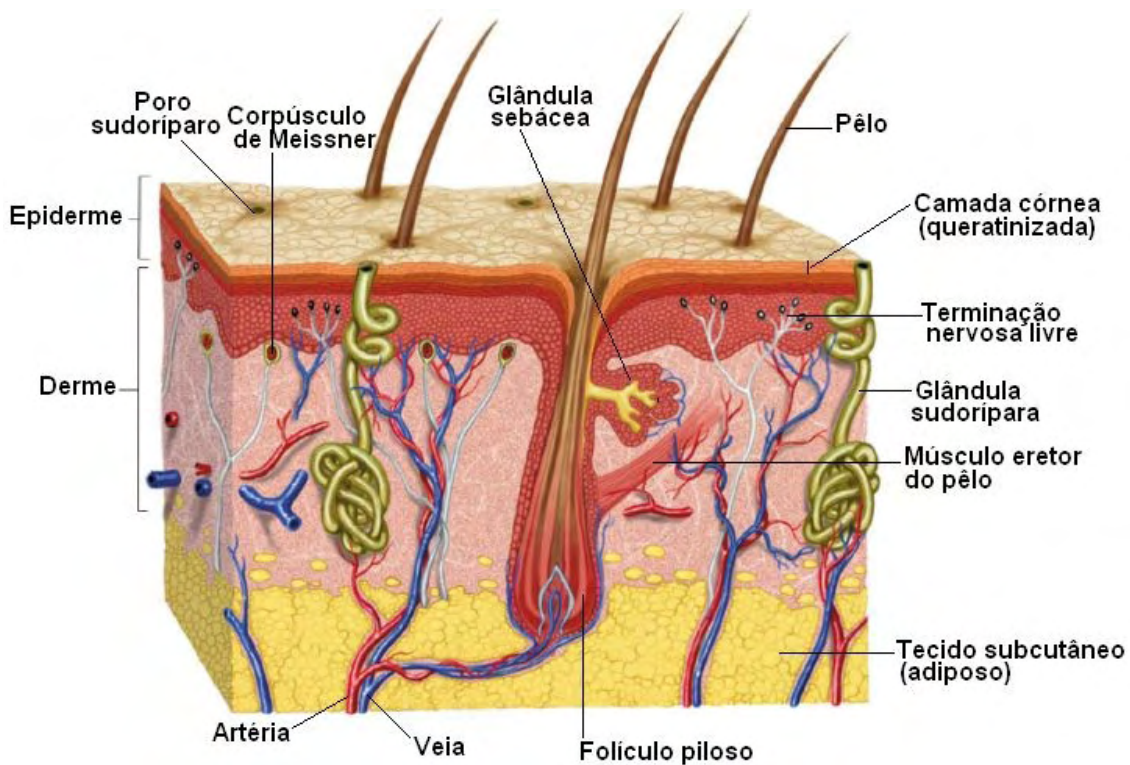


Figura 1-Estrutura da pele (ROBBINS & COTRAN, 2005).

Cada 1 cm<sup>2</sup> de pele contém 6 milhões de células, 2 mil melanócitos, 5 folículos pilosos, 5 m de nervos, 2 pontos termossensíveis, 15 glândulas sebáceas, 12 pontos criossensíveis, 200 pontos algeosensíveis, 1 m de vasos sanguíneos, 100 glândulas sudoríparas (ROBBINS & COTRAN, 2005).

Contudo, a morfologia da pele contribui para a restauração de sua estrutura comprometida, como no caso de feridas em que suas estruturas desempenham papel fisiológico no processo de cicatrização. Para isto, é necessária a instalação de um processo inflamatório imediatamente após a lesão, acarretando uma cascata de processos biológicos com a função de proteção e restauração do tecido (KIERSZENBAUM, 2004).

Se uma porção da epiderme sofre lesão ou é destruída, as células basais ao redor migram e proliferam para revestir a área exposta. Este processo de reparo ocorre sob a influência da membrana basal, da matriz extracelular do tecido conjuntivo da derme e de uma variedade de hormônios e fatores de crescimento (KIERSZENBAUM, 2004).

### **III.2- FERIDA**

O termo ferida é utilizado como sinônimo de lesão tecidual, deformidade ou solução de continuidade, que pode atingir desde a epiderme até estruturas profundas, como fâscias, músculos, aponeuroses, articulações, cartilagens, tendões e qualquer outra estrutura do corpo. Desenvolve-se como consequência de uma agressão ao tecido vivo por agentes físicos, químicos, térmicos ou biológicos, podendo também ocorrer por distúrbios químicos ou fisiológicos (ROBBINS & COTRAN, 2005).

As feridas podem ser causadas por fatores extrínsecos, como a incisão cirúrgica e lesões acidentais cortes ou traumas, ou por fatores intrínsecos, como feridas produzidas por infecção, úlceras crônicas e vasculares, defeitos metabólicos ou neoplasias (MANDELBAUM, 2003).

As feridas podem ser classificadas quanto à espessura, etiologia, evolução, presença de infecção, comprometimento tecidual.

A classificação quanto a espessura; ferida superficial é aquela que atinge apenas a epiderme e a derme, ferida profunda superficial é aquela que destrói a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo, e a ferida profunda total aquela que atinge o tecido muscular e as estruturas adjacentes como o músculo, tendões, cartilagens e outras estruturas (ROBBINS, 2008).

A classificação quanto à etiologia: acidental ou traumática, quando ocorre de maneira imprevista, sendo provocada por objetos cortantes, perfurantes, mordeduras, queimaduras; intencional ou cirúrgica, quando é realizada de acordo com um fim terapêutico proposto; patológicas são secundárias a uma doença de base; Iatrogênicas são feridas resultantes de procedimentos ou tratamentos; e fatores causais externos são feridas resultantes de pressão contínua exercida pelo peso do corpo, fricção, cisalhamento e umidade (ROBBINS, 2008).

A classificação quanto à presença de infecção: feridas limpas ou assépticas são feridas não infectadas, livres de micro-organismos patogênicos; feridas limpas contaminadas ocorrem em tecido de baixa colonização sem contaminação prévia ou durante o ato cirúrgico; feridas contaminadas são feridas acidentais, recentes e abertas,

colonizadas por flora bacteriana considerável; feridas infectadas ou sépticas apresentam evidências de processo infeccioso, como tecido desvitalizado, exsudação purulenta e odor característico (ROBBINS & COTRAN, 2005).

A classificação quanto ao comprometimento tecidual é subdividida em estádios, a saber: estágio I, pele íntegra com sinais de hiperemia, descoloração ou endurecimento; estágio II, perda parcial de tecido envolvendo a epiderme ou derme, ulceração superficial com presença de bolhas ou cratera rasa; estágio III, perda total do tecido cutâneo, necrose do tecido subcutâneo até a fascia muscular; estágio IV, grande destruição tecidual, com necrose atingindo músculos, tendões e ossos (MANDELBAUM, 2003).

As feridas apresentam características clínicas importantes, já que estão diretamente relacionadas com a resolução da cicatrização: o exsudato, o tecido necrótico, a crosta, o tecido fibroso, o tecido de granulação e a epitelização.

O exsudato possui características que são indicadores para o monitoramento da ferida, segundo STASHAK (1991) os fluidos serosos e sanguinolentos são considerados normais nas primeiras 42 a 72 horas. O exsudato purulento é indicativo de um processo infeccioso.

As células do exsudato inflamatório são fonte importante de mediadores que amplificam e matam os fenômenos vasculares e exsudativos e que iniciam os fenômenos reparativos e produtivos (BOGLIOLO, 2004).

O tecido necrótico varia de coloração desde a cor preta até a esverdeada, corresponde ao tecido morto, desidratado, podendo estar presentes o pus e o material fibriloso, que favorecem a multiplicação de micro-organismo que desencadeia a liberação de enzimas que interferem no processo de cicatrização (GOMES, 2005). A crosta que envolve a ferida é constituída de material proteico do tecido desvitalizado composto por colágeno, fibrina, elastina e restos celulares, de cor preta e marrom podendo estar relacionada com o término do estágio inflamatório no processo de cicatrização (DEALEY, 2001).

NOVATO (2000) relatou que, antigamente, a crosta era considerada como uma cobertura natural para proteger as feridas de bactérias e auxiliar na regeneração epitelial; entretanto, nota-se que feridas sem crosta cicatrizam mais rapidamente, além de que fluidos podem-se juntar embaixo da crosta e favorecer a infecção, evitando a contração da ferida.

O tecido fibroso apresenta cor amarelada de consistência cremosa decorrente da quantidade de degradação celular. A fibrina pode recobrir toda a extensão da ferida ou parte dela (STASHAK,1991).

A retirada do exsudato, do tecido necrótico, da crosta e do tecido fibroso através do debridamento faz-se necessária para que ocorra o processo de cicatrização, enquanto a presença do tecido de granulação e a epitelização são necessárias para a cicatrização da ferida.

STASHAK (1991) descreve que o tecido de granulação apresenta aspecto vermelho, brilhante e úmido, enquanto o tecido doente mostra aspecto pálido – escuro, o topo dos arcos capilares faz com que a superfície tenha aparência granular, daí o seu nome. À medida que o epitélio, nas margens da ferida começa a dividir-se rapidamente e espalhar-se pela superfície da ferida, a margem fica plana e o tecido epitelial formado caracteriza-se pela coloração branco-rosada caracterizando a epitelização.

### **III.3- CICATRIZAÇÃO**

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra o reparo do tecido. Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportem de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (ROBBINS & COTRAN, 2005).

O reparo do tecido danificado pode ser dividido em dois processos: regeneração e cicatrização. A regeneração resulta na restituição dos tecidos perdidos enquanto a cicatrização, além de restaurar as estruturas originais pode envolver a deposição de colágeno e a formação de cicatriz (ROBBINS & COTRAN, 2005).

SCOTT (1995) descreve que a cicatrização divide-se em três séries de eventos que podem sobrepor-se à inflamação (eventos vasculares e celulares), proliferação (neovascularização, contração e epitelização) e remodelação.

#### **III.3.1 - FASE INFLAMATÓRIA**

O processo de cicatrização tem início no momento da lesão, com a resposta inflamatória que é inespecífica e pode ser induzida por qualquer tipo de trauma, exceto aqueles que sejam imediatamente mortais, esta fase é de curta duração estendendo-se por até seis dias (STASHAK,1991).

Estão envolvidas respostas vasculares, tais como: vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, igualmente respostas celulares, com predomínio de neutrófilos e macrófagos, destinados a proteger o organismo contra excessiva perda de sangue e invasão de agentes estranhos (PROBST, 1993). Após a lesão tissular e ruptura de vasos sanguíneos e linfáticos, ocorrem eventos que procuram conter a hemorragia: ativação da cascata de coagulação, vasoconstrição e agregação plaquetária para formar um trombo e uma cadeia fibrilar produzida pelos enlaces cruzados de fibrina, formando uma matriz provisória que irá facilitar o movimento das células envolvidas no processo inflamatório até o local da lesão, direcionadas por inúmeras substâncias quimiotáticas resultantes da degradação de proteínas autólogas ou de agentes estranhos (DAVIDSON, 1992).

A referida matriz é estabilizada pela formação de enlaces cruzados covalentes, catalisados pelo fator XIIIa. Alguns dos constituintes desta matriz provisória incluem as proteínas de adesão, fibronectina, inicialmente derivada do plasma, e trombospondina, derivada dos grânulos  $\alpha$  das plaquetas. Estas moléculas de adesão ligam-se à fibrina, criando o substrato para movimentação celular (DAVIDSON, 1992).

As mudanças vasculares ocorrem precocemente após a agressão e são desenvolvidas com velocidades variáveis. Inicialmente, ocorre a vasoconstrição transitória das arteríolas tendendo a controlar a hemorragia, esta resposta prolonga-se por até 10 minutos após a lesão, sendo seguida por uma vasodilatação envolvendo todos os elementos vasculares iniciados pelas arteríolas e depois a abertura de novos leitos microvasculares, aumentando o fluxo vascular. O incremento do volume sanguíneo aumenta a pressão hidrostática local o suficiente para produzir a transudação de líquido pobre em proteínas. Esta resposta é provocada pela histamina e pela maioria dos mediadores inflamatórios. Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas, como o TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador), PDGF (fator de crescimento derivados de plaquetas), tromboxanos e PAF difundem-se pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta a migração das células (tanto da circulação como das regiões adjacentes) envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (COTRAN, 1990).

Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos. Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de micro-organismos e

promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados, ao final de um dia após a lesão estes constituirão 50% das células migradas para o local( ENGELHARD, 1998).

A principal função dos neutrófilos é a fagocitose de agentes invasores, assim como de material estranho no local da lesão, embora sejam as primeiras células a aparecerem no local da ferida, os neutrófilos não são essenciais para a reparação da ferida, pois, se foram deficientes ou não existir infecção, suas funções podem ser supridas pelos macrófagos e o processo de cicatrização ocorreria normalmente (CHANG, 2000).

As próximas células que surgem na região são os macrófagos derivados de monócitos (segundo ao quinto dia) que , ao contrário do papel desempenhado pelos neutrófilos, é o elemento mais crítico na indução do processo de reparo. Além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de micro-organismos pela fagocitose , após fagocitá-los e processá-los nos fagossomas , apresenta seus peptídeos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) as células T auxiliares.Desta forma, a fagocitose destas células constitui elo entre o sistema imune inato e o adaptativo .Os macrófagos são mais eficientes na eliminação de fragmentos teciduais, removendo pela fagocitose os neutrófilos que perderam a função(NEWMAN, 1992).

Ainda por influência de ligantes, os seus receptores de membrana, os macrófagos produzem e exportam mediadores lipídicos (eicosanóides), mediadores peptídicos (citocinas e fatores de crescimento), outras proteínas (tais como frações do complemento e fatores de coagulação) e enzimas relacionadas com o reparo (tais como colagenase, matriz de metaloproteases), importantes para o recrutamento e ativação de fibroblastos e outras células inflamatórias. Além da ativação por ligantes, os macrófagos podem ser também ativados por alterações físico-químicas do microambiente. Nas regiões distais onde os vasos se romperam, o aporte de oxigênio fica comprometido dada a formação do trombo.O influxo de neutrófilos e macrófagos ativados para esta região aumenta a demanda por oxigênio com conseqüente elevação das concentrações de ácido láctico e queda do ph.Esta combinação hipóxia , ph baixo e alta concentração de ácido láctico, ativa o macrófago para a produção de fatores de crescimento(NEWMAN, 1992).

Os linfócitos também podem ser encontrados em reações inflamatórias crônicas. Sua importância é mais relevante em processos inflamatórios causados por bactérias que

quando causados por traumas. A presença destas células em reações inflamatórias pode indicar resposta imunológica a agentes estranhos (PROBST, 1993).

### **III.3.2 – FASE PROLIFERATIVA**

A fase proliferativa é a segunda etapa do processo de cicatrização, torna-se mais evidente três a cinco dias após a lesão tissular. É caracterizada por proliferação de fibroblastos, neoformação vascular e epitelização da ferida, dando origem a um tecido especializado, chamado de tecido de granulação, devido seu aspecto róseo, granular e frouxo (PROBST, 1993).

#### ***Proliferação fibroblástica***

Com a presença local de macrófagos derivados de monócitos e a produção e liberação de mediadores químicos produzidos por eles, intensificam a migração e ativação de fibroblastos. Os fibroblastos formam o elemento celular mais importante pois são responsáveis pela elaboração de muitos componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno fibrilar (tipos I, III, V, VI, VII) e não fibrilar (tipos IV, VIII, XII), fibronectina, elastina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Os fibroblastos são também células efectoras, produzem mediadores solúveis, incluindo fator de crescimento dos fibroblastos básicos (bFGF), fator de crescimento de queratinócitos, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-1. Desta forma, coordenam atividades de outras células, tais como macrófagos, células do endotélio capilar e os mesmos fibroblastos. Existem evidências de que os fibroblastos como células efectoras, podem ser influenciados por outros fatores externos que contribuem para manter o balanço entre a produção e a lise do tecido (ECKES, 2000).

Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado fibroplasia e para a sua eficiência, é preciso que ocorra em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessário a neovascularização da região. Com a fibroplasia, inicia-se a formação do tecido de granulação (por volta do quarto dia), composto por macrófago, fibroblasto e vasos neoformados que são suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágenos tipo I e II (GUIDUGLI-NETO, 1992). Este tecido é edematoso e caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, em virtude da imaturidade dos vasos, os quais são extremamente exudativos e sangram com facilidade.

GOMES (2005), testando o efeito cicatrizante da Casearia em camundongos, realizou sacrifícios no 1º, 4º, 7º e 10º dia de pós-operatório. Os resultados demonstraram que nas 48 horas iniciais do tratamento as feridas apresentavam sinais característicos da resposta inflamatória aguda com a presença de células polimorfonucleares, congestão vascular e edema. Observou-se que o grupo tratado com Casearia apresentou crostas fibrinoleucocitária aderidas à pele, não exsudativas e sem evidência de tecido de granulação. Houve uma migração significativa de neutrófilos no grupo tratado com Casearia entre o 1º e 4º dia de pós-operatório, sugerindo que a pomada tenha promovido estimulação para a migração dos neutrófilos. A evolução da ferida da fase inflamatória para a fase proliferativa foi verificada nas análises do 4º dia de pós-operatório com a presença de macrófagos, fibroblastos, vasos neoformados, formação de feixes de fibras colágenas, caracterizando a fase proliferativa. No 7º dia de pós-operatório, foi constatada uma intensa proliferação fibroblástica estes estavam mais compactos e formavam um arranjo de feixes de fibras colágenas mais densas, no grupo tratado com Casearia. Verificou-se uma intensa produção de colágeno entre o 7º e o 10º dia de pós-operatório. A re-epitelização foi observada após 8º dia de pós-operatório com maior formação e organização das fibras de colágeno.

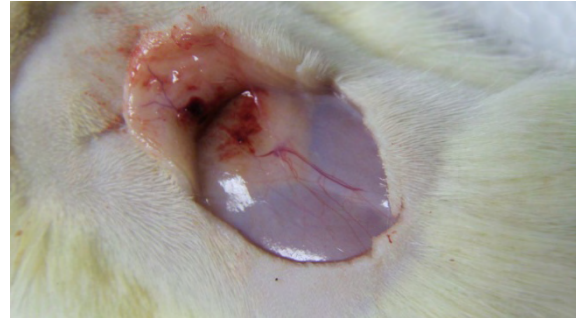
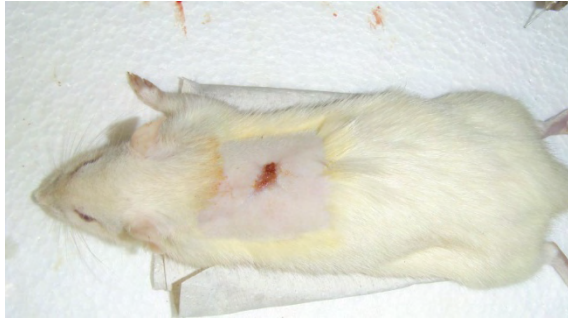
### **III.3.3 – ANGIOGÊNESE**

A angiogênese é um processo biológico complexo, caracterizado pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, essencial para a reparação das feridas, já que permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (DUDLEY, 1988).

Além da ação direta de fatores de crescimento sobre as células da vasculatura, a indução da angiogênese é, em parte, creditada à baixa tensão de oxigênio, característica que ocorre no centro da ferida (KNIGHTON, 1981).

A neoformação vascular inicia-se de dois a três dias após a lesão, com cordões sólidos de células endoteliais crescendo como brotos para formar capilares nas bordas da ferida. Sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar colagenase e ativador do plasmogênio. Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal e permite a migração das células endoteliais que, atravessando a parede do vaso e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida,

seguem em direção à região da lesão. Uma vez na região externa do vaso, elas passam pelo processo de diferenciação para a aquisição da capacidade de formação de novos tubos capilares. As células endoteliais migratórias formam no exterior do vaso um broto capilar que, em seguida, une-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (RUDOLPH & BALLANTYNE, 1990).



*Figuras 2 e 3-Animal do grupo3 no tempo 15 dias- Neoformação capilar*

### **III.3.4 – EPITELIZAÇÃO**

O processo de re-epitalização da ferida inicia-se imediatamente após a lesão pelo mecanismo de “efeitos de vizinhança livre” e pelo fator de crescimento epidérmico (EGF). Células primitivas da camada basal do tecido epidermal possuem potencial mitótico latente. Em tecidos normais, este se encontra inibido pelo contato existente pelas células pela “inibição de contato”. Com a ocorrência de uma lesão, este mecanismo inibitório desaparece e as células entram imediatamente em processo mitótico. A ineficiência e a dificuldade de constatação do processo mitótico destas células nas etapas iniciais são devidas à inexistência de um substrato adequado na região da ferida, fornecido quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme (GUIDUGLI-NETO,1992).

Quando ativadas as células epidermais retraem os tonofilamentos intracelulares, ocorre a dissolução dos desmossomos intercelulares e, na periferia do interior da célula, formam-se filamentos de actina. Tais alterações liberam-nas da membrana basal e das células epiteliais adjacentes, permitindo, assim, sua movimentação em direção ao centro da ferida. As células migram sobre a matriz celular provisória e durante sua trajetória, seguem depositando quantidades apreciáveis de fibronectina, sendo a superfície da ferida umedecida e oxigenada um fator que acelera o processo de migração (GUIDUGLI-NETO, 1992). Ao final desta etapa, o leito da ferida esta totalmente

preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática está passando por regeneração. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas, dando à região lesada a aparência de cicatriz pelo o acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO,1992).

NETO (2006) realizou um estudo para avaliar o efeito cicatrizante da Aroeira em feridas abertas na região dorsocostal em ratos, realizou eutanásias no 7º, 14º e 21º dia após a lesão, amostras foram coletadas para a análise histológica. No 7º dia de pós-operatório, a crosta fibrinoleucocitária representou a maior extensão das feridas em ambos os grupos. A proliferação vascular em ambos os grupos, durante os três dias de estudo, apresentou maiores valores no 7º dia e uma diminuição progressiva no 14º e 21º dia. Avaliações semelhantes foram citadas por outros autores, como (BRITO,1996) que observou dentro da massa de granulação vasos sanguíneos dispostos perpendicularmente ao epitélio e que, com o evoluir do processo de reparação, iam-se dispondo paralelamente e diminuía de quantidade. O exsudato inflamatório esteve intensificado no 14º dia de pós-operatório em ambos os grupos. Em relação as células polimorfonucleares, a análise demonstrou para ambos os grupos que os valores sofrem decréscimo significativo, sendo progressivamente menores nos dias 14º e 21º em comparação ao 7º dia de pós-operatório. No 14º dia de pós-operatório, o grupo tratado com extrato de aroeira apresentou as feridas completamente re-epitelizadas, e o grupo-controle não apresentava re-epitelização completa, sendo esta completa no 21º dia.

SANTOS (2004), avaliando o efeito cicatrizante de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, nas eutanásias no 7º, 14º, 21º dia de pós-operatório, constatou que a ferida cutânea em ambos os grupo houve exsudação plasmática com formação de crostas superficiais até o 7º dia. Após o 14º, dia observou-se tecido de granulação e epitelização completa no 21º dia com surgimento de novos pelos ao redor da lesão em todos os animais. A fase inflamatória apresentou exsudato, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, hemácias, leucócitos, neutrófilos, monócitos seguida da presença de macrófagos que foi identificada entre o 7º e o 14º dia de pós-operatório. Observou-se, também nesta fase, intensa proliferação endotelial, formando o tecido de granulação presente no 14º dia de pós-operatório. No 21º dia de pós-operatório, as lesões estavam totalmente epitelizadas.

### III.3.5- FASE DE REMODELAMENTO E MATURAÇÃO

Por volta do décimo dia, o leito da ferida estava totalmente preenchido pelo tecido de granulação, com uma rede capilar atravessando-o, e a rede linfática em franca regeneração. O tecido de granulação vai sendo enriquecido com mais fibras de colágeno e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I; com a evolução do processo acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparece por apoptose (CLARK, 1999).

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. Inicialmente, a deposição de colágeno é feita de maneira aleatória, orientando-se pela organização de fibronectina e dependente da natureza e pela direção das tensões aplicadas ao tecido. Subsequentemente são digeridas pela colagenase e ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz (CLARK, 1999).

A contração da ferida envolve o movimento centrípeto das bordas da ferida produzindo uma força de tensão pelas bordas geradas pelos miofibroblastos, já que estas células contêm miofilamentos no citoplasma, que são potencialmente contráteis, como também modificações na membrana que permitem interconectar e transmitir contração para outras células. É esta força que tornam alinhadas paralelamente as fibras de colágeno à superfície da pele. Apesar de ocorrer um aumento progressivo da resistência da cicatriz, ela permanece em 15 a 20% mais fraca do que o tecido vizinho (AUER, 1992).

Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente, as cicatrizes são hipovascularizadas em decorrência do desaparecimento dos neocapilares (JOHNSTON, 1990).



*Figura 4- Tecido cicatricial*

## **III.4 – MEDIADORES QUÍMICOS ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO**

### **III.4.1 – FATORES DE CRESCIMENTO**

A proliferação celular pode ser provocada por muitos mediadores químicos tais como fatores de crescimento, hormônios e citosinas. A maioria dos fatores de crescimento apresenta efeitos pleiotróficos, ou seja, além de estimularem a proliferação celular, estimulam a migração, a diferenciação e contratilidade, e intensificam a síntese de proteínas especializadas( tais como colágeno pelos fibroblastos).O fator de crescimento pode agir em um tipo específico de célula ou em múltiplos tipos celulares,sendo sua principal atividade estimular a proliferação celular e a inibição de ciclo de outras células(ROBBINS,2008).

### **III.4.2-FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTE (TGF)**

Trata-se de dois fatores distintos, denominados TGF $\alpha$  e TGF $\beta$ . O TGF $\alpha$  é produzido por diferentes células embrionárias ou da placenta,revelando grande semelhança com o fator de crescimento epidérmico (EGF), liga-se ao esmo receptor deste fator de crescimento. Além disto, estimula a proliferação de fibroblastos e células epiteliais (BRASILEIRO FILHO, 1996).

O TGF $\beta$  constitui um grupo de fatores de crescimento que atuam como potentes reguladores do crescimento e diferenciação celular para monócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e fibroblastos, para a angiogênese, a deposição de matriz extracelular e formação de tecido de granulação, ou seja, eventos importantes no processo de cicatrização tecidual.

Segundo CHANG (2000), o TGF $\beta$  estimula a produção de colágeno por aumentar nos fibroblastos a expressão de Rnam para o colágeno tipo I e III. Diferentemente do PDGF( fator de crescimento derivado de plaquetas), o TGF $\beta$  aumenta o tecido de granulação por provocar seletivamente a maturação de pacotes de colágeno.

### **III.4.3 FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO (EGF)**

O EGF é mitogênico para células epiteliais e mesenquimais, atua como fator de progressão, estimulando a divisão celular por ligar-se a um receptor específico uma glicoproteína de membrana. O EGF e o TGF $\alpha$  desempenham papel importante no

processo de cicatrização de feridas graças a sua capacidade em aumentar a migração de queratinócitos (UCHI,2000).

#### ***Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)***

O PDGF é encontrado mais abundantemente nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas, como também é sintetizado pelos macrófagos, células endoteliais e musculares. O PDGF estimula a proliferação de fibroblastos e células musculares lisas e atua como um potente quimioatraente para neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células musculares lisas, promovendo a formação de tecido de granulação durante a reparação de feridas (BRASILEIRO FILHO, 1996).

Entretanto, parece que o PDGF não estimula diretamente a síntese de colágeno pelos fibroblastos e não aumenta a deposição de glicosaminoglicanos e fibronectina, provavelmente, exerce indiretamente estes efeitos de duas formas: incrementando a celularidade da ferida e levando os macrófagos e fibroblastos a produzirem quantidades maiores de TGF $\beta$ , o que estimula a mitogênese dos fibroblastos e aumenta a síntese de colágeno (CHANG, 2000).

#### **III.4.4- FATOR DE CRESCIMENTO DO FIBROBLASTOS (FGFs)**

O FGF pertence a uma família de fatores de crescimento com mais de dez membros. O FGFs liberados associa-se ao sulfato de heparan na MEC, que pode servir de reservatório ao armazenamento de fatores inativos, apresenta grande número de funções, incluindo formação de novos vasos, reparação de ferimentos, pois participa da migração de macrófago, fibroblasto e célula endotelial em tecidos lesados e migração do epitélio para formar nova epiderme (ROBBINS & COTRAN, 2005).

#### **III.4.4- INTERLEUCINA I E FATOR DE NECROSE TUMORAL (IL-1 e TNF)**

São duas citosinas que atuam sinergicamente, como importantes mediadores da inflamação. Compartilham propriedades biológicas, particularmente provocando o mesmo espectro de efeitos na fase aguda da inflamação. Os efeitos da IL-1 e TNF sobre o endotélio são: indução da síntese de moléculas de adesão, indução da síntese e secreção de PGI $_2$ , estimulação da síntese de fator de plaquetas (PAF) e aumento das propriedades pró-coagulantes e anticoagulantes das células endoteliais (COTRAN, 1990).

## II.5 – TIPOS DE CICATRIZAÇÃO

Segundo ROBBINS (2008), baseando-se na natureza da ferida, a cicatrização das feridas cutâneas pode ocorrer por primeira ou segunda intenção.

Cicatrização por primeira intenção ocorre quando a incisão causa somente uma ruptura da continuidade da membrana basal epitelial e morte de poucas células epiteliais e tecido conjuntivo e, como resultado, a regeneração epitelial predomina sobre a fibrose formando uma pequena cicatriz, existindo uma contração mínima da cicatriz (ROBBINS, 2008).

A cicatrização por segunda intenção ocorre quando há uma perda celular ou tecidual mais extensa, a reação inflamatória é mais intensa, existe um tecido de granulação abundante e a cicatriz se contrai pela ação dos miofibroblastos, isto é seguido pelo acúmulo de MEC e pela formação de uma cicatriz grande (ROBBINS, 2008).

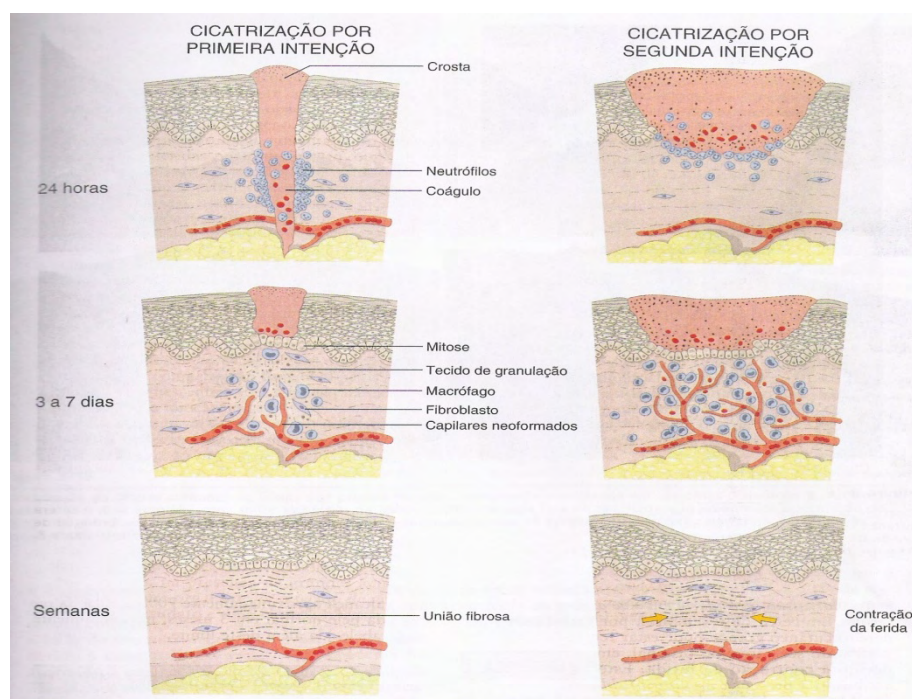


Figura 5- Tipos de cicatrização (ROBBINS, 2008).

## III.6 – DEFICIÊNCIA DE CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é influenciada por fatores locais e sistêmicos que podem reduzir retardar ou impedir o processo, dentre estes fatores podem ser citados mais comuns a

infecção e os corpos estranhos que retardam o processo cicatricial porque mantêm a reação inflamatória em atividade (MANDELBAUM, 2003).

A desnutrição decorrente principalmente da deficiência de proteínas, de vitaminas C ou de zinco, retarda a cicatrização por interferir diretamente nos processos de síntese do colágeno; o zinco é um componente importante de muitas enzimas (metaloenzimas), inclusive das que participam da síntese de DNA (ROBBINS, 2008).

A baixa perfusão tecidual decorrente de lesões vasculares ou perturbações hemodinâmicas retarda ou impede a cicatrização porque reduz o fornecimento de nutrientes e oxigênio (ROBBINS, 2008).

A diabetes acompanha-se de cicatrização deficiente em virtude das lesões vasculares (hipóxia) e das alterações nas células fagocitárias que favorecem a instalação de infecções; nos idosos, ocorre à redução na capacidade proliferativa das células (ROBBINS, 2008).

Torna-se indispensável considerar estes fatores ao avaliar e propor um tratamento para a cicatrização de feridas dérmicas.

### **III.7- PRINCIPAIS RECURSOS DISPONÍVEIS PARA AUXILIAR NA CICATRIZAÇÃO**

Existem muitas pesquisas em andamento e há perspectivas de desenvolvimento de novas tecnologias que visam não só a reduzir as complicações oriundas da ferida mas também acelerar o processo cicatricial.

No Brasil, as principais formas de tratamento estão agrupadas em recursos destinados à proteção da pele contra agressões mecânicas ou químicas e prevenção de infecções, produtos para higienização e antisepsia, produto para debridamento químico, enzimático, autolítico ou mecânico, coberturas primárias ou secundárias, produtos para fixação de coberturas e complementos e agentes tópicos (MANDELBAUM, 2003).

Um produto para ser eficaz no tratamento de feridas deve incluir as seguintes características: facilidade de remoção, conforto, não exigência de trocas frequentes, boa relação custo benefício, manterem o leito da ferida com umidade ideal e as áreas periféricas secas e protegidas, facilidade de aplicação, adaptabilidade (GEOVANINI, 2007).

### III.8 – LASER

A palavra laser em inglês é “light application by the stimulated emission of radiation” que significa amplificação de luz por emissão estimulada de radiação, sendo este o princípio básico desde a sua criação. Esta designação compreende uma vasta série de dispositivos com emissão de radiação eletromagnética, com diversas faixas espectrais desde os raios-X, passando pelo ultravioleta, visível, infravermelho e micro-ondas ( TUNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996, COLLS, 1985).

Os trabalhos iniciais da terapia laser de baixa potência ocorreram entre a década de 60 e 70 na Europa Oriental, baseados nos estudos do Prof. Endre Mester Budapeste, em que foram observados os efeitos da radiação laser de baixa potência na modulação dos processos biológicos (KITCHEN & BAZIN, 1996; BAXTER ET AL, 1991, BASFORD, 1989), sendo uma das descobertas mais significativas do século XX no campo da ciência médica. Isto envolveu novas perspectivas nas áreas de biologia e aplicação na área médica, uma vez que, em sua concepção, os lasers encontraram aplicação imediata na medicina, mas, até o momento, quase todas as aplicações tomavam por base os efeitos fototérmicos ou fotodestrutivos, sendo utilizados para cortar, coagular e destruir os tecidos, sendo esta modalidade conhecida como high reactive-level laser treatment ou LLT (terapia laser de alta potência) (KARU, 2000; KLOTH, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; OHSHIRO & FUJINO, 1993).

Todavia os lasers de baixa potência, apresentam uma variação no comprimento de onda de 530nm a 1300nm, utilizados em terapêuticas denominadas Laserterapia ou Terapia Laser de Baixa Potência (LLLT), promovem um efeito fotobiológico que acelera os eventos do processo de cicatrização tecidual.

Desde que foram considerados bioestimuladores, os lasers passaram a ser utilizados experimentalmente e clinicamente para estimular a cicatrização de feridas abertas e cirúrgicas (SEITZ & KLEINKORT, 1986; CALDEIRA, 1997; MIKAIL, 1997), na cicatrização óssea (SEITZ E KLEINKORT, 1986; MIKAIL, 1997), nos processos inflamatórios (MIKAIL, 1997) e nas compressões nervosas (SCHIMITT et. al., 1993).

Inicia-se, então, a aplicação do laser de baixa potência “low reactive-level laser” ou LLLT, nome dado por OHSHIRO & CALDERHEAD (1998), para o

tratamento em diversos tipos de lesão e modelos experimentais obtendo mais conhecimentos sobre efeitos fisiológicos, mecanismos de ação, dosimetrias.

Dependendo da absorção do tecido, este, quando submetido à radiação laser de alta potência, poderá sofrer carbonização, vaporização, coagulação, ter suas proteínas constituintes degradadas ou desnaturadas pelo efeito fototérmico, ou, ainda, por outros efeitos não dependentes de calor, mas igualmente irreversíveis, como os efeitos foto-osmóticos, foto-iônicos, fotoenzimáticos, foto-imunológicos dentre outros. (FULLER, 1983; OHSHIRO & CALDERHEAD, 1998).

Apesar da destruição celular causada pelas cirurgias em que foi utilizado laser de alta potência, os pacientes submetidos a este procedimento relatam menor desconforto pós-operatório, pouco edema e melhor cicatrização tecidual, quando comparado ao método convencional (OHSHIRO & CALDERHEAD, 1998).

Buscando elucidar os efeitos adicionais que a cirurgia laser proporcionava, OHSHIRO & CALDERHEAD (1998) propuseram que a explicação para este efeito seria a distribuição espacial de energia gaussiana (Figura 1) que a maioria dos lasers apresenta.

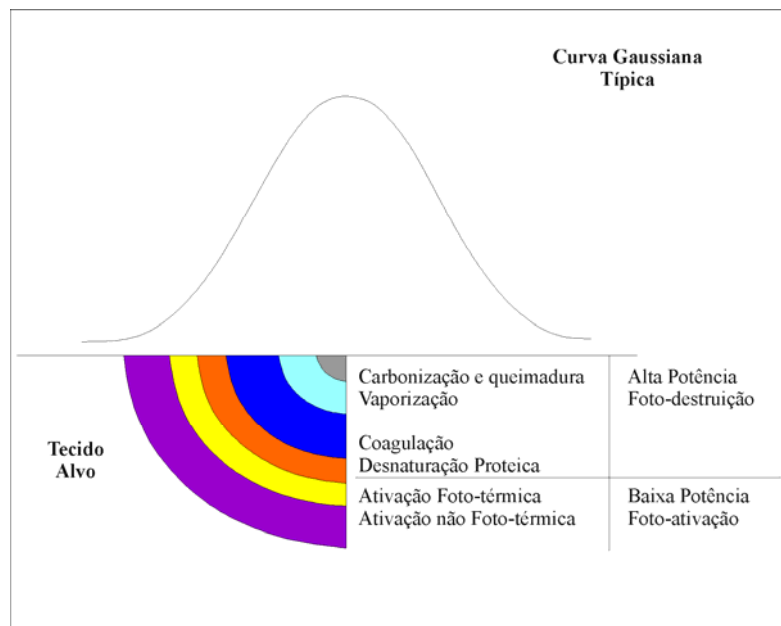


Figura 6 - Perfil espacial gaussiano de um feixe laser e sua interação com o tecido, proposto por OHSHIRO & CALDERHEAD em 1988.

No perfil gaussiano de um feixe laser, o pico de energia concentra-se na região central do feixe, decrescendo gradualmente à medida que se aproxima da periferia, representando os efeitos típicos da interação laser-tecido biológico, evidenciando estes efeitos de acordo com a variação da densidade de energia. A região da desnaturação

proteica não ultrapassa a temperatura de 40°C; na região correspondente à ativação foto-térmica, haverá um aumento da temperatura, porém não suficiente para causar mudança estrutural macroscópica no tecido, devendo somente ativá-lo; na zona mais afastada região não fototérmica os tecidos ainda são ativados pela irradiação, estes efeitos são conhecidos como “Terapia Laser de Baixa Potência ou Laserterapia e podem ocorrer simultaneamente às reações foto destrutivas do laser cirúrgico (OHSHIRO & CALDERHEAD, 1998).

Os lasers de baixa intensidade passam a ser utilizados em diferentes meios ativos, comprimento de onda, potências, frequências e densidades de energia. Os meios sólidos, líquidos e gases têm sido utilizados para produzir lasers com comprimento de onda específico; no entanto, o princípio básico para a produção de um feixe laser é o mesmo para todos os meios. (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; LAAKSO et al, 1993 a ; KITCHEN & PARTRIDGE; 1991).

Após a descoberta do laser hélio-neônio (He-Ne) com o comprimento de onda de 632,8nm, surgiram vários interesses em produzir um laser com emissão na faixa infravermelha, porém estes aparelhos só apareceram no final da década de 70 com o surgimento dos lasers de arseneto de gálio (Ga-As) e de arseneto de gálio alumínio (Ga-Al-As) (TUNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; OHSHIRO, 1991).

Classificaram-se então os lasers de baixa potência em equipamentos de emissão infravermelha que emitem comprimentos de onda a partir de 770nm até 1300nm. Esses lasers estão constituídos fundamentalmente pelo cristal de arseneto de gálio (Ga-As) e pelo arseneto de gálio alumínio (Ga-Al-As), e por lasers invisíveis que emitem comprimento de onda até 770nm (KLOTH, 1997; HERCH & TERESI, 1987; COLLS, 1985).

Os raios lasers produzem luz monocromática, a luz emitida é de mesmo comprimento de onda e de frequência, apresentam uma só cor que difere em cada categoria de laser, observando-se variação no comportamento de fótons que não divergem. Ao contrário da luz doméstica que se espalha depois de sair da fonte, a luz monocromática produz intensidade capaz de criar uma força de radiação por  $\text{cm}^2$  muito grande, uma vez que os fótons chegam ao ponto final com igual carga de energia luminosa (COLLS, 1985).

Os parâmetros que descrevem a luz laser são o comprimento da onda, a potência útil, a densidade de potência ou irradiância, a densidade de energia ou fluência, modo e tipo do feixe e a frequência de tratamento ( TUNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997;

KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSO et al, 1993 a; 1993 b; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

Alguns autores consideram que o comprimento de onda é o fator determinante para os efeitos fisiológicos produzidos pela terapia laser. A especificidade de absorção para determinado comprimento de onda determina quais os tipos de tecido que irão absorver preferencialmente a radiação incidente e por sua vez, a profundidade de penetração da mesma (BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; LAAKSOL ET al. 1993 a).

Segundo LAAKSOL et al.(1993 b), é consenso que o comprimento de onda mais curto dentro da faixa visível é mais indicados para o tratamento de lesões superficiais, enquanto o comprimento mais longo na faixa do infravermelho próximo é eficaz para o tratamento de lesões mais profundas.

Quanto maior o comprimento de onda, maior a penetração do laser nos tecidos (HARRIS, 1991). A penetração do laser He-Ne é de 10 a 15mm (SEITZ & KEINKORT, 1986), enquanto o laser AsGa está em torno de 50mm (SEITZ & KLEINKORT, 1986; CALDEIRA, 1997). O laser de AsGa produz luz que não é absorvida pelos pigmentos celulares, com penetração tissular entre 10 e 50mm.

O parâmetro potência útil normalmente é fixo e invariável, embora alguns aparelhos permitam que o operador selecione a percentagem, além de oferecer a opção de pulsação da potência útil (KITCHEN & BAZIN, 1996).

OHSIRO (1991) observou que potências inferiores a 60mW em comprimentos de onda entre 790nm e 904nm diminuíram a dor de maneira efetiva. Porém foram observados efeitos quase termais como exacerbação do quadro algico, espasmo muscular involuntário e síncope nervosa.

A densidade de potência ou irradiância é a potência de saída da luz por área de irradiação é dada em mW/cm<sup>2</sup> ou w/cm<sup>2</sup>. Normalmente, na prática clínica e laboratorial, a densidade de potência não ultrapassa a 50nw/cm<sup>2</sup>(BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

TRELLES et al.; citados por LAAKSOL et al. (1993 b), afirmam que altas densidades de potência com tempos curtos de irradiação podem ser mais eficazes na promoção dos efeitos da LLLT.

A densidade de energia, fluência ou dose é a energia total transmitida por um feixe laser por unidade de área e é dada em J/m<sup>2</sup> (sistema MKS) ou J/cm<sup>2</sup>, no caso da fisioterapia ou nas aplicações biomédicas. A energia fornecida em joules(J) é calculada

através da multiplicação da potência de saída em watts (W), pelo tempo de irradiação ou aplicação em segundos(s) (TUNER & HODE, 1999; BAXTER, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996; KITCHEN & PARTRIDGE, 1991).

A dose ideal de radiação depende da distância entre a pele e o aparelho laser, do tamanho da área irradiada, do sistema óptico do aparelho (sistemas de lentes ou espelhos), do tipo de fonte utilizada da saída de potência, do tempo de irradiação, da divergência do feixe, assim como da reflexão, transmissão, dispersão, absorção e profundidade do tecido tratado (BAXTER, 1997; BECKERMAN et al, 1992).

Segundo COOMBE (2001) não existem determinações específicas de dosimetria e mecanismo de ação para diferentes tipos celulares, assunto que requer estudos.

A absorção de fótons por parte da célula, seja diretamente por captação em nível de cromóforos mitocondriais ,seja por ação em sua membrana celular, produz estimulação ou inibição de atividades enzimáticas e de reações fotoquímicas. Estas ações determinam alterações fotodinâmicas em cascatas de reações e em processos fisiológicos com conotações terapêuticas (FUNK et al., 1992).

Esses processos podem manifestar-se clinicamente de três modos. Primeiramente, vão agir diretamente na célula, produzindo um efeito primário ou imediato, aumentando o metabolismo celular (KARU et al., 1989; ROCHKIND, et al., 1989; BOLTON et al. 1995), aumentando a síntese de endorfinas e diminuindo a liberação de transmissores nociceptivos, como a bradicinina e a serotonina, e, ainda ação na estabilização da membrana celular (ATAKA et al., 1989, PALMGREN, 1992; IJIMA et al., 1991). O efeito secundário ou indireto, aumentando o fluxo sanguíneo (KUBOTA e OHSHIRO, 1989) e a drenagem linfática (LIEVENS, 1986; 1988; 1990; 2001). E o terceiro consiste na observação clínica da ação estimulativa, analgésica, e anti-inflamatória e da ativação do sistema imunológico. (MESTER et al., 1977; TRELLES, 1983; SKOBELKIN et al., 1991; VÉLEZ-GONZÁLEZ et al., 1994; TUNÉR e HODE, 1996).

SKOBELKIN et al.(1991) apresentaram um estudo clínico de pacientes oncológicos, que visava à ativação do seu sistema autoimune no período pré-operatório. Os autores propuseram que essa terapia poderia ser utilizada como coadjuvante em pacientes portadores de imunodeficiências. Utilizaram-se 60 pacientes divididos em quatro grupos e irradiados no pré-operatório imediato. Um grupo foi controle, outro irradiado transcutaneamente (sobre linfonodos) com o laser 890 nm, outro irradiado

internamente com laser He-Ne, e outro com uma associação de ambos os métodos de irradiação. Os estudos avaliaram componentes de células brancas do sangue, ensaios de atividade imunoglobulínica (IgA, IgM e IgG), além de determinação do comportamento de frações de linfócitos T. Essa avaliação foi feita antes e depois das irradiações. Os autores observaram que a resposta imunológica dos pacientes irradiados foi significativamente aumentada em relação ao grupo-controle.

Os efeitos fisiológicos da bioestimulação incluem aceleração na síntese de colágeno (HARRIS, 1991; TAYLOR et al., 1998) e diminuição local do número de micro-organismos, aumento da formação vascular, de fibroblastos e de tecido epitelial (SEITZ & KLEINKORT, 1986).

Dependendo da dosagem empregada cada laser pode estimular ou inibir as várias fases de cicatrização. É considerado uma “janela terapêutica” para uma fotoestimulação efetiva, acima de um limiar, porém abaixo de um nível que cause inibição, resultante do efeito de dose dependente representado por uma curva dose versus resposta. Segundo esse conceito, descrito como lei de Arndt-Schulz, os estímulos fracos excitam a atividade fisiológica, moderadamente fortes a favorecem, fortes a retardam, e os muito fortes a interrompem. Também é chamada de lei de Arndt, foi proposta por Rudolph Arndt (1835-1900), um psiquiatra alemão, e tem sido utilizada para tentar explicar os resultados conflitantes dos estudos sobre LLLT (BAXTER, 1997; KLOTH, 1997; KITCHEN & BAZIN, 1996).

HAWKINS (2006) buscou estabelecer o comportamento dos fibroblastos de pele humana ferida submetida à irradiação a laser He-Ne 632,8nm com 1, 2 e 3 exposições diárias com doses de 2,5 j/cm<sup>2</sup>, 5 j/cm<sup>2</sup> e 16 j/cm<sup>2</sup> por dois dias consecutivos. A terapia laser de baixa potência (LLLT) promove o processo de cicatrização em diferentes casos clínicos, porém o comprimento de onda, intensidade e dose podem acelerar o processo. Os efeitos de múltiplas irradiações nas respostas celulares ainda devem ser esclarecidos. As respostas celulares mediante a irradiação He Ne foram avaliadas através da morfologia celular, viabilidade celular, proliferação celular e danos causados pela irradiação. Os resultados demonstraram que uma exposição de 5 j/cm<sup>2</sup>, duas e três exposições de 2,5 j/cm<sup>2</sup> apresentaram efeito positivo para os fibroblastos, aumentando a migração e proliferação celular, mantendo a viabilidade celular sem causar tensão adicional a células. A redução da migração celular, viabilidade celular, atividade de ATP e inibição de proliferação celular foram os resultados dos efeitos

cumulativos de múltiplas aplicações de doses elevadas(16 j/cm<sup>2</sup>) causando efeito inibitório com danos.

HOURELD (2007) avaliou a irradiação laser 632,8 nm em intervalos de tempos crescentes, em células fibroblásticas diabéticas induzidas (WS1) *in vitro*, realizando uma análise morfológica, celular e molecular. Foram utilizadas células WS1 em modelo diabético *in vitro*, o efeito da frequência da irradiação 632,8 nm, com fluência de 5 j/cm<sup>2</sup> foi determinado por análise morfológica celular, viabilidade celular, citotoxicidade e dano celular. Utilizaram-se três protocolos distintos de intervalo, uma irradiação 30min após a indução, uma irradiação 30 min e outra 24 horas após a indução, e 30min e outra 72 horas após a indução. Os resultados demonstraram que uma única exposição aumentou o dano celular enquanto, duas exposições, com intervalo de 24 horas, diminuía a viabilidade celular. Já o fechamento completo da ferida, o aumento da viabilidade celular e a diminuição da citotoxicidade e dano celular ocorreram quando o intervalo entre duas aplicações foi de 72 horas. Contudo, o intervalo de irradiação revelou-se importante na cicatrização.

KANÃ (1981) analisou os efeitos do laser hélio-neônio (potência de 25mw e comprimento de onda de 632,8nm) em feridas no dorso de ratos. O laser foi aplicado em ondas contínuas, com doses de 4, 10 e 20 j/cm<sup>2</sup> diariamente, durante 17 dias. Observou que feridas irradiadas com doses de 4j/cm<sup>2</sup> apresentaram cicatrização mais rápida e maior produção de colágeno. Uma ligeira redução da velocidade de cicatrização foi observada com doses de 20 j/cm<sup>2</sup>.

Desde os anos 60, o grupo do Prof. Mester estabeleceu a dose de 1 j/cm<sup>2</sup> como parâmetro ótimo para cicatrização de feridas. Dez anos mais tarde, surgiram pesquisas relatando que a dose de 4j/cm<sup>2</sup> seria o ideal para o processo de reparo, desde então, vários pesquisadores têm utilizado estas doses como ideais para estimular o processo de cicatrização de diversos tecidos (TUNER & HODE, 1999).

Em 1989, o filho de Endre Mester, Andre MESTER, que ,após a morte de pai, manteve sua linha de pesquisa, publicou um seguimento clínico de 2167 pacientes portadores de úlceras cutâneas ou de mucosas, confirmando que a fluência ideal para a terapia desse tipo de úlceras era de 4 J/cm<sup>2</sup>, fluência essa que já havia sido preconizada anteriormente.

HUSENY DEMIR, M. D. et al.(2004) comparam a estimulação elétrica e o laser no tratamento de feridas dérmicas de 6 cm induzidas no dorso de ratos. O estudo utilizou 4 grupos .Grupo 1 utilizou 300 µA por 30 min , por dia(1° o polo negativo

sobre a ferida por 3 dias, seguido do polo positivo sobre a ferida por 7 dias), Grupo 3 Ga As 1 j/cm<sup>2</sup>, 6 mW por 10min por dia, os Grupos 2 e 4 são os controles respectivos, todos os grupos foram tratados por 10 dias consecutivos, foram realizados sacrifícios no 4° e 10° dia de tratamento para as análises histológicas e biomecânicas. Os resultados demonstraram que a proliferação e a maturação celular resultaram em efeitos benéficos na fase inflamatória dos Grupos 1 e 3 e mostraram-se, mais eficientes quando comparados aos dos grupos-controles respectivos, portanto quando comparados entre eles não houve diferença estatística significativa.

HAWKINS (2006) avaliou o laser com o comprimento de onda 632,8nm, dose de 2,5j/cm<sup>2</sup>, 5j/cm<sup>2</sup>, 16j/cm<sup>2</sup>, 1, 2 e 3 exposições diárias, em fibroblastos humanos divididos em 9 grupos (Grupo tratado com 2,5j/cm<sup>2</sup> frequência 1, 2 e 3, grupo tratado com 5j/cm<sup>2</sup> frequência 1, 2 e 3, grupo tratado com 16j/cm<sup>2</sup> frequência 1, 2 e 3), Os resultados demonstraram que uma exposição de 5j/cm<sup>2</sup>, duas e três exposições de 2,5j/cm<sup>2</sup> apresentaram efeito positivo para fibroblastos, aumentando a migração e proliferação celular mantendo a viabilidade sem causar tensão adicional à célula. A redução da migração celular, viabilidade celular, atividade de ATP e inibição de proliferação celular foram os resultados dos efeitos cumulativos de múltiplas aplicações de doses elevadas (16j/cm<sup>2</sup>) causando um efeito inibitório com danos.

MIRZAEI, M (2007) objetivou avaliar a proliferação celular quando aplicada a terapia a laser de baixa potência (LLLT) em culturas celulares da pele de ratos diabéticos. Retirada a pele para a cultura *in vitro* de 5 amostras de pele do grupo-controle e 5 amostras de pele do grupo tratado com irradiação a laser He Ne, 4 j/cm<sup>2</sup> por quatro aplicações consecutivas. Os resultados demonstraram que 4 j/cm<sup>2</sup> de irradiação gerou um aumento significativo no número de fibroblastos, quando comparados ao do grupo-controle, concluindo que a irradiação de He-Ne 4j/cm<sup>2</sup> resultou em aumento significativo na proliferação de fibroblasto de ratos STZ-D *in vitro*.

HAWKINS (2007), objetivando alcançar a proliferação celular por meio da aceleração do processo cicatricial em ratos, utilizou a dose de 5 j/cm<sup>2</sup> laser hélio neônio com comprimento de onda de 632,8nm que foi a mais eficiente, quando comparada à mesma densidade com lasers de comprimento de onda 1064 e 830nm.

FAROUK (2006) realizou este estudo objetivando analisar o efeito do laser com distintos comprimentos de ondas e dosimetrias no processo de cicatrização de ratos diabéticos Sprague-Dawley, sexo masculino. Foram utilizados os comprimentos de onda de 532 nm, 633 nm, 810 nm, 980 nm com doses de 5, 10, 20 e 30 j/cm<sup>2</sup>, três

aplicações por semana. A área da ferida dos ratos estava plotada em um quadro de declive avaliando  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , considerando a porcentagem e a velocidade da cicatrização. Valores de declive ( $\text{mm}^2/\text{dia}$ ) em ratos do grupo-controle não diabéticos era de 6.0871 e 3.636 em ratos diabéticos ( $p > 0.005$ ). As velocidades de cicatrização foram de 15.23, 18.06, 19.54 e 20.39, para o grupo que tratou com 532nm de 33.53, 38.44, 32.05 e 16.45 para o grupo que tratou com 633nm de 15.72, 14.94, 9.62 e 7.76 para o grupo que tratou com 810nm de 12.80, 16.32, 13.79, 7.74, para o grupo que tratou com 980nm, usando fluências de 5, 10, 20 e 30  $\text{j}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Conclui-se, portanto, que a cicatrização em ratos diabéticos é mais lenta que em ratos do grupo-controle não diabéticos e que o comprimento de onda ideal é de 633nm com a fluência de 10  $\text{j}/\text{cm}^2$ .

RABELO (2006) utilizou o laser no comprimento de onda 632,8nm, potência 15mW, dose diária de 10 $\text{j}/\text{cm}^2$ , em 50 ratos Wistar com úlceras dérmicas divididos em animais diabéticos e não diabéticos; 15 animais diabéticos controle e 10 tratados, 15 animais não diabéticos controle e 10 tratados. Os animais diabéticos e não diabéticos tratados com laser He Ne, 10 $\text{j}/\text{cm}^2$  apresentaram uma cicatrização eficiente, mas o grupo não diabético apresentou cicatrização mais rápida. Os grupos tratados com laser revelaram melhor qualidade tecidual de cicatrização, a análise microscópica apresentou maior quantidade de células inflamatórias e maior número de fibroblastos por área.

ERDLEY BL (2008) utilizou a irradiação laser 670nm para tratamento de feridas induzidas em ratos, comparando com o grupo-controle. A área das feridas tratadas com laser diminuiu mais rapidamente quando comparadas à do grupo-controle, sugerindo a utilidade do laser no pós-operatório.

MEDRADO (2003), avaliando a ação do laser no comprimento de onda 904nm, potência 9mW, dose 4 $\text{j}/\text{cm}^2$  8 $\text{j}/\text{cm}^2$ , frequência diária em úlceras dérmicas de 72 ratos Wistar, divididos em 3 grupos de 24 animais (1 grupo-controle, 1 grupo tratado, 4 $\text{j}/\text{cm}^2$  e 1 grupo tratado, 8 $\text{j}/\text{cm}^2$ ), e constatou, após o término do estudo, um paradoxo, o laser havia provocado uma série de mudanças morfológicas favoráveis à resolução da ferida, mas não diminuiu o tempo de cicatrização. Estes efeitos podem ser importantes por diminuir a exsudação mais cedo pela liberação de citosinas, a dor e a tumefação, facilitando a contração da ferida embora ela não ocorra necessariamente mais rápida.

Segundo PARREAU-SCHEIDE et al. (1990), a irradiação com o laser He Ne estimula as culturas de linfócitos, aumentando sua capacidade de fagocitose, aumentando a eficiência das células apresentadoras de antígeno, promovendo, assim,

um aumento na afinidade dos linfócitos para detectar o patógeno invasor. O laser promove melhor oxigenação e vascularização do tecido porque atua no esfíncter pré-capilar, gerando a abertura constante e aumentando a capacidade de cicatrização do tecido (SERAFIM & TEODOROSKI, 2003).

HOPPINKINS (2004), avaliando o laser com o comprimento de onda 820nm, dose 8j/cm<sup>2</sup>, em úlceras dérmicas de humanos, utilizou 22 pacientes divididos em 2 grupos de 11 (1 grupo-controle e 1 grupo tratado 8j/cm<sup>2</sup>), concluiu que a terapia laser de baixa potência foi efetiva para acelerar a contração da ferida. Para ele novos estudos controlados são necessários para determinar a eficácia do LLT, com vistas em facilitar a cicatrização e reduzir a dor associada a desordens musculoesqueléticas.

Vários são os mecanismos pelos quais o laser pode atuar na promoção, aceleração e melhoria da qualidade da cicatrização tecidual.

O laser de baixa potência aumenta a oxigenação tecidual, promovendo a expansão da microcirculação e estimulando a capacidade adaptativa. O laser GaAlAs 904 nm, quando aplicado na microcirculação mesentérica de ratos vivos, promove dilatação das arteríolas irradiadas, seguida de aumento no fluxo sanguíneo arteriolar. Segundo ENWEMEKA et al. (1990), as três fases do reparo tecidual são positivamente influenciadas pelo tratamento com o laser, o efeito positivo está em aspectos conhecidos da inflamação, tais como: proliferação celular, granulação e promoção de atividades de citosinas.

BENEDICENTI (1982) demonstrou que o fluxo de sangue em capilares mesentéricos aumentou após a irradiação com o laser 904 nm, fenômeno esse confirmado por MIRÓ et al. (1984), que utilizaram como modelo de estudo o leito de unha e irradiaram com o laser As-Ga, observando que a circulação da região aumentou após a irradiação. O incremento do fluxo sanguíneo continuou durante 20 minutos após cessar a irradiação com laser, inclusive quando a área alvo foi esfriada. TRELLES et al. (1983) publicaram um experimento realizado em olho de coelho em que novamente foi confirmado esse fenômeno.

LIEVENS trabalhou bastante no tema de efeitos do laser de baixa potência na atividade do sistema linfático, tendo publicado vários trabalhos bastante elucidativos nessa área (1986, 1988, 1990). Em 1991, o autor publicou um estudo com 50 ratos, nos quais fez incisões na região abdominal e as irradiou com um laser He-Ne e laser de As-Ga 904 nm. Avaliou a adesão pós-cirúrgica, o edema local e a regeneração de veias e de vasos linfáticos da região mesentérica. Observou que, ao irradiar essa região com laser,

o fluxo linfático instalou-se rapidamente. A regeneração dos vasos linfáticos nos animais tratados com laser foi mais rápida que no grupo-controle não irradiado. No primeiro grupo, a regeneração estava completa aos 9 dias, enquanto o grupo-controle apresentou regeneração incompleta ainda aos 55 dias da cirurgia. O autor também observou uma neovascularização formada significativamente mais rápida nos animais tratados, que se deu em menos da metade do tempo que nos animais do grupo-controle. A adesão peritoneal foi escassa nos grupos tratados com laser, e comum nos grupos controle.

CHEN, C. H. (2008) buscou determinar o mecanismo pelo qual a irradiação a laser (LLLT) influencia a angiogênese pela Kinase/NOS, P13 que sinaliza o caminho celular e provoca a migração de célula endotelial e neovascularização, aspectos importantes e necessários para a cicatrização de feridas. Utilizando a irradiação do laser 632,5 nm para a estimulação de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), verificou-se seu efeito na proliferação celular, secreção de óxido nítrico e na migração celular. Os resultados demonstraram aumento na síntese de óxido nítrico endotelial, aumento na expressão proteica, aumento na migração celular para a veia umbilical humana com irradiação de 0,26 j/cm<sup>2</sup>, promovendo a angiogênese.

Os resultados dos estudos de REDDY (1998) indicaram que o laser GaAs é efetivo na promoção do reparo e na melhora da cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Os resultados revelaram que o colágeno total foi aumentado em 19% nas feridas tratadas com o laser He-Ne e 14% nas feridas tratadas com o laser GaAs. Os achados das análises biomecânicas e bioquímicas de feridas de ratos diabéticos demonstraram que o laser He-Ne é superior ao laser GaAs na promoção do reparo das feridas. A radiação produzida pelo laser He-Ne foi a mais estudada entre as várias intensidades de laser para promover a cicatrização de feridas, já o efeito do laser GaAsAl no processo cicatricial permanece pouco entendido (MENDEZ et al., 2004).

Estudo realizado por PUGLIESES (2003) objetivou quantificar a interferência do laser na produção de fibras colágenas e elásticas, no processo de cicatrização, utilizando o laser arseneto de gálio alumínio com densidade de 4 e 8 j/cm<sup>2</sup>. Os animais foram sacrificados 24, 48, 72 horas aos 5, 7 e 14 dias. Os grupos submetidos à terapia laser apresentaram maior redução do edema e infiltrado inflamatório e maior expressão de fibras colágenas e elásticas tendo o tratamento que utilizou densidade de 4j/cm<sup>2</sup> apresentado melhores resultados que o de densidade de 8j/cm<sup>2</sup>.

PETER GAL (2008) utilizou laser arseneto de gálio em associação com o uso de Metil Predisona, potência 1mw/cm<sup>2</sup>, 5mw/cm<sup>2</sup>, 15mw/cm<sup>2</sup>, e dose diária 5j/cm<sup>2</sup>, em úlceras dérmicas de 48 ratos Sprague-Dawley, divididos em (2 grupos de 24, e 3 subgrupos de 8 animais cada). A conclusão deste estudo reforça a teoria dos efeitos benéficos da LLLT na cicatrização de feridas em condições normais e com a utilização de corticoides. Além disto o estudo demonstra que a LLLT com potência de 15mW/cm<sup>2</sup> estimula a cicatrização acelerando a migração e proliferação de queratinócito, e o surgimento de novas fibras colágenas. Sugere-se utilizar 15m/W de densidade em estudos clínicos.

OZCELIK (2008) utilizou o laser com o comprimento de onda 588nm, potência 120m/W, dose diária 4j/cm<sup>2</sup> em 20 pacientes submetidos à gengivectomia divididos em dois grupos de 10 pacientes, 1 grupo-controle e 1 grupo tratado. Dentro das limitações deste estudo, os resultados demonstraram que LLLT melhora a cicatrização aumentando a epitelização após a gengivectomia e a gengivoplastia. Deve-se desenvolver estudos que esclareçam melhor os parâmetros de LLLT para obter melhores resultados.

SILVEIRA (2009), utilizando o laser com o comprimento de onda 904nm, potência 15 mW, 30mw, dose diária 5j/cm<sup>2</sup>, em lesão traumática no gastrocnêmio de 18 ratos Wistar, divididos em 3 grupos de 6 animais, 1 grupo-controle, 1 grupo tratado com a potência de 15mW, e 1 grupo tratado com a potência de 30mW. Os resultados demonstraram que a LLLT aumentou a atividade mitocondrial levando ao aumento na síntese de ATP acelerando a cicatrização muscular. Embora este estudo tenha sido realizado em modelo animal, é possível extrapolar os resultados à prática clínica com humanos. Sugere-se o desenvolvimento de outros estudos.

PARIZOTTO, N. A. (2006) realizou um estudo utilizando os efeitos da irradiação dos lasers 685 nm e 830 nm para o tratamento de ratos submetidos à tenectomia, já que outros autores demonstraram a utilização de lasers de baixa potência (LLLT) acelerando o processo de cicatrização do tendão de Aquiles decorrente da proliferação fibroblástica e aumento na síntese de colágeno, não esclarecendo totalmente o processo. Utilizaram-se 48 ratos divididos em 6 grupos experimentais, Grupo A animais tenectomizados tratados com 685 nm, dose 3 j/cm<sup>2</sup>; Grupo B, animais tenectomizados tratados com 685nm, dose 10 j/cm<sup>2</sup>; Grupo C animais, tenectomizados tratados com 830 nm, dose 3 j/cm<sup>2</sup>; Grupo D, animais tenectomizados tratados com 830 nm, dose 10 j/cm<sup>2</sup>; Grupo E controle recebendo tratamento placebo; Grupo F controle standart não ferido. Os animais foram sacrificados 13 dias após a tenectomia, foram

retirados os tendões e foi realizada uma análise quantitativa com microscopia de polarização, mensurando a organização das fibras de colágeno. Todos os grupos tratados apresentaram valores melhores que os do controle, observando-se melhor organização e agregações das fibras de colágeno dos animais do Grupo A (685 nm, 3 j/cm<sup>2</sup>), seguido dos Grupos C, B e D, indicando existir uma especificidade de tecido, de comprimento de onda, e de dependência da dose, situação que requer estudos adicionais para investigar os mecanismos fisiológicos responsáveis pelo efeito do laser no reparo tendineo.

Dentre as discussões sobre o comprimento de onda e doses ideais para promover, acelerar e melhorar a qualidade do tecido cicatricial, estudos recentes demonstram eficiência para a dose de 4 j/cm<sup>2</sup> do laser hélio-neônio comprimento de onda 632,8 nm. Portanto este está sendo substituído pela indústria pelo laser índio-gálio-fósforo comprimento de onda de 670 nm, por apresentar os mesmos efeitos biológicos, mas com um custo muito menor, como corrobora ERDLEY BJ (2008) em seu estudo, tendo os ratos tratados com laser comprimento de onda de 670 nm apresentado aceleração no processo cicatricial quando comparados aos do grupo-controle.

Recentemente, pesquisadores buscam comparar a eficiência da terapia laser de baixa potência com o uso de anti-inflamatórios para o controle do processo inflamatório e consequente cicatrização tecidual. Estudos com modelos experimentais utilizando a combinação terapêutica de laser com medicamentos anti-inflamatórios a fim de determinar os benefícios e malefícios desta combinação também tem sido realizados.

VIEGAS (2007) realizou um estudo para avaliar a modulação de reações inflamatórias de feridas em ratos Wistar, comparando o uso da terapia laser de baixa potência (LLLT) e o uso de anti-inflamatório Meloxicam. Foram realizadas feridas circulares no dorso de 64 ratos e estes divididos em 4 grupos; a saber: Grupo A controle, Grupo B animais tratados com Meloxicam, Grupo C irradiação 685nm e Grupo D irradiação de 830nm. Os animais foram sacrificados 12, 36, 72 horas e 7 dias após a indução de feridas. A análise microscópica revelou ativação vascular significativa no tempo de 36 horas, tendo o Grupo B apresentado diminuição na intensidade de infiltração polimorfonuclear e de edema, o Grupo D mostrou alta organização e maturação de fibras de colágeno, quando comparado aos outros grupos com o tempo de 72 horas. Os animais do Grupo C mostraram melhor padrão curativo aos 7 dias. A ação

anti-inflamatória do Meloxicam foi confirmada neste estudo. Concluiu-se que a LLLT melhora a qualidade do reparo histológico o que é importante durante o processo de cicatrização; portanto, com os métodos usados neste estudo, a irradiação laser não minimizou as reações inflamatórias.

GONÇALVES (2007) objetivou determinar o efeito da irradiação do He Ne, fluência 4 j/cm<sup>2</sup> em feridas de ratos albinos masculinos, 28-32g associado ao tratamento com remédios anti-inflamatórios . Foram utilizados 6 Grupos com 6 animais cada, Grupo C controle, Grupo L laser, Grupo D animais tratados com dexametasona, Grupo X animais tratados com Celecobix, e os Grupos D+L e X+L, tratados com medicamentos e laser. Foram efetuados sacrifícios no 1º, 2º, 3º dia após a indução de ferida, e, em seguida, o estudo histológico da pele. Foi observado aumento significativo na síntese de colágeno no Grupo L, quando comparado ao do controle. Grupo D e X diminuíram as células inflamatórias, quando comparados ao do controle. Concluiu-se que a irradiação laser promove formação de colágeno e restabelece a celularidade basal depois da inibição farmacológica, indicando boas perspectivas na terapia laser associada ao de drogas anti-inflamatórias.

SILVEIRA (2007) utilizou o laser com o comprimento de onda 607nm, dose diária 4j/cm<sup>2</sup>, em úlceras dérmicas de 32 ratos Wistar, divididos em 4 grupos de 8 animais: 1 grupo-controle, 1 grupo tratado laser, 1 grupo tratado dexametasona, 1 grupo laser + dexametasona. O uso clínico do dexametasona deveria ser limitado em condições cirúrgicas nas quais é necessário o seu uso, pois este reduz o edema e infiltrado polimorfonuclear na fase inflamatória. O LLLT apresentou resultado semelhante ao do grupo que usou dexametasona reduzindo o edema e o infiltrado polimorfonuclear, além de aumentar a produção matriz, de fibra colágena e sua organização.

LIEVENS (1991), pesquisando os mecanismos básicos da ação de tipos de lasers na cicatrização de feridas, avaliou o nível de adesão a planos inferiores, o grau de edema local a regeneração do sistema venoso e linfático. Os resultados demonstraram que a adesão celular após quatro dias do estabelecimento da ferida foi de 100% nos grupos controle não irradiados, enquanto nos grupos irradiados não foi significativa. Após 8 dias, o edema havia desaparecido nos grupos-controle, persistindo no grupo tratado. Seis meses depois, a permeabilidade dos vasos sanguíneos e linfáticos foi de 50% a mais nos irradiados em relação ao controle. RIGAU (1996) sugeriu que a

explicação disso seria pela resposta diferenciada dos mastócitos presentes nos tecidos irradiados com laser de baixa potência.

BOURGELAISE (1983) feriram o palato de cães da raça *beagle* e tatuaram pontos de ambos os lados das feridas para observar o grau de contração durante a cicatrização, usando laser infravermelho próximo com fluência de  $1 \text{ J/cm}^2$ . Utilizaram a irradiação três vezes por semana, durante três semanas, e não observaram alterações significativas no processo de cicatrização em relação ao grupo-controle não irradiado.

KAMEYA et al. (1995) avaliaram a cicatrização de feridas em ratos submetidos à laserterapia de diferentes comprimentos de onda (632,8; 680; 830 nm). Observaram diferenças macroscópicas significativas nos grupos irradiados em relação ao controle, embora não fossem estatisticamente significativas entre eles. Histologicamente, observaram que os três grupos irradiados apresentaram maior proliferação de tecido conjuntivo e maior presença de vasos sanguíneos, quando comparados aos do grupo-controle.

LOWE et al.(1998) estudaram a ação do laser 890 nm sobre a cicatrização de feridas padronizadas em dorso de rato, utilizando fluências de 0,18, 0,54 e  $1,45 \text{ j/cm}^2$ . As áreas das feridas foram analisadas por sistema de imagem e os autores não observaram diferenças significativas nos animais irradiados, quando comparados aos do grupo-controle.

Dentre as contraindicações do laser, estão as aplicações em pacientes com neoplasias, mulheres gestantes e em placas epifisárias abertas. A contraindicação absoluta à aplicação da fototerapia pelos efeitos do laser no crescimento de bactérias ainda permanece obscura. Dentre as precauções, evitar a incidência direta nos olhos do aplicador e do paciente os quais devem estar protegidos por óculos de segurança (SEITZ & KLEINKORT, 1986).

As publicações que correlacionam laser, vírus e bactérias ainda causam controvérsia e são pouco esclarecedoras. O laser de baixa potência atua como tratamento efetivo na prevenção dessas infecções *in vivo* como demonstrou TRELLES (1986) com o tratamento de pacientes em surto de herpes genital que foram irradiados com laser He-Ne isoladamente e laser associado com Acyclovir em herpes labial e facial, como demonstraram VÉLEZ-GONZÁLEZ et al. (1994), em estudo clínico feito com 60 pacientes, divididos em um grupo tratado com laser de He-Ne, outro com associação de laser de He-Ne e Acyclovir e outro somente com Acyclovir. Os autores obtiveram melhores resultados nos grupos tratados com a associação de laser de He-Ne

e Acyclovir. IJIMA (1991) demonstrou a efetividade desse tratamento na prevenção de nevralgias pós-herpéticas em um estudo com 18 pacientes tratados com laser de He-Ne, obtendo resultados favoráveis.

CARRILLO et al.(1987) fizeram um estudo *in vitro* sobre o crescimento de uma cepa de *Stafilococcus aureus*, onde utilizaram um laser de He-Ne com fluências de 0,3 J/cm<sup>2</sup> e 0,6 J/cm<sup>2</sup>. Os autores não observaram nenhum crescimento significativo.

A maioria dos autores revisados concorda em aspectos como a eficiência da indicação da terapia laser de baixa potência na aceleração do processo de cicatrização estimulando a cultura de linfócitos, a angiogênese, a microcirculação, a proliferação celular, a produção organização e agregação de fibras colágenas e elásticas sendo o comprimento de onda mais indicado os que variam entre 600 nm e 700 nm, potência útil que varia de mais 60 mw a menos 100 mw, densidade de potência de 50 nw/cm<sup>2</sup>, densidade de energia de 4 j/cm<sup>2</sup> variando em até 10 j/cm<sup>2</sup>. Embora alguns estudos não demonstrem o resultado satisfatório da laserterapia como KOPERA( 2005) , estudando o laser com o comprimento de onda 685nm, potência 200mW, dose diária 4j/cm<sup>2</sup>, em úlceras venosas crônicas de humaos em 44 pacientes divididos em 2 grupos de 22( 1 grupo-controle e 1 grupo tratado), em um modelo randomizado , placebo, duplo cego, não demonstrou melhora na cura das úlceras venosas crônicas, ou ainda pode ter contribuído para a não melhora contrariando as expectativas.Sugerem-se estudos com o n amostral maior, diferentes critérios de inclusão a fim de demonstrar a eficiência da LLLT.

### **III.9 - GUAÇATONGA (*Casearia sylvestris* Swartz)**

A utilização de plantas medicinais teve seu início, provavelmente, na Pré-História. Os homens primitivos iniciaram as práticas de saúde, alimentando-se de determinadas plantas pelo instinto de sobrevivência. Com isso foram observados determinados efeitos para minimizar suas enfermidades, acumulando conhecimentos empíricos que foram passados de geração em geração.

Com o decorrer da evolução histórica, teorias e análises de certas plantas medicinais foram criadas com o objetivo de contribuir com a Ciência Médica Moderna. Surge, então, a Fitoterapia, que, etimologicamente, vem da palavra grega Phyton (plantas) e Terapia (tratamento), ou seja, tratamento por meio das plantas (CARVALHO, 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS,1996), ainda hoje 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento depende das plantas medicinais na atenção primária à saúde (CALIXTO, 2000). As plantas medicinais tornaram importantes instrumentos na prevenção, recuperação e promoção da saúde nestes países não só pela cultura medicinal dos seus povos, mas também pela carência no acesso aos serviços de saúde e medicamentos (BUSCCHIAZZO, 2000). Atualmente, as plantas com fins terapêuticos são utilizadas por grande parte da população, principalmente pela de baixa renda com o intuito de aliviar seus males (DI STASI, 1996).

O Brasil está incluído no grupo dos países com altos níveis de diversidade biológica ou megadiversidade, em decorrência dos diferentes biomas e ecossistemas que caracterizam o país (SILVA, 2004). A biodiversidade das florestas tropicais e subtropicais consiste em um dos maiores estoques de genes do planeta, armazenados em milhares de espécies de plantas, animais e micro-organismos que nela vivem e interagem dentro de sistemas altamente complexos.

Em virtude da necessidade de desenvolvimento de novos fármacos que atendam a toda a população, a *Casearia sylvestris* destaca-se, por estar presente em vários estados brasileiros e ser relatada em diversos estudos as ações anti-inflamatórias, analgésicas, antiulcerogênicas, antiofídicas e cicatrizantes.

As plantas medicinais além do uso tradicional e empírico “in natura” ou processada de maneira simples (chás, “garrafadas”, banhos, etc), elas são muito importantes para a pesquisa farmacológica e para o desenvolvimento de novos medicamentos, quando suas partes ou seus constituintes químicos são utilizados diretamente como agentes terapêuticos (fitoterápicos e medicamentos que contêm fitofármacos), mas também como matéria-prima para a semissíntese de fármacos ou ainda como modelo para o desenvolvimento de compostos farmacologicamente ativos. Dentre 520 medicamentos aprovados no período de 1983 a 1994 pela agência americana Food and Drug Administration (FDA) e por outras similares em diversos países, 30 medicamentos eram derivados diretamente de produtos naturais, plantas em sua maioria, e 173 foram desenvolvidos a partir de fármacos semissintéticos de um produto natural como modelo para a sua síntese (DE SMET, 1997).

Há poucos exemplos de fitoterápicos à base de plantas nativas brasileiras. Uma das razões é que os estudos com plantas medicinais ainda não receberam a atenção que o tema merece das agências financiadoras de ciência e tecnologia no Brasil, embora já exista uma massa crítica de pesquisadores qualificados nas áreas de química e

farmacologia`, dentre outras. Até o momento, não houve um processo coordenado de todos os pesquisadores, botânicos, farmacologistas, toxicologistas, fitoquímicos, químicos sintéticos, clínicos, indústria farmacêutica e farmoquímica, produtos de plantas medicinais, visando ao desenvolvimento de fármacos e medicamentos a partir de plantas (PINTO et al, 2002).

A *Casearia sylvestris* foi originalmente descrita por Swartz em 1779 na Flora Indiae Occidentalis e incluída na família Flacourtiaceae (ABSY; SCAVONE, 1973; SLEUMER, 1980).

A espécie *Casearia sylvestris* Swartz pertence à família Flacourtiaceae, tem ampla distribuição em muitos estados brasileiros, como Amapá, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, dentre outros, e em outros países, como Guiana do México, Antilhas, Paraguai e Argentina (ALMEIDA, 1998; CORREA, 1975).

TORRES & YAMAMOTO (1986) desenvolveram estudos taxonômicos por meio da análise morfológica clássica, baseada principalmente nas obras de Eichler (1871) e Sleumer (1980) com espécies de *Casearia*, descrita no Quadro 1.

#### ***Descrição morfológica da Casearias sylvestris***

Extremidade glabra a pubescente, lenticelas esparsas a numerosas. Folhas geralmente maduras, às vezes jovens na floração; oblongas, elípticas ou ovado-oblongas; base atenuada, simétrica a assimétrica; cerca de (4,0-) 5,0-12,0 (-14,0) x (1,0-) 2,0-3,5 (-4,0) cm; membranáceas a papiráceas; totalmente glabras, exceto, às vezes, a nervura central em uma ou ambas as faces; pontuações transparentes, pequenas, numerosas, distribuídas por toda a lâmina; margem levemente glandular-serrulada a serrada; venação nunca subtriplínérvea, imersa, inconspícua a conspícua na face superior, inconspícua a proeminente na face inferior; pecíolo glabro a pubescente, cerca de 0,5-0,6 cm de comprimento; estípulas caducas. Fascículo sésil, cerca de 24-40 flores por inflorescência; bractéolas pequenas, escamiformes, na base dos pedicelos; pedicelo com cerca de 2,0-6,0 mm de comprimento, articulado quase na metade de seu comprimento, glabro a pubescente. Botão floral globóide; sépalas 5, levemente unidas na base, internamente glabras, externamente glabras a pubescentes, oblongas, com cerca de 4,0x2,0 mm. Estames (8-9-)10(-11-14); filetes glabros a seríceos, alternadamente cerca de 0,8 e 1,0 mm de comprimento; conectivo com glândula apical glabra. Lobos do disco seríceos a tomentosos, com cerca de 0,5-1,0 mm de comprimento. Ovário ovóide, glabro a seríceo na porção superior, estilete com (raramente 2-) 3 ramos na extremidade,

estigmas (raramente 2-) 3, capitados. Cápsula ovoide, com cerca de 5,0 mm de diâmetro, vermelha, cálice persistente; sementes, glabras, testas foveolada, arilo amarelo, pegajoso.

A *Casearia sylvestris* é encontrada em diferentes ambientes e apresenta grande variação morfológica quanto ao tamanho, forma, textura e consistência das folhas, à pilosidade dos ramos e das inflorescências, ao número de flores por inflorescências, ao comprimento do pelicelo, além do porte arbóreo ou arbustivo (YAMAMOTO, 1986). Sleumer 1980 considera duas variedades para a espécie: *var. sylvestris* e *var. língua*, sendo conectadas por formas intermediárias.

Estudos taxonômicos constataram a dificuldade em definir limites entre as variedades. A seguir as fotos 1 e 2 revelam as características da *Casearia sylvestris*.



Figura 7 - Arbusto *Casearia Sylvestris*



Figura 8 - Folhas da *Casearia sylvestris*

Segundo SCHEFFER (1999), a espécie encontra-se listada entre aquelas com aspecto comercial importante e consumida em grande escala, seja no mercado brasileiro seja no exterior, por mostrar ação contra diversas enfermidades. Popularmente, é mais conhecida como Guaçatonga, chá-de-bugre, erva-de lagarto, é usada como lenha, sendo seu uso medicinal indicado para várias enfermidades. As folhas, a casca e a raiz mostram ação antisséptica e febrífuga, além da ação cicatrizante, depurativa do sangue e no tratamento de sífilis; o chá das folhas é usado no combate à bronquite asmática e a casca como antidiarréica, em moléstias hepáticas e contra picadas de cobras que tem a explicação popular a observação de que os largatos picados por cobras curam-se comendo folhas desta planta (SILVA, 2003).

A investigação antiofídica da *C. sylvestris* foi inicialmente realizada por RUPPRLT, GONCALVES e PEREIRA (1990), que verificaram a ação de extratos aquosos (chás) de folhas e cascas, bloqueando a atividade na permeabilidade capilar, diminuindo a letalidade produzida pelo veneno bruto de *Bothrops jararacussu* (jararaca). As picadas de cobras produzem varias manifestações tóxicas como dor, edema, mionecrose local e sistêmica, alterações na coagulação do sangue, paralisia muscular e falência renal. Os venenos de cobras são misturas complexas de proteínas, incluindo a fosfolipase A<sup>2</sup> (PLA<sub>2</sub>s), miotoxinas, metaloproteases hemorrágicas e outras enzimas proteolíticas, componentes coagulantes, neurotoxinas, citotoxinas e cardiotoxinas, dentre outras (MEIER E STOCKER, 1995). A inibição das atividades enzimáticas e farmacológicas de venenos animais ou de suas toxinas purificadas constitui um método para a avaliação da atividade o antiofídica *in vitro* ou *in vivo*.

As PLA<sub>2</sub>s são abundantes em venenos de cobras. Atuam na hidrólise de fosfolipídeos e produzem uma série de atividades tóxicas, tais como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, formação de edema, efeito anticoagulante, inibição da agregação plaquetária e, finalmente, letalidade. O extrato aquoso de folhas de *C. sylvestris* inibiu a atividade hemolítica, anticoagulante, miotóxica, a indução de edema de pata, além de diminuir a letalidade, produzidas por PLA<sub>2</sub>s isoladas ou pelo próprio veneno bruto de cobras (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesia*) em ensaios farmacológicos realizados *in vitro* e *in vivo* (BORGES et al., 2000; CAVALCANTE et al., 2007; OSHIMA-FRANCO et al., 2005; RASLAN et al., 2002). Adicionalmente, o extrato hidroalcoólico de folhas também inibiu a ação miotóxica de uma PLA<sub>2</sub>; foi também notado que altas doses dos extratos aquoso e hidroalcoólico causaram bloqueio neuromuscular (OSHIMA-FRANCO et al., 2005).

As enzimas proteolíticas de venenos de espécies de *Bothrops* degradam diversos tipos de substratos, como caseína, hemoglobina, colágeno, elastina, fibrinogênio, fibronectina, dentre outros. Hemorragias provocadas por picadas de cobras são atribuídas hemorragina, uma metaloprotease dependente de zinco, capaz de romper a membrana de capilares, causando alterações nos vasos sanguíneos. O extrato aquoso de folhas de *C. sylvestris* inibiu a atividade hemorrágica, proteolítica (fibrinogenolítica e caseinolítica) e coagulante de venenos de *Bothrops* e/ou de 3 metaloproteases isoladas de *B. asper* e *B. neuwiedi*. Os autores certificaram-se de que as proteínas do veneno não degradaram, excluindo este mecanismo de ação; outras

possibilidades seriam a quelatação de metais, a ligação com sítio ativo e, ainda, mecanismos imunológicos. Proteases e seus inibidores estão em delicado equilíbrio nas células de mamíferos. Quando este equilíbrio é afetado, podem ocorrer distúrbios como neoplasias e outras doenças, o que amplia a importância do estudo de inibidores de proteases (BORGES et al., 2001).

Atribuiu-se a ação antiofídica a flavonóides e outros compostos fenólicos que foram identificados no extrato aquoso de folhas e em suas frações. Esta hipótese foi reforçada já que algumas destas frações também apresentaram atividade inibitória de PLA<sub>2</sub> (OSHIMA-FRANCO et al., 2005; RASLAN et al., 2002). No entanto, até o momento, os metabólitos secundários responsáveis pela atividade não foram identificados.

A *C.sylvestris* tem uma rica história nos sistemas de medicina tradicional no Brasil. Atualmente, ainda é uma planta medicinal incluída no arsenal da Fitoterapia popular. Seu uso envolve uma série de diferentes indicações, na medicina indígena da região amazônica, utilizavam-se suas folhas, cascas e raízes como antitérmico de uso externo ou interno (JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985). Farmacêuticos gaúchos empregavam a *C.sylvestris* no preparo de elixires depurativos e antirreumáticos, reconhecidos como eficazes no tratamento de moléstias de pele de origem sífilítica (CORREA, 1975). Nesta época, a planta foi incluída na Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (HERVA DE BRUGE), constando como parte utilizada suas folhas. O emprego oficial citado é do extrato hidroalcoólico (EtOH/H<sub>2</sub>O,1:2,v/v) obtido da percolação (1:1,m/v) (SILVA;1926).

A grande diversidade de usos populares da *C.sylvestris* no Brasil despertou desde há muitos anos, o interesse de grupos de pesquisadores, sobretudo de botânicos, etnobotânicos, farmacologistas e fitoquímicos demonstrados pela grande produção científica acerca desta planta e pelas três patentes depositadas referentes a ela .

Os diterpenos esculentina A e B, isolados de *C.esculentina* , apresentaram ação citotóxica em células tumorais e anti-inflamatória e a respectiva patente foi depositada na Europa por uma empresa farmacêutica (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND Embh, 1999). *C.sylvestris* é uma das espécies mais investigadas e está relacionada em 3 outras patentes. A primeira é a ação citotóxica das casearinas, que foi patenteada no Japão (KIRIN BREWERY, 1987). A ação antiulcerogênica apresentada por uma fração rica em casearinas gerou a segunda patente, depositada pela FAPESP, UNESP e USP, cujos pesquisadores pertencem ao Instituto de Ciências Biológicas da USP (FAPESP,

UNESP; USP, 2003). Recentemente pesquisadores da faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) depositaram uma patente de fitoterápicos à base de extratos de *C. sylvestris* para o tratamento de herpes (UNICAMP, 2005).

Pesquisas recentes classificaram a *Casearia* como um dos gêneros mais promissores na procura de drogas, inclusive contra o câncer. Estudos fotoquímicos iniciais empenharam-se na identificação de metabólitos ou classes de metabólitos, que foram realizados com testes clássicos (coloração, precipitação, etc.), comparação com padrões em cromatografia em camada delgada comparativa e espectrometria de absorção no ultravioleta. Os resultados indicaram a presença de saponinas, flavonóides e alcalóides em extratos de folhas (CARVALHO, 2007).

Vários estudos fitoquímicos com espécies de *Casearia* demonstram o predomínio de diterpenos do tipo clerodânico no gênero. Das 19 espécies de *Casearia* investigadas sob o aspecto fotoquímico (base de dados SciFinder® CAPlus® e Medline®, 1907-dez. 2007), 13 apresentaram mais de 120 diterpenos clerodânicos isolados de diferentes órgãos das plantas: folha, fruto, caule, raiz e semente.

Há diversos artigos publicados na literatura tratando da avaliação farmacológica de extratos de *Casearia sylvestris*. A maior parte das pesquisas concentrou-se nas atividades antiofídica, antiulcerogênica, anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante, todas estas relacionadas com o uso medicinal popular.

Em trabalhos de triagem de extratos bioativos de plantas do Cerrado, *C. sylvestris* var. *língua* foi uma das que exibiu atividades biológicas mais significativas. Os extratos hexânicos de folhas, madeira e casca das raízes e caules inibiram o crescimento do *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária; no entanto, foi observada significativa atividade citotóxica em células de mamíferos para o extrato de madeira do caule (MESQUITA et al., 2007). Extratos hexânicos e etanólicos de diferentes partes da planta (folhas, caules, raízes e frutos) apresentaram atividades leishmanicida (*Leishmania donovani*) e tripanossomicida (*Trypanosma cruzi*) (MESQUITA et al., 2005). Outros extratos exerceram ação larvicida em *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2006) e, ainda, o extrato etanólico das partes aéreas exibiu ação antifúngica, quando testado em *Candida albicans*, *C. papsitosis* e *C. krusei* (OLIVEIRA et al., 2007).

Os extratos hexânicos de folhas, madeira e casca das raízes e caules inibiram o crescimento do *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária; no entanto, foi observada significativa atividade citotóxica em células de mamíferos para o extrato de

madeira do caule (MESQUITA et al.,2007). Mesquita et al.(2005), também utilizando extratos hexânicos de diferentes partes da planta (folhas, caules, raízes e frutos) encontrou atividade leishmanicida (*Leishmania donovani*) e tripanossomicida (*Trypanosma Cruzi*). Outros extratos exerceram ação larvicida em *Aedes aegypti* (RODRIGUES ET AL., 2006) e, ainda, o extrato etanólico das partes aéreas exibiu ação antifúngica, quando testado em *Candida albicans*, *C.papsitosis* e *C Krusei* (OLIVEIRA ET AL., 2007).

Ensaio farmacológico para a avaliação de propriedades cicatrizantes das folhas de *Casearia sylvestris* demonstraram que o processo cicatricial evoluiu mais rapidamente nos animais tratados com o extrato etanoico (95%) ou com a pomada (PEG) do extrato hidroalcoólico (GOMES et AL., 2005; Scavone et AL.,1979).

CAMARGO (1996) avaliaram a ação do extrato hidroalcoólico (2:1,v/v) de folhas em lesão cutânea de ratos, observando que animais tratados com extrato apresentaram redução significativa da fase aguda do processo inflamatório seguida da intensificação e prolongamento de eventos típicos da fase regenerativa (proliferação de fibroblastos, fibrocitos e vasos capilares neoformados).

Há evidências farmacológicas sobre o efeito anti-inflamatório de extratos de folhas da *Casearia sylvestris*. Os extratos aquosos (chás) de folhas e de casca produziram em camundongos significativos efeito analgésico, avaliado pelo número de contorções, e anti-inflamatório, avaliado em modelos de difusão do azul de Evans para a cavidade peritoneal e de edema de pata (PEREIRA et AL.,1992;RUPPEL et AL.,1990).

O extrato hidroalcoólico de folhas também mostrou atividade inflamatória em modelo utilizando o método de difusão e do modelo azul de Evans em ratos (SILVA; 2004). SASASSIOTO (2004) concluiu que a utilização da *Casearia sylvestris* promoveu atraso na cronologia do processo de reparação óssea em defeitos ósseos preenchidos com matriz óssea desvitalizada em ratos, os autores relacionaram este efeito com a atividade anti-inflamatória de metabólitos secundários que promovendo a inibição da síntese de prostaglandinas, produzem os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios , causando diminuição do número de macrófagos, fibroblastos e fibras colágenas, com ação inibitória sobre a osteogênese.

Os flavonóides são encontrados em folhas, flores, galhos, raízes ou frutos, são provenientes do metabolismo secundário das plantas e podem apresentar diferentes concentrações, dependendo do vegetal. Revelam propriedades importantes e atuam

como anticarcinogênicos, anti-inflamatórios , antialérgicos, antivirais, dentre outros (SIMÕES, 2003).

Os flavonóides biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias, como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos, dentre outros, constituem importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. O termo fenólico ou polifenol pode ser definido como sendo uma substância que tem um ou mais núcleos aromáticos que contêm substituintes hidroxilados e seus derivados funcionais, como ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros. São conhecidos mais de 4200 flavonóides; os de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e conjugados com açúcares, sendo denominados heterosídeos.

Quando o metabólito encontra-se sem açúcar, é chamado de aglicona ou genina, bem como de forma livre (SIMOES, 2003).

SILVA (2003) cita vários efeitos biológicos atribuídos aos flavonóides, a saber: servem para inibir a peroxidação de lipídios e a agregação de plaquetas e para ativar sistemas de enzimas, incluindo cicloxigenase e lipoxigenase, tais efeitos são atribuídos à sua capacidade de remover radicais livres e de quebrar cátions divalentes.

BORGES (2000) atribui o mecanismo de ação anti-inflamatória da *Casearia sylvestris* à inibição da fosfolipase A<sup>2</sup>. Os diterpenos clerodânicos podem ser responsáveis, pelo menos parcialmente, pela ação anti-inflamatória, como já foi verificado para as esculentinas A e B, isoladas de *C. esculentina*, além do extrato aquoso, extratos hexânicos e hidroalcoólicos também foram ativos.

Os produtos da ação das enzimas ciclooxygenase e lipoxigenase sobre o ácido aracdônico são prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, também denominados eicosanóides. Tais compostos são agentes homeostáticos, envolvidos na manutenção da integridade do sistema inflamatório, cardiovascular e renal. Vários pesquisadores têm demonstrado que flavonóides apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, dentre elas o efeito na atividade anti-inflamatória e hipocolesterolêmica, sendo o principal mecanismo proposto a inibição das enzimas envolvidas no metabolismo final do araquidonato (SILVA, 2003).

O ácido aracdônico é um constituinte do fosfolipídios de membrana e, por isso, a síntese dos eicosanóides inicia-se com a liberação desse ácido graxo, através de hidrólise, catalisada por fosfolipases específicas. Portanto, a inibição das enzimas

percussoras dos eicosanóides causada pela ação dos flavonóides inibe o processo inflamatório (GYTON, 1997).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, utilizados para a síntese de cortisona (anti-inflamatório) e de hormônios sexuais. Aumentam a absorção de certos minerais (MARTINS, 1994). Têm a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídios de membranas determinando propriedades biológicas importantes como alterações da permeabilidade da membrana celular (SIMÕES, 2003).

Os alcalóides são compostos de caráter básico e ocorrem naturalmente no reino vegetal. Apresentam Biosintética a partir das vias do ácido chiquímico ou mevalônico em combinação com diversos aminoácidos (DI STASI, 1996).

Os alcalóides são considerados os mais tóxicos dos princípios ativos. Alguns são conhecidos e citados na terapêutica científica, como a morfina, a ergotamina e a efredina (DI STASI, 1996). Na parede celular vegetal, encontram-se vacúolos em forma de sais, os quais se localizam nas folhas, nas sementes e nos caules. Os alcalóides atuam como reserva para a síntese de proteínas, estimulantes ou reguladores do crescimento, do metabolismo interno ou da reprodução (MARTINS, 1994).

MATTOS (2007) avaliou ação antinociceptiva do extrato hidroalcoólico 75% em 3 modelos diferentes de camundongos, e os resultados indicaram que o seu efeito antinociceptivo é mediado tanto por inibição da produção de mediadores da inflamação, quanto pela ativação de mecanismos envolvendo receptor opioide.

Os diferentes mecanismos de ação anti-inflamatória e cicatrizante que apresentam os diterpenos, flavonóides, saponinas, alcalóides, seja como inibidores das enzimas geradoras de eicosanóides, seja como expressão de agentes pró-inflamatórios, favorecem não só a formação de novas moléculas, obtidas de diferentes doses retiradas das diversas partes da *Casearia sylvestris* (folha, casca, raiz), mas também uma margem de segurança maior e menor efeito adverso, comparados aos dos medicamentos sintéticos existentes hoje no mercado, além de baixar o custo destas terapêuticas.

## IV- MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios biológicos , as dosagens hematológicas e bioquímicas foram realizados no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais, as análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da mesma instituição.

Este estudo obedeceu aos princípios éticos na experimentação animal exigidos pelo C6legio Brasileiro de Experimenta76o Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comiss6o de 6tica na Experimenta76o Animal (CEEA) da Pr6-reitoria de pesquisa /Universidade Federal de Juiz de Fora, n6mero do protocolo n6028/2008.

### IV.1-ANIMAIS

Os animais foram provenientes do Biot6rio do Centro de Ci6ncias Biol6gicas e da Sa6de da Universidade Federal de Viçosa.

Foram utilizadas 150 ratas f6meas (*Rattus navegicus albinos*, Rodentia mammalia), da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, pesando em m6dia 200 gramas e medindo em m6dia 15 cm da orelha ao in6cio da cauda, devidamente identificadas. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, ambiente climatizado temperatura  $22 \pm 2^\circ$ , ciclo claro/escuro de 12 horas, permanecendo por um per6odo de adapta76o de cinco dias e 20 dias de tratamento , recebendo ra76o comercial (Labina - Purina®) e 6gua “*ad libitum*”.



Figura 9 -Animais acondicionados no Laborat6rio Biof6rmacos

## IV.2-INDUÇÃO DE FERIDAS

Os animais foram anestesiados por Xilazina (2%), 10mg/Kg associada com Quetamina (10%), 100mg/Kg, via intramuscular no membro inferior. Em seguida, foram feitas a tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear, a antisepsia e, em seguida, foi marcada a área de 2 cm<sup>2</sup> utilizando caneta estereográfica e paquímetro . Procedeu-se, então, à exérese, utilizando lâmina de bisturi 21 e pinça, criando a ferida cirúrgica de 2cm<sup>2</sup> no dorso do animal.



*Figura 10 - Animal anestesiado após a indução de ferida*

Após a indução das feridas, os animais foram divididos em 10 grupos de acordo com o tratamento: G1-normal não tratado, G2- doente não tratado G3- laser 4j/cm<sup>2</sup>, G4- pomada dose 1, G5-pomada dose 2, G6- pomada dose 3, G7- pomada dose 1+tintura dose 1, G8- pomada dose 2+tintura dose 2, G9- pomada dose 3+ tintura dose 3 e o G10 laser 4j/cm<sup>2</sup> + pomada dose 3 e colocados em gaiolas individuais onde foram observados até retornarem da anestesia. Os animais permaneceram nestas gaiolas durante todo o tratamento.

As feridas não foram limpas entre as aplicações terapêuticas.

Cada grupo foi constituído de 15 animais e estes foram divididos em 5 subgrupos de 3 animais cada de acordo com os tempos da eutanásia.

**Tabela 3 - Distribuição dos grupos e seus respectivos tratamentos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>NÚMERO DE ANIMAIS</b>	<b>TRATAMENTOS</b>
Grupo 1-Grupo normal	15	Ração(R)
Grupo 2-Grupo doente não tratado	15	Ração (R)
Grupo 3	15	(R)+Laser-4j/cm <sup>2</sup>
Grupo 4	15	(R)+Pomada dose 1-5%
Grupo 5	15	(R)+Pomada dose 2-10%
Grupo 6	15	(R)+Pomada dose 3-20%
Grupo 7	15	(R)+Pomada dose 1-5%+Tintura dose 1-10%
Grupo 8	15	(R)+Pomada dose 2-10%+Tintura dose 2-20%
Grupo 9	15	(R)+Pomada dose 3-20%+Tintura dose 3-30%
Grupo 10	15	(R)+Pomada dose 3-20%+Laser 4j/cm <sup>2</sup>

**Tabela 4-Distribuição dos subgrupos e os respectivos animais de cada grupo.**

<b>TEMPOS DA EUTANÁSIA</b>	<b>NÚMERO DE ANIMAIS</b>	<b>GRUPOS</b>
12 horas após a indução-subgrupo 1	30	3 animais do grupo 1, 2, 3, 4,5,6,7,8,9,10.
3 dias após a indução-subgrupo 2	30	3 animais do grupo 1, 2, 3, 4,5,6,7,8,9,10.
7 dias após a indução-subgrupo 3	30	3 animais do grupo 1, 2, 3, 4,5,6,7,8,9,10.
15 dias após a indução-subgrupo 4	30	3 animais do grupo 1, 2, 3, 4,5,6,7,8,9,10.
20 dias após a indução-subgrupo 5	30	3 animais do grupo 1, 2, 3, 4,5,6,7,8,9,10.

### IV.3-TRATAMENTO

O material vegetal, folhas e raízes da *Casearia sylvestris* Swartz, foi coletado na horta medicinal do grupo Entre Folhas da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. As plantas foram identificadas por comparação com as excicatas presentes no Herbário do Centro de Ciências Biológicas, no Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, e sob o n° de registro 32250, uma excicata do material foi depositada no mesmo.



Figura 11-Excicata

Após a coleta, as folhas e as raízes foram submetidas aos procedimentos necessários para a preparação dos extratos.

#### IV.3.1- TRATAMENTO TÓPICO

#### IV.3.2- PREPARAÇÃO DO CREME

As folhas da *Casearia sylvestris* Swartz foram lavadas com água destilada, colocadas sobre papel absorvente e secas com secador, permanecendo por 24h, a temperatura de 20°C, umidade abaixo de 60%. Pesaram-se 30gramas de folhas que foram maceradas e incorporadas a uma solução de glicerina, álcool cereais e água

destilada para formar o extrato glicólico. A solução ficou em repouso, no escuro por 7 dias, sendo feita uma agitação manual diária. O material foi peneirado e filtrado. Alíquotas de 5, 10 e 20ml foram retiradas e incorporadas em creme lanette usual (Ceras autoemulsionantes, Propilenoglicol, Triglicérides do Ácido Cáprico, Metilparabenos, Propilparabenos, Imidazolidinil Ureia, Dimeticone, BHT, EDTA Dissódico e Água Deionizada).

#### **IV.3.3- APLICAÇÃO DO CREME**

O biofármaco de uso tópico em forma de creme base lanette, da folha da *Casearia sylvestris* Swartz nas concentrações de 5% (dose 1), 10% (dose 2) e 20% (dose 3) foi administrado na dose de 2 gramas sobre a ferida, utilizando espátula, no intervalo de 24/24 horas, por 20 dias consecutivos.

#### **IV.3.4- APLICAÇÃO DO LASER**

Foi realizada a aplicação do laser, utilizando o aparelho laser modelo Physiolum Dual da marca Bioset, In Ga P (Índio Gálio Fósforo): Laser diodo de emissão contínua (CW), 30mw de potência, com comprimento de onda de 670nm (vermelho visível), na forma de varredura sobre a ferida na dose de 4j/cm<sup>2</sup>, no intervalo de 24/24 horas por 20 dias consecutivos.

#### **IV.3.5- TRATAMENTO ORAL**

#### **IV.3.6- PREPARAÇÃO DA TINTURA**

As raízes da *Casearia sylvestris* Swartz foram lavadas com água destilada, colocadas, em seguida, sobre papel absorvente e secas com secador, permanecendo por 24h, a temperatura de 20°C, umidade abaixo de 60%. Pesaram-se 30 gramas de raízes que foram trituradas e colocadas em contato com uma solução hidroalcoólica de álcool cereais 40% para preparação do extrato. A solução ficou em repouso, no escuro, por 10 dias, sendo realizada uma agitação manual diária. A solução foi peneirada e filtrada. Alíquotas de 10, 20 e 30ml foram retiradas e administradas.

#### **IV.3.7- APLICAÇÃO DA TINTURA**

O biofármaco de uso oral na forma de tintura extrato glicólico da raiz da *Casearia sylvestris* Swartz nas concentrações de 10% (dose 1), 20% (dose 2) e 30% (dose

3) foi administrado por gavagem na dose de 0,2ml, no intervalo de 24/24horas por 20 dias consecutivos.

#### **IV.4- EUTANÁSIA DOS ANIMAIS**

Os animais foram anestesiados por Xilazina (2%), 10mg/Kg associada com Quetamina (10%), 100mg/Kg, via intramuscular no membro inferior, seguida da realização da punção cardíaca. A eutanásia foi realizada 12 horas, 3,7,15 e 20 dias após a indução cirúrgica da ferida.

#### **IV.5-AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO**

Após eutanásia realizada nos tempos programados, adotaram-se os procedimentos:

- . foi realizada a fotografia para a análise macroscópica da área da ferida;
- . o sangue coletado pela punção cardíaca foi utilizado para análise bioquímica e hematológica;
- .o tecido cicatricial formado foi retirado, utilizando lâmina de bisturi 21 e pinça, para as análises histológicas.

#### **IV.5.1- ANÁLISE MACROSCÓPICA**

Foi retirada a fotografia da ferida, logo após a eutanásia nos tempos programados, utilizando a máquina fotográfica digital, marca Samsung, modelo i70. As fotografias foram utilizadas para a avaliação clínica dos ratos, para o cálculo da área das feridas utilizando software Quantíporo (FERNANDES FILHO, 2001) e para o cálculo do percentual de contração da ferida utilizou-se a fórmula:

$$\text{Contração da ferida} = \frac{\text{área inicial} - \text{área do dia da medida}}{\text{área inicial}} \times 100 \quad (\text{AGREN et al, 1997})$$

#### **IV.5.2 – ANÁLISE HEMATOLOGICA**

Foi realizada a coleta sanguínea por punção cardíaca, o sangue colocado em tubo heparinizado de 5ml, para a realização da análise de parâmetros hematológicos; leucócitos global, linfócitos, granulócitos, eritrócitos e plaquetas, mensurados no contador automático de células Humacount-Human®.

#### **IV.5.3 - ANÁLISE BIOQUÍMICA**

O sangue armazenado no tubo heparinizado foi centrifugado na velocidade de 4000 rpm durante 15 minutos em um centrifugador excelsa 2, modelo 205N, marca Fanem Ltda, retirou-se o soro e foi realizada análise bioquímica para a determinação da Desidrogenase láctica utilizando o Kit K014, linha Crystal, marca Bioclin, da Asparto amino transferase(ASTou TGO) utilizando o Kit K048, linha Crystal, marca Bioclin, da Glicose, utilizando Kit glicose monoreagente K082-2, marca Bioclin, no autoanalisador mutiparamétrico Alize B.O, marca Lisabio.

#### **IV.5.4- ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Para a análise histológica, foi retirada a pele do processo cicatricial dos animais nos tempos 12 horas, 3<sup>o</sup> 7<sup>o</sup> , 15<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dia. A pele foi colocada em formol neutro tamponado 10%, e, nas primeiras 6 horas de fixação, foi recortada em fragmentos menores de aproximadamente 5mm de espessura e colocada novamente em formol por 24 horas. Decorrido esse tempo, os materiais foram desidratados em soluções crescentes de álcoois 70, 80, 90 e 100%, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e cortados em micrótomo de rotação na espessura de 5µm e estendidos em lâmina de vidro com polipec, sendo coradas 2 lâminas de cada animal: uma pela hematoxilina/eosina (H & E) e a outra pelo Tricrômico de Gomori nos tempos 7,15 e 20 dias; nos tempos 12 horas e 3 dias as lâminas foram coradas apenas com hematoxilina/eosina (H & E).

As lâminas foram fotografadas utilizando a câmera Olympus Q color 3 acoplada ao microscópio Olympus Rx60, a objetiva utilizada foi de 10X,20X e 40X, e o programa para capturar as imagens foi o Programa Q capture.

Foram realizadas seis fotografias seguidas de cada lâmina(fotografias 1,2,3,4,5 e 6), porém foram utilizadas para a contagem celular apenas as fotografias 1,3 e 5 para não haver contagem repetida de células. A contagem celular foi realizada utilizando as gradículas 100x100 no Programa Image Pro Plus.Foram contadas células que se encontravam nos pontos de intercessão na gradícula 100x100.

#### **IV.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foi utilizada a estatística descritiva para determinar as médias e desvios-padrões. Para verificar se houve diferença entre os tratamentos aplicados nos tempos

determinados, pré e pós a indução das feridas para as variáveis áreas da ferida inicial e final, Anova 10x5x2 com medidas repetidas sendo o primeiro fator constituído dos grupos (10 grupos), o segundo fator dos tempos de eutanásia (12h, 3, 7, 15 e 20 dias) e o terceiro fator da medida pré e pós. Para a contração da ferida, análises hematológicas (leucócitos globais, linfócitos, granulócitos, eritrócitos e plaquetas), análises bioquímicas (glicose, LDH e TGO), análises histológicas (neutrófilos, macrófagos e fibroblastos) utilizou-se o teste Anova 10x5 com medidas repetidas sendo o primeiro fator constituído dos grupos (10 grupos), o segundo fator dos tempos de eutanásia (12h, 3, 7, 15 e 20 dias). Para a análise histológica (neoformação capilar e colágeno) utilizou-se a ANOVA 10x4 com medidas repetidas sendo o primeiro fator constituído dos grupos (10 grupos), o segundo fator dos tempos de eutanásia (3, 7, 15 e 20 dias). Para a análise histológica (hemorragia), utilizou-se a ANOVA one way e, para a análise histológica (edema) utilizou-se a ANOVA 10x2 em que o primeiro fator foram os grupos (10 grupos), o segundo fator, os tempos de eutanásia (12 horas e 3 dias).

Precedendo a análise de variância, foi utilizado o teste de Levene para verificar a homogeneidade de variância e covariância. No caso de resultados significativos na análise de variância, foi utilizado o teste *post hoc* de Tukey para identificar as diferenças encontradas. O nível de significância foi de 0,05. O programa utilizado para a realização da análise estatística foi o Statistica 6.0, Stat Soft, Inc. 1984-2001.

## **V- RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **V.1 - AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS**

As lesões experimentais nos ratos foram avaliadas do ponto de vista clínico durante o processo de cicatrização.

Após a indução cirúrgica da ferida dérmica, todos os animais apresentaram uma hemorragia leve localizada na área da ferida que, segundo Mandelbaum (2003), é causada pela ruptura de vasos sanguíneos e extravasamento de seus constituintes, levando a uma imediata ação de mediadores oriundos da desgranulação de mastócitos causando uma vasoconstrição como a primeira resposta a injúria, disparando uma sequência de eventos como a deposição de plaquetas para a formação de um trombo, que provisoriamente, tampona a lesão endotelial que contém a hemorragia (FIGURA 12).

No tempo 12 horas cessada a hemorragia e já iniciado o processo de reparação tecidual: a fase inflamatória foi observada nas bordas das feridas de todos os animais hiperemia e edema, causados por eventos vasculares, como a vasodilatação, e pelo aumento da permeabilidade vascular (MOLLINEDO, 1999)(FIGURA13).

No tempo 3 dias, todos os nove grupos apresentaram uma crosta formada por proteínas do tecido desvitalizado, composto por colágeno, fibrina, elastina e restos celulares(DEALEY, 2001), tendo apresentado os grupos 4, 5, 6, 7, 8,9 e 10 que utilizaram pomada,crostas mais espessas. A crosta esta relacionada com o término do processo inflamatório na cicatrização(DEALEY,2001).Nesta fase, a hiperemia e o edema mantiveram-se nos grupos 3,4,5,8,9 e 10(FIGURAS 14,15 e 16).

No tempo 7 dias, o edema e a hiperemia desapareceram em todos os 9 grupos, tendo os grupos 2 e 3 apresentado crostas pouco espessas e os grupos 4,5,6,7,8,9e 10 permanecido com crostas mais espessas.Entre o sétimo e décimo quinto dia, a crosta presente em todos os grupos se despreendeu-se , apresentando a formação de um novo tecido, que, segundo Simões (1986),é protegido pela formação da crosta evitando contaminações(FIGURAS 17 e 18).

Os grupos 2 e 10 apresentaram 2 animais com cicatrização completa e o grupo 8 apresentou 1 animal com a cicatrização completa no tempo 15 dias(FIGURAS 19 e 20).

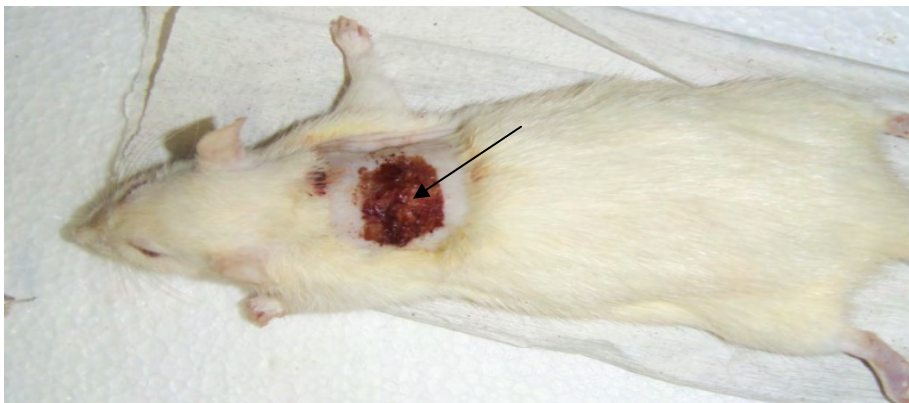
O processo de cicatrização completa ocorreu no vigésimo dia para os demais grupos, a pele apresentou folículos pilosos e a coloração manteve-se de pálida a rosada, já que a regeneração dos melanocitos é deficiente na cicatriz(JOHNSTON, 1990)(FIGURAS 21 e 22).



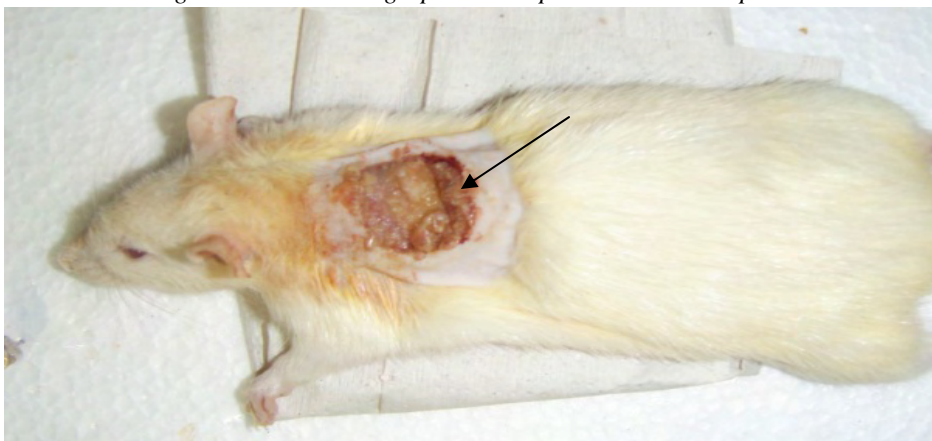
*Figura 12-Animal do grupo 2 após a indução cirúrgica da ferida-hemorragia.*



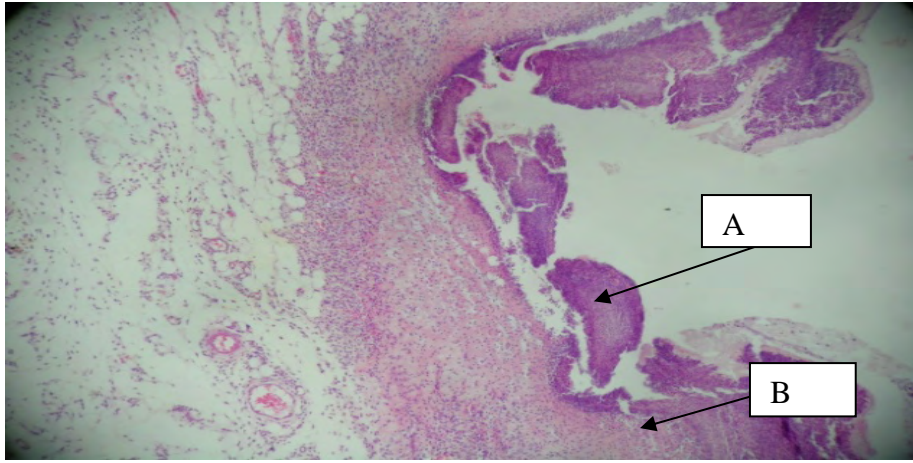
*Figura 13- Animal grupo 2, no tempo 12 horas- edema e hiperemia.*



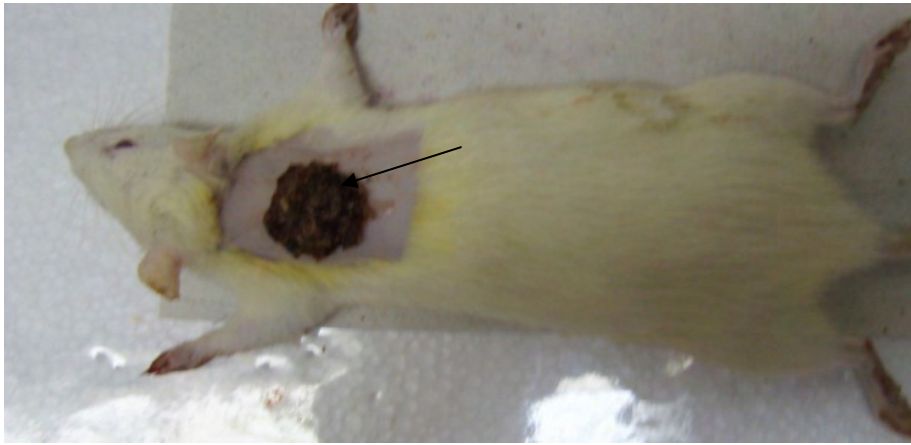
*Figura 14-Animal do grupo 5 no tempo 3 dias crosta espessa*



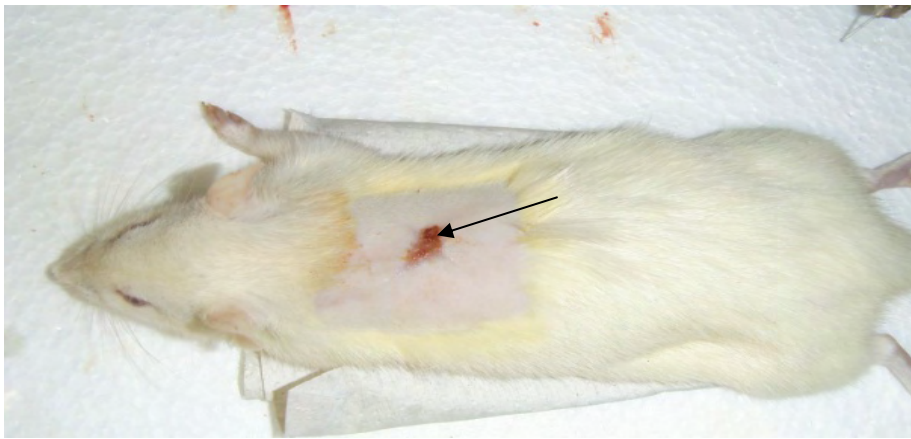
*Figura 15-Animal grupo 3 no tempo 3 dias-crosta fina.*



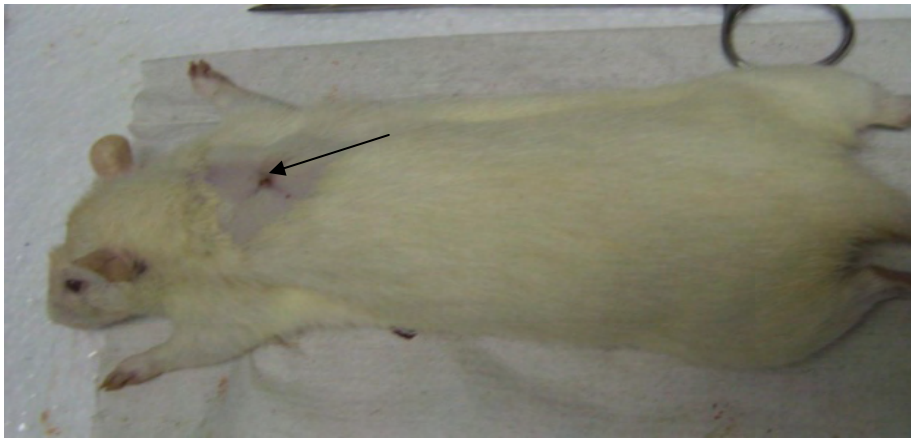
*Figura 16 - Animal do grupo 10 no tempo 3 dias-presença da crosta(A) e infiltrado inflamatório(B). Hematoxilina e Eosina, 10X.*



*Figura 17-Animal do grupo 6 no tempo 7 dias-crosta espessa.*



*Figura 18- Animal do grupo 6 no tempo 15 dias-novo tecido*

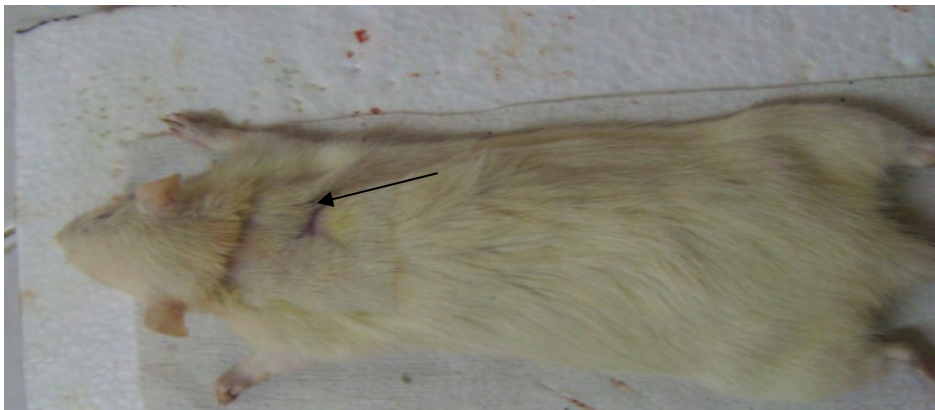


*Figura 19*

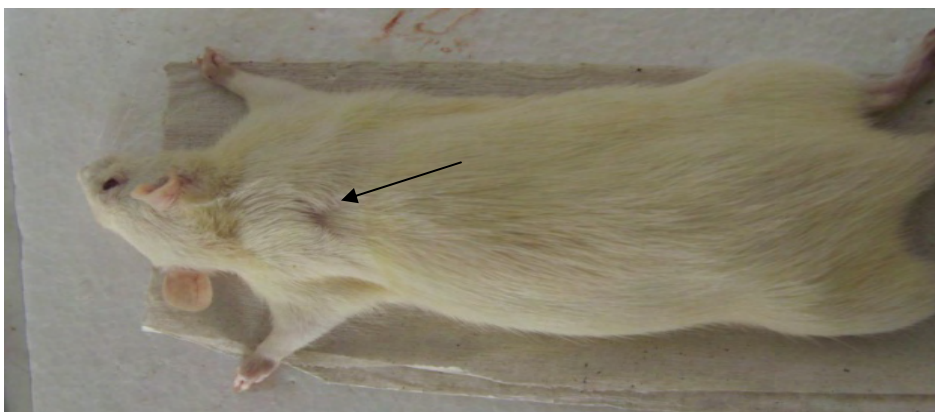


*Figura 20*

*Figura 19 e 20-Animal do grupo2 e 10 no tempo 15 dias-Cicatrização completa*



*Figura 21*



*Figura 22*

*Figura 21 e 22-Animal do grupo 7 e 10 no tempo 20 dias-Cicatriz*

## V.2 – ÁREA DAS FERIDAS

Os resultados estatísticos referentes à área das feridas encontram-se na Tabela 3 e estão representados na Figura 23.

**Tabela 3- Média e desvios-padrões da área Inicial/Final das feridas.**

Grupos (n=15)	Parâmetro área Inicial/Final das feridas (cm <sup>2</sup> )									
	X±SD									
	12hs – 0hs		3dias – 0hs		7dias – 0hs		15 dias – 0hs		20dias – 0hs	
Grupo 1 (controle negativo)	0±0	1±	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Grupo 2 (controle positivo)	3,6±0,7	3,8±0,7	2,2±0,4	3,9±0,9	1,4±0,5	3,6±0,6	0±0	3,3±0,6	0±0	3,2±0,6
Grupo3 (laser)	3,4±0,8	3,4±0,1	2,7±0,8	3,4±0,4	1,1±0,2	3,7±0,4	0,1±0,1	4,1±0,3	0±0	3,4±0,4
Grupo4 (Pomada 5%)	4±1	3,8±1,5	3±1	3,6±0,5	1,7±0,7	3,3±0,8	0,1±0	3,8±0,3	0±0	4±0,1
Grupo 5 ( Pomada 10%)	4,8±0,9	4,6±0,9	4,3±0,5	4,4±0,4	1,8±0,9	3,1±0,5	0,4±0,3	3,9±0,1	0±0	3,1±1,1
Grupo 6 (Pomada 20%)	3,3±0,6	3,3±0,7	3,5±0,9	3,6±0,1	2,2±0,3	3,9±0,1	0,1±0	3,8±0,1	0±0	4,6±1,2
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	4,6±0,4	3,8±0,7	4,2±1,6	3,6±0,3	2,1±0,1	3,6±0,3	0,2±0	3,8±0,2	0,1±0,1	4,8±0,1
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	4,1±0,7	4,1±0,5	4,1±0,3	4,1±0,4	2,5±0,3	3,5±0,4	0,1±0,1	3,2±0,5	0±0	3,2±0,5
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	4,1±1,2	3,4±0,1	4,5±0,8	4,2±0,4	2±0,4	3,6±0,9	0,3±0,3	3,6±0,2	0±0	3,3±0,4
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	4,2±0	3,4±0,3	3,7±1,2	4,2±0,7	2,7±0,6	3,7±0,9	0±0	3,7±0,8	0±0	3,2±0,5

a ferida induzida em ratos antes e após diferentes tratamentos em 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias  
F(36, 80)=3.4249, p=,00000

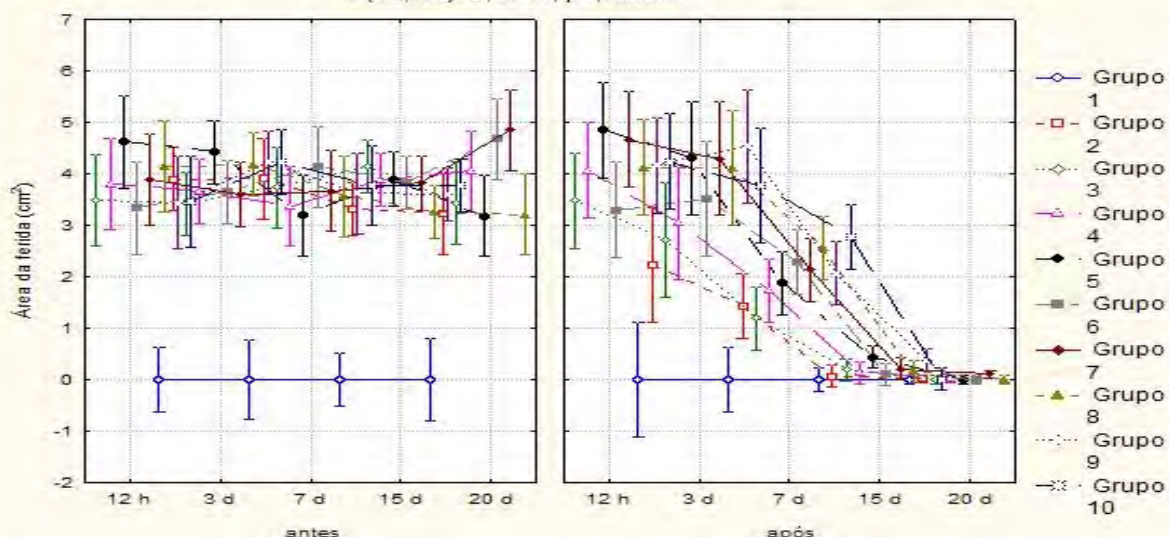


Figura 23 - Gráfico: Área Inicial e Final das Feridas.

Foram realizadas análises estatísticas distintas para a área inicial e final da ferida por estas possuírem valores iniciais distintos apresentados durante o cálculo da área pelo software Quantiporo e pelo fato de os animais serem distintos.

Para o tempo de 12 horas, os 9 grupos foram considerados estatisticamente idênticos em desempenho, diferindo nas médias dos grupos 4, 5,7,9 e 10 que apresentaram um aumento na área das feridas. Este aumento foi propiciado pela intensa movimentação dos animais no retorno da anestesia que gerou uma deformidade na pele, já que a mesma não havia sido fixada.

Para o tempo de 3 dias, os 9 grupos foram considerados estatisticamente idênticos.

Para o tempo de 7 dias, os 9 grupos foram considerados estatisticamente idênticos, demonstrando uma redução na área das feridas em todos os grupos.

Para o tempo de 15 dias os 9 grupos foram considerados estatisticamente idênticos, diferindo nas médias dos grupos 2 e 10 que apresentaram uma cicatrização completa das feridas.

Para o tempo de 20 dias, os 9 grupos foram considerados idênticos estatisticamente apresentando cicatrização completa das feridas.

Observando os resultados supracitados, pode-se inferir que o grupo 2 (controle positivo), que não recebeu terapêutica, apresentou um tempo de cicatrização semelhante ao grupo 10, que foi tratado com a Guaçatonga e laser, conotando ineficiência da terapêutica utilizada para acelerar o tempo fisiológico de cicatrização. Tal resultado corrobora os resultados obtidos por Scavone (1979) e Camargo (1995, 1996), com o uso da Guaçatonga, e por Medrado (2003), com o uso do laser, que observaram mudanças morfológicas favoráveis à resolução da ferida, porém estas não diminuíram o tempo de cicatrização.

### V.3 – CONTRAÇÃO DA FERIDA

Os resultados estatísticos referentes à contração das feridas encontram-se na Tabela 4 e estão representados na Figura 24.

**Tabela 4- Média e desvios-padrões do parâmetro contração da ferida**

Grupos (n=15)	Parâmetro contração da ferida				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
Grupo 2 (controle positivo)	0±0	0,004±0,001	0,006±0,001	0,009±0	0,009±0
Grupo3 (laser)	0,001±0,001	0,001±0,001	0,006±0	0,009±0	0,01±0
Grupo4 (Pomada 5%)	0,002±0	0,004±0	0,009±0	0,009±0	0±0
Grupo 5 ( Pomada 10%)	0±0	0,003±0 <b>A</b>	0,003±0,002	0,008±0,001	0,01±0
Grupo 6 (Pomada 20%)	0±0	0,001±0,001 <b>B</b>	0,004±0,001	0,009±0	0,01±0
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	0±0	0±0,001 <b>C</b>	0,003±0	0,009±0	0,009±0
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	0±0	0±0 <b>D</b>	0,002±0 <b>E</b>	0,009±0	0,01±0
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	0±0	0±0 <b>F</b>	0,003±0	0,008±0,001	0,01±0
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	0±0	0±0,001 <b>G</b>	0,002±0 <b>H</b>	0,009±0	0,01±0

**A** ( p=0,0041). **B** ( p = 0,0245). **C** ( p= 0,0100). **D** ( p=0,0041). **E** ( p=0,0245). **F** ( p=0,0017). **G** ( p=0,0100). **H** ( p=0,0245)

Intual de contração das feridas induzidas em ratos 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após diferentes tratamentos

F(36, 80)=9,6365, p=0,0000

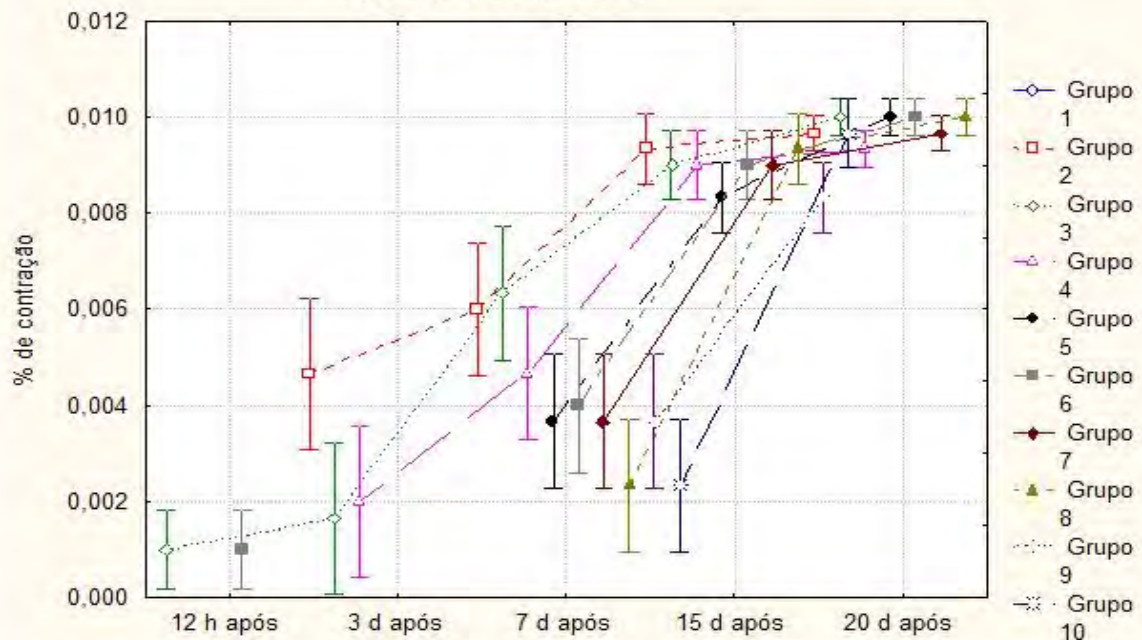


Figura 24 - Gráfico: contração da ferida.

Observando a contração da ferida para o tempo 3 dias, os grupos 2,3 e 4 foram considerados estatisticamente idênticos. Os grupos 5,6,7,8,9 e 10 apresentaram diferenças estatísticas significativas. As feridas dos animais dos grupos 7 e 9 apresentaram um aumento no valor da média da área no tempo 3 dias, ambos os grupos apresentaram resultados estatísticos significativos para a contração da ferida neste tempo, demonstrando uma intensa atividade celular causada pelas terapêuticas utilizadas.

Para o tempo de 7 dias, os grupos 8 e 10 mantiveram a diferença estatísticas quando comparados ao grupo-controle positivo, e os demais grupos foram considerados estatisticamente idênticos.

Camargo (1996) relatou que o uso do extrato hidroalcoólico de Guaçatonga inoculado apresenta resultados mais sugestivos que os apresentados por Scavone (1979), obtidos através do pincelamento de superfície de lesões com a tintura da Guaçatonga, pois constatou que a proliferação de fibroblastos, fibrócitos e vasos capilares neo-formados ocorreram de forma mais precoce, mais intensa e por um período mais prolongado de 4 a 9 dias após a indução das feridas. O grupo 8, tratado com a associação da tintura via oral e uso tópico na concentração de 10% apresentou resposta satisfatória na velocidade de cicatrização nos tempos de 3 e 7 dias, corroborando os resultados de Camargo(1996). O grupo 10, tratado com a associação do laser e uso tópico da Guaçatonga, apresentou resposta satisfatória na velocidade de cicatrização nos tempos 3 e 7 dias ; segundo Mirzaei(2007), a utilização do laser He Ne , 4j/cm<sup>2</sup> gerou um aumento significativo no número de fibroblastos na fase proliferativa. A proliferação fibroblástica encontrada pelos autores supracitados justifica uma velocidade maior de contração das feridas, pois a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenótipo para células produtoras de colágeno faz com que o processo de contração da ferida alcance a sua eficiência máxima. O miofibroblasto depositado nas margens das feridas começa a exibir características funcionais similares às das células do músculo liso, sendo alinhadas ao redor de depósito da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula a célula, gerando força de tensão resultando no movimento centrípeto para o fechamento da ferida (MAJNO, 1996).

Para os tempos 15 e 20 dias, os 9 grupos foram considerados estatisticamente idênticos. Pela análise destes resultados, pode-se inferir que o resultado clínico encontrado no tempo 15 dias para a área da ferida no grupo 10 deve-se aos resultados estatísticos significativos encontrados na contração da ferida nos tempos 3 e 7 dias, porém estes resultados mantêm o grupo 10 com a mesma área de ferida do grupo 2 que

apresenta o processo de cicatrização fisiológico, evidenciando que as terapêuticas utilizadas não aceleram o processo de cicatrização.

#### V.4 – PARÂMETRO HEMATOLÓGICO LEUCÓCITOS GLOBAL (WBC)

Os resultados estatísticos referentes ao parâmetro hematológico leucócitos global encontram-se na Tabelas 5 e estão representados na Figura 25.

**Tabela 5- Média e desvios-padrões do parâmetro hematológico WBC (leucócitos global)**

Grupos (n=15)	Parâmetro Hematológico WBC ( $10^3/\mu$ )				
	X $\pm$ SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	8,3 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 1,1	9,6 $\pm$ 2,1	14,1 $\pm$ 7,9	7,5 $\pm$ 2,2
Grupo 2 (controle positivo)	6,5 $\pm$ 1,5	6,6 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 1,9	8,0 $\pm$ 2,6
Grupo3 (laser)	5,9 $\pm$ 0,7	5,7 $\pm$ 0,8	8,7 $\pm$ 2,0	4,5 $\pm$ 2,0	6,7 $\pm$ 1,5
Grupo4 (Pomada 5%)	6,7 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 1,5	4,8 $\pm$ 1,2	8,5 $\pm$ 5,8
Grupo 5 (Pomada 10%)	5,9 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,3	8,2 $\pm$ 1,3	5,0 $\pm$ 1,1	4,9 $\pm$ 0,1
Grupo 6 (Pomada 20%)	5,6 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 1,9	3,9 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 1,2
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	4,9 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,7	4,8 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 1,1
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	4,6 $\pm$ 1,3	5,4 $\pm$ 0,8	7,4 $\pm$ 2,0	4,3 $\pm$ 1,2	5,4 $\pm$ 0,6
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	4,4 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 1,1	5,5 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 3,6	6,2 $\pm$ 1,2
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	4,5 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 3,7	9,0 $\pm$ 1,8	5,0 $\pm$ 1,2	8,6 $\pm$ 1,3

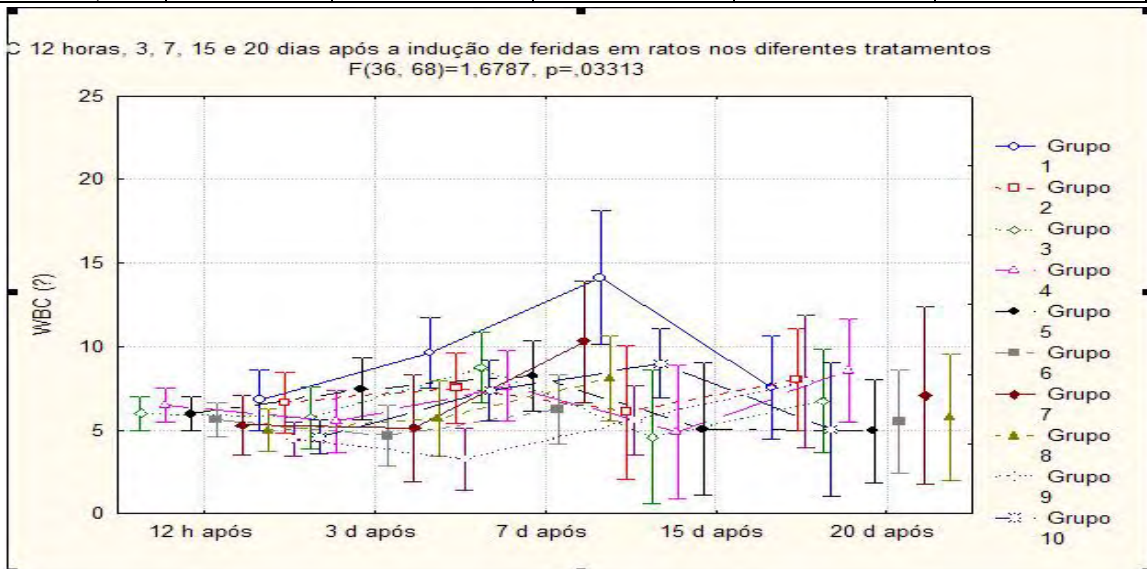


Figura 25- Gráfico: WBC.

Considerando o parâmetro hematológico de leucócitos global para os 10 grupos nos tempos de 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias foram considerados estatisticamente idênticos. Os valores das médias dos 10 grupos nos tempos de 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias mantiveram-se abaixo do valor-referência normal  $10,82 \pm 1,1310^3/\mu^l$  (SCHALM, 1974). O sangue é o principal meio de transporte dos neutrófilos que, por diapedese, atravessam as paredes das vênulas e capilares para se concentrarem no tecido lesado desempenhando funções defensivas. Considerando esta afirmativa de Junqueira (2004), entende-se que estes baixos valores das médias de leucócitos global dentre eles os neutrófilos dos 9 grupos no tempo de 12 horas, 3 e 7 dias, são devidos ao grande número de neutrofilos encontrados no tecido nos tempos de 12 horas, 3 e 7 dias, constituindo o tipo celular predominante no local da ferida nas primeiras horas, decrescendo em número com o passar dos dias.

## V.5- PARÂMETRO HEMATOLÓGICO LINFÓCITOS (LYM)

Os resultados estatísticos referentes ao parâmetro hematológico linfócitos (LYM) encontram-se na Tabela 6 e estão representados na Figura 26.

**Tabela 6- Média e desvios-padrões do parâmetro hematológico LYM (linfócitos)**

Grupos (n=15)	Parâmetro Hematológico LYM( $10^3/\mu$ )				
	X $\pm$ SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	5,2 $\pm$ 0,6	4,9 $\pm$ 1,2	7,1 $\pm$ 0,9	8,0 $\pm$ 4,6	5,8 $\pm$ 2,1
Grupo 2 (controle positivo)	3,3 $\pm$ 0,7	4,9 $\pm$ 0,2	5,8 $\pm$ 1,3	4,6 $\pm$ 1,2	6,0 $\pm$ 1,8
Grupo3 (laser)	3,3 $\pm$ 0,4	4,4 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 1,9	3,2 $\pm$ 1,5	5,4 $\pm$ 1,0
Grupo4 (Pomada 5%)	4,2 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,6	5,4 $\pm$ 1,5	3,5 $\pm$ 0,9	5,4 $\pm$ 2,4
Grupo 5 ( Pomada 10%)	3,0 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,1
Grupo 6 (Pomada 20%)	2,8 $\pm$ 0,6	3,4 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 1,1	2,8 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,9
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	2,0 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,3
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	2,0 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 1,8	2,3 $\pm$ 1,4	3,8 $\pm$ 0,6
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	1,7 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 1,9	4,4 $\pm$ 0,7
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	1,9 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 2,1	5,5 $\pm$ 1,1	3,0 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 0,5

em 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
F(36, 68)=1,6272, p=.04214

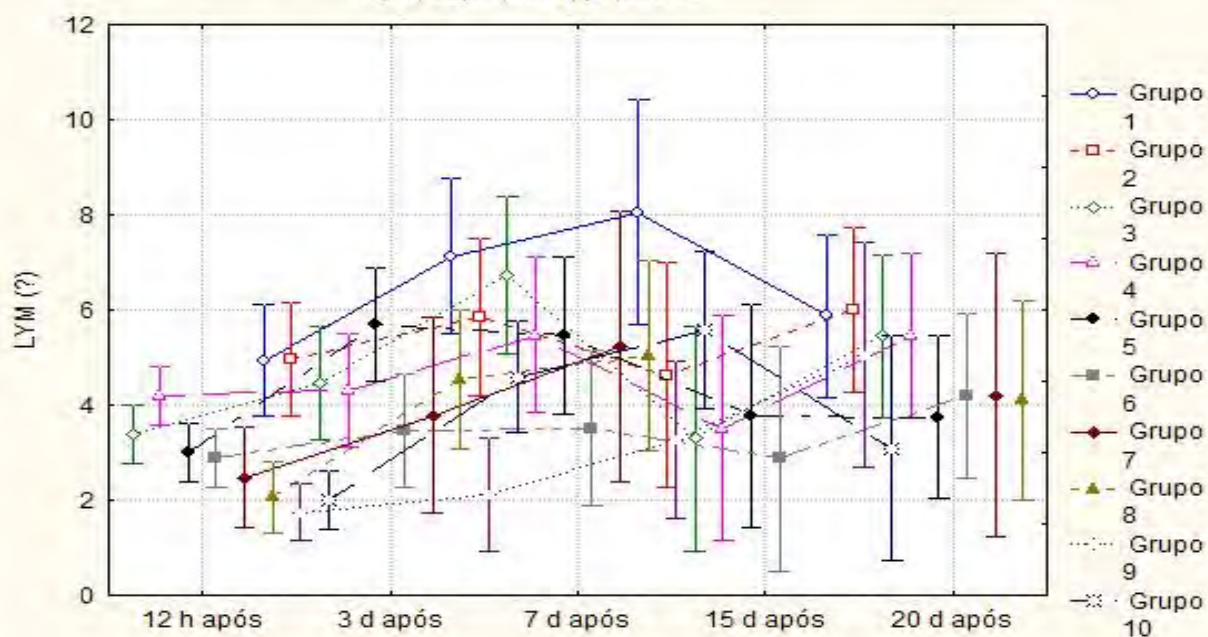


Figura 26-Gráfico: LYM

O parâmetro hematológico de linfócitos (LYM) para os 10 grupos nos tempos de 12 horas, 3,7,15 e 20 dias apresentou resultados estatísticos idênticos.

Os valores das médias dos 10 grupos nos tempos de 12 horas, 3,7, 15 e 20 dias mantiveram-se dentro do valor-referência normal  $9,3 \pm 1,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (SCHALM,1974), indicando que as feridas não estavam infectadas, embora os linfócitos tenham morfologia semelhante e, dependendo das moléculas localizadas em sua superfície, podem ser separados em dois grupos principais: linfócitos B e T e, ao contrário dos leucócitos, que não retornam ao sangue depois de migrarem para o tecido, os linfócitos voltam dos tecidos para o sangue recirculando continuamente, porém os linfócitos desempenham suas funções no tecido conjuntivo sendo responsáveis pelo funcionamento do sistema imunológico, as células B pela resposta imunológica de base humoral e as células T medeiam a resposta imunológica de base celular (JUNQUEIRA,2004).

## V.6 – PARÂMETRO HEMATOLÓGICO GRANULÓCITOS (GRAN)

Os resultados estatísticos referentes ao parâmetro hematológico granulócitos encontram-se na Tabela 7 e estão representados na Figura 27.

**Tabela 7 - Média e desvios-padrões do parâmetro hematológico GRAN (granulócitos)**

Grupos (n=15)	Parâmetro Hematológico GRAN( $10^3/\mu$ )				
	X $\pm$ SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	2,5 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 3,2	1,4 $\pm$ 0,2
Grupo 2 (controle positivo)	2,9 $\pm$ 1,1	1,5 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,3
Grupo3 (laser)	2,2 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,3
Grupo4 (Pomada 5%)	1,9 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 3,3
Grupo 5 ( Pomada 10%)	2,6 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,2
Grupo 6 (Pomada 20%)	2,4 $\pm$ 0,7	1,1 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,1
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	2,4 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 1,1	1,9 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	2,1 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,4	1,18 $\pm$ 0,35
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	2,3 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 1,3	1,3 $\pm$ 0,3
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	2,2 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 2,0	2,9 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,1

ntagem de granulócitos 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
F(36, 68)=1,5636, p=,05645

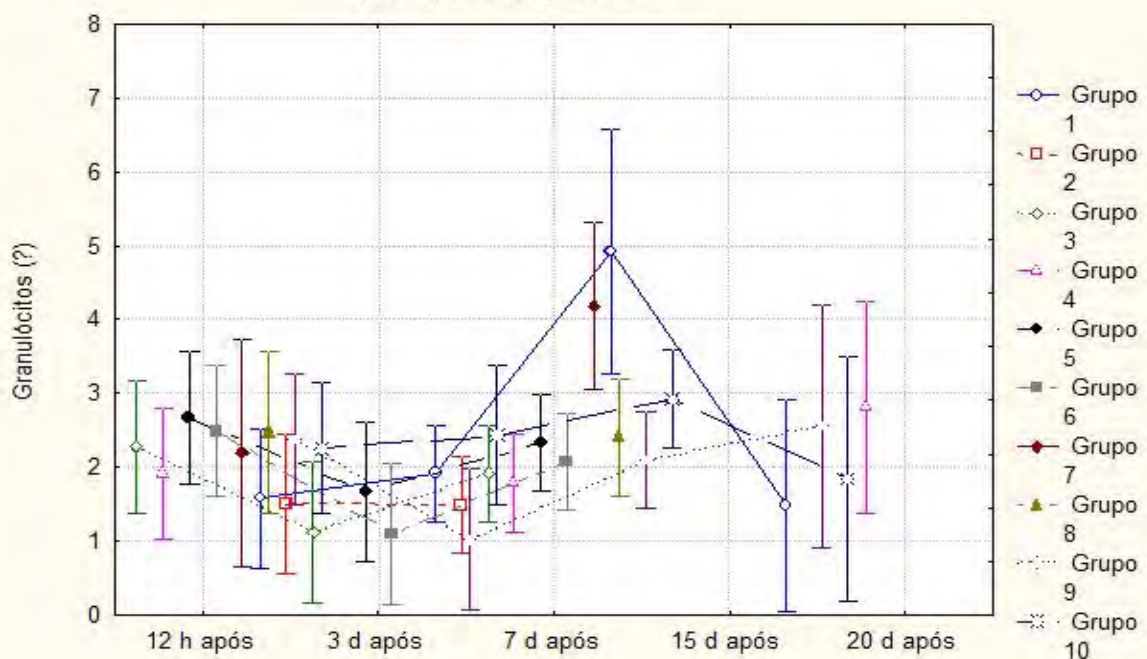


Figura 27-Gráfico: GRAN.

O parâmetro hematológico de granulócitos (GRAN) para os 10 grupos nos tempos de 12 horas, 3,7, 15 e 20 dias mostrou-se estatisticamente idêntico.

Para o tempo de 12 horas, as médias dos grupos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8,9 e 10 apresentaram valores superiores aos valores encontrados nos demais tempos, porém estes valores se encontraram dentro do valor-referência normal  $8,2 \pm 1,2 \cdot 10^3/\mu^l$ .(SCHALM,1974) O aumento dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) no tempo de 12 horas ocorre por constituírem 50% das células migradas para o local formando uma barreira contra a invasão de micro-organismo e fagocitando os detritos celulares(BANKS,1992), nos primeiros momentos da lesão , além de ser uma das principais fontes não só de substâncias quimiotáticas mas também de fatores de crescimento e citocinas no local da ferida, mantendo, assim,o afluxo das células inflamatórias no tempo avaliado(CHANG,2000).

O grupo 4 apresentou valor de média para o parâmetro hematológico granulócitos elevado no tempo de 20 dias, quando comparado aos demais grupos.Segundo Scavone (1979), o contato de certos componentes existentes na Guaçatonga a intimidade tissular apresenta-se como um fator irritante e agente prolongador do processo inflamatório justificando o elevado número de células inflamatórias neste tempo.

## V.7- PARÂMETRO HEMATOLÓGICO ERITRÓCITOS (RBC)

Os resultados estatísticos referentes ao parâmetro hematológico eritrócito encontram-se na Tabela 8 e estão representados na Figura 28.

**Tabela 8- Média e desvios-padrões do parâmetro hematológico RBC (eritrocitos)**

Grupos (n=15)	Parâmetro Hematológico RBC ( $10^3/\mu$ )				
	X $\pm$ SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	7,3 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,4	9,6 $\pm$ 0,4	9,1 $\pm$ 0,1
Grupo 2 (controle positivo)	8,8 $\pm$ 0,9	7,2 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 0,2	8,6 $\pm$ 0,5
Grupo3 (laser)	8,5 $\pm$ 0,3	8,0 $\pm$ 0,5	8,5 $\pm$ 0,4	7,1 $\pm$ 1,7	7,8 $\pm$ 0,6
Grupo4 (Pomada 5%)	8,1 $\pm$ 0,8	7,9 $\pm$ 0,3	7,7 $\pm$ 0,2	8,5 $\pm$ 0,3	7,9 $\pm$ 0,0
Grupo 5 (Pomada 10%)	8,0 $\pm$ 0,5	7,6 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,4	8,2 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,1
Grupo 6 (Pomada 20%)	8,3 $\pm$ 0,7	8,1 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,3	8,6 $\pm$ 0,5	8,1 $\pm$ 0,4
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	7,9 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 0,0	7,9 $\pm$ 0,1	8,5 $\pm$ 0,8	8,0 $\pm$ 0,6
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	8,3 $\pm$ 0,4	7,6 $\pm$ 0,5	7,9 $\pm$ 0,8	8,2 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,5
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	8,5 $\pm$ 0,2	8,4 $\pm$ 0,7	8,2 $\pm$ 1,1	7,9 $\pm$ 0,3	8,6 $\pm$ 0,1
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	8,2 $\pm$ 0,9	7,5 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,4	7,5 $\pm$ 2,1	8,1 $\pm$ 0,1

Contagem de eritrócitos 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
F(36, 68)=1,6052. p=,04667

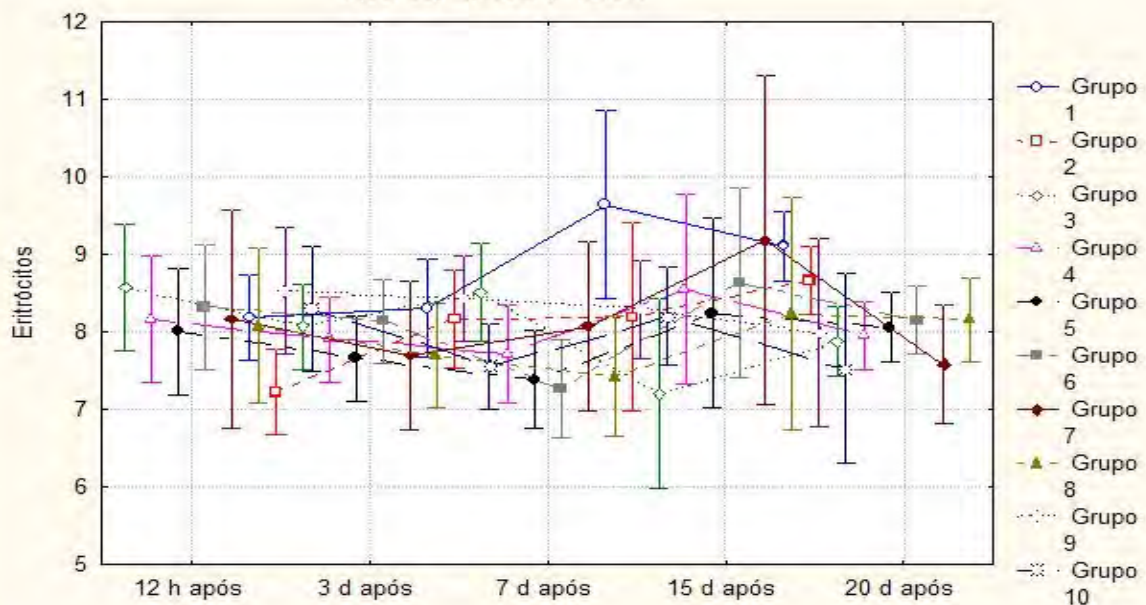


Figura 28-Gráfico: RBC

O parâmetro hematológico de eritrócitos (RBC) para os 10 grupos nos tempos de 12 horas, 3,7,15 e 20 dias foi considerado estatisticamente idêntico.

Os valores das médias dos 10 grupos mantiveram-se estáveis dentro do valor-referência normal  $9,8 \pm 0,20 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ (NAVARRO, 2005), nos tempos de 12horas, 3,7,15 e 20 dias, facilitando por todas as fases da cicatrização as trocas gasosas (JUNQUEIRA,2004).

Os eritrócitos (hemácias), ao penetrarem na corrente sanguínea , vindos da medula óssea vermelha onde são formados contêm ainda certa quantidade de ribossomos e a molécula de hemoglobina(proteína conjugada com ferro).Nos pulmões onde a pressão de oxigênio é alta, cada molécula de hemoglobina combina-se com 4 moléculas do oxigênio , esta combinação é reversível,sendo o oxigênio transferido para os tecidos lesados em que a pressão de oxigênio é baixa(JUNQUEIRA,2004).

## V.8- PARÂMETRO HEMATOLÓGICO PLAQUETAS

Os resultados estatísticos referentes ao parâmetro hematológico plaquetas encontram-se na Tabela 9 e estão representados na Figura 29.

**Tabela 9- Média e desvios-padrões do parâmetro hematológico PLT (plaquetas)**

Grupos (n=15)	Parâmetro Hematológico PLT ( $10^3/\mu$ )				
	X $\pm$ SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	1394,6 $\pm$ 294,0	1453,3 $\pm$ 691,0	6424,6 $\pm$ 4993,6	1141 $\pm$ 929,4	806,3 $\pm$ 17,61
Grupo 2 (controle positivo)	4014 $\pm$ 5191,5	1733 $\pm$ 2502	9772 $\pm$ 3828,3	1382 $\pm$ 1577,3	920 $\pm$ 951,3
Grupo3 (laser)	2406,3 $\pm$ 2854,1	1754,6 $\pm$ 363,8	8558 $\pm$ 46,66	1788,3 $\pm$ 415,5	705 $\pm$ 87,74
Grupo4 (Pomada 5%)	1641,6 $\pm$ 782,8	1736 $\pm$ 864,8	670,5 $\pm$ 26,16	2164 $\pm$ 678,5	890 $\pm$ 235,5
Grupo 5 ( Pomada 10%)	1532 $\pm$ 593,1	1790,3 $\pm$ 371,8	4426 $\pm$ 5243,9	2298,3 $\pm$ 892,1	1062,3 $\pm$ 244,60
Grupo 6 (Pomada 20%)	8567,3 $\pm$ 1429,5	2051,3 $\pm$ 387,8	9619,6 $\pm$ 438,2	2430,3 $\pm$ 317,0	1187,6 $\pm$ 657,1
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	655 $\pm$ 1,4	1594,3 $\pm$ 488,1	9999 $\pm$	2207 $\pm$ 404,4	6511,6 $\pm$ 3165,3
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	2427,6 $\pm$ 2348,3	1934 $\pm$ 857,6	5542,3 $\pm$ 3574,5	2143 $\pm$ 1466,5	2795,3 $\pm$ 417,0
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	2728,3 $\pm$ 1381,8	1847 $\pm$ 600,3	3042 $\pm$ 1692,8	3584,3 $\pm$ 1349,0	2168 $\pm$ 549,5
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	1489 $\pm$ 323,2	2134 $\pm$ 936,0	5566,3 $\pm$ 3922,7	3726,6 $\pm$ 2703,3	30196 $\pm$ 1435,0

ontagem de plaquetas 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
 $F(36, 56)=1,5942, p=,05745$

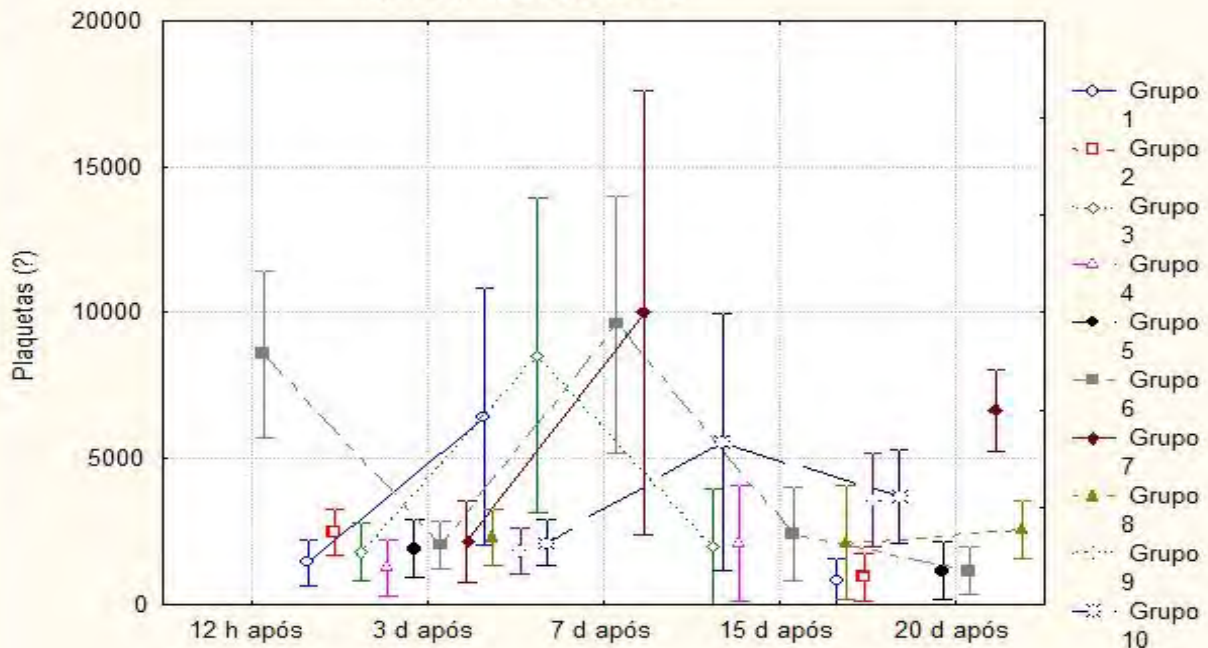


Figura 29-Gráfico: PLT.

O parâmetro hematológico de plaquetas (PLT) para os 10 grupos nos tempos de 12 horas, 3,7,15 e 20 dias foi considerado estatisticamente idêntico.

As médias dos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 grupos nos tempos de 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias apresentaram valores elevados, quando comparadas ao valor- referência normal  $1,125 \pm 123 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  (SCHALM,1974).As plaquetas promovem a coagulação do sangue , formação do trombo para a contenção hemorrágica minutos após a lesão tecidual e auxilia na neoformação capilar, liberando fibrinogênio e fator de crescimento plaquetário estimulando as mitoses no músculo liso dos vasos sanguíneos presentes nas fases finais do processo de reparo tecidual (JUNQUEIRA, 2004), daí o fato de os valores permanecerem elevado da referência normal ser benéfico para que ocorram as fases do processo de cicatrização.

## V.9 – PARÂMETRO BIOQUÍMICO GLICOSE

Os resultados estatísticos referentes ao parâmetro bioquímico glicose encontram-se na Tabela 10 e estão representados na Figura 30.

**Tabela 10 - Média e desvios-padrões do parâmetro bioquímico glicose**

Grupos (n=15)	Parâmetro bioquímico Glicose (mg/dl) X±SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	205,8±24,8	130,2±50,8	177,3±7,96	190,9±57,4	186,2±64,3
Grupo 2 (controle positivo)	208,4±60,3	90,2±31,6	178,1±30,5	94,4±15,23	170,8±15,9
Grupo3 (laser)	169,7±13,3	98,8±13,2	208,4±25,36	85,26±35,02	187,7±24,7
Grupo4 (Pomada 5%)	239,63±32,91	124,5±44,5	210,9±39,1	88,7±22,5	148,0±15,27
Grupo 5 (Pomada 10%)	219,2±51,21	72,06±48,09	111,5±33,10	130,6±66,35	173,1±19,1
Grupo 6 (Pomada 20%)	229,7±21,3	139,8±47,8	222,4±18,24	72,9±30,5	195,9±32,1
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	233,8±87,82	137,9±44,12	225,2±10,9	66,8±14,0	181,9±39,7
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	255,9±89,2	164,9±23,89	232,7±20,89	98,7±36,7	191,7±37,2
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	197,7±68,8	162,6±35,8	297,1±19,2	87,4±32,5	177,4±5,6
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	166,5±25,6	165,7±39,4	193,1±10,7	109,1±25,4	180,4±17,0

glicose 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
F(36, 68)=2,4341, p=,00079

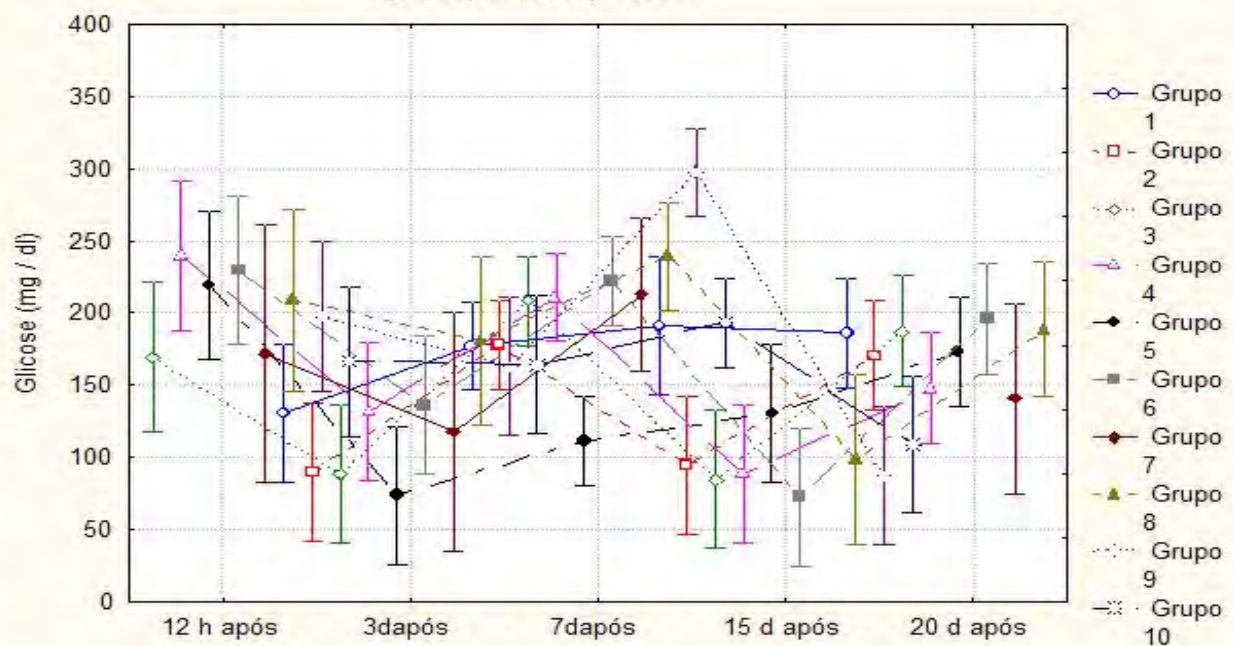


Figura 30- Gráfico: glicose.

O parâmetro bioquímico de glicose nos tempos mensurados de 12 horas, 3,7,15 e 20 dias dos 10 grupos foi considerado estatisticamente idêntico.

Para o tempo de 12 horas, as médias dos 10 grupos mantiveram-se elevadas, considerando o valor-referência normal de 114-143 mg/dl (THRALL, 2006).

Para o tempo de 3 dias houve um decréscimo no valor da média para os grupos 1,2,3,4,5,6 e7 que se mantiveram dentro do valor referência normal.Os grupos 8,9 e 10 mantiveram o valor da média elevado considerando o valor-referência normal.

Para o tempo de 7 dias, houve um aumento no valor da média dos grupos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10, apenas o grupo 5 permaneceu dentro do valor referência normal.

Para o tempo de 15 dias, os grupos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 e10 apresentaram valores das médias dentro do valor-referência normal, exceto o grupo 1 em que o valor da média permaneceu elevado, quando comparado ao valor referência normal.

Para o tempo de 20 dias, todos os 10 grupos apresentaram valores das médias elevados, quando comparados ao valor-referência normal.

Os elevados valores encontrados para o parâmetro bioquímico de glicose nos 10 grupos para os tempos de 12 horas, 7, 15 e 20 dias, caracterizam a intensificação do metabolismo da glicose para suprir o gasto energético das células inflamatórias, fibroblásticas, endotéliais e epiteliais mobilizadas no reparo tecidual (THRALL, 2006).

A glicose tem a função de fornecer energia, participa das vias metabólicas, além de ser precursora de outras importantes moléculas, sendo liberada em maior quantidade pelo fígado em resposta a injúria(THRALL,2006), e segundo Barbosa(2003), alterações metabólicas resultantes da liberação de mediadores inflamatórios e resposta hormonal induzidas por estresse e lesão proporciona um aumento da gliconeogênese.

## V.10 -PARÂMETRO BIOQUÍMICO LDH

Os resultados estatísticos referentes ao parâmetro bioquímico LDH encontram-se na Tabela 11 e estão representados na Figura 31.

**Tabela 11 - Média e desvios-padrões do parâmetro bioquímico LDH**

Grupos (n=15)	Parâmetro bioquímico LDH (UL)				
	X±SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	755±68,7	948,3±105,4	3586,6±756,7	8165,6±4649,1	738,6±220,0
Grupo 2 (controle positivo)	557±62	1293,6±687,4	2046±2644,9	2347,3±2424,0	815,3±222,9
Grupo3 (laser)	1192,3±290,2	828±6323	3434±2397,6	5333,6±3310,2	922±198,6
Grupo4 (Pomada 5%)	841,6±300,5	893,3±92,9	1108±372,5	1108±372,5	1941,6±1758
Grupo 5 ( Pomada 10%)	1064,6±113,4	3845,6±2948,1	5692,3±2038,4	2869,3±1883,9	2027,3±1671,6
Grupo 6 (Pomada 20%)	1081±252,4	1320±1313,9	10360±1720,5	2795,6±1637,3	1060,6±59,1
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	941±315,3	913,6±283,7	2148,6±2871,1	4133±2182,1	882,3±293,6
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	850±220,4	996,3±15,5	3184±4335,6	3945,5±2208,2	2046,3±1829,9
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	990,3±239,3	854,6±304	2777,3±2366	1863,6±480	831,3±287,3
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	594±110,2	597,4±421	1297±1307,3	1442±992,7	905±155,9

† 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
F(36, 68)=2,7650, p=.00015

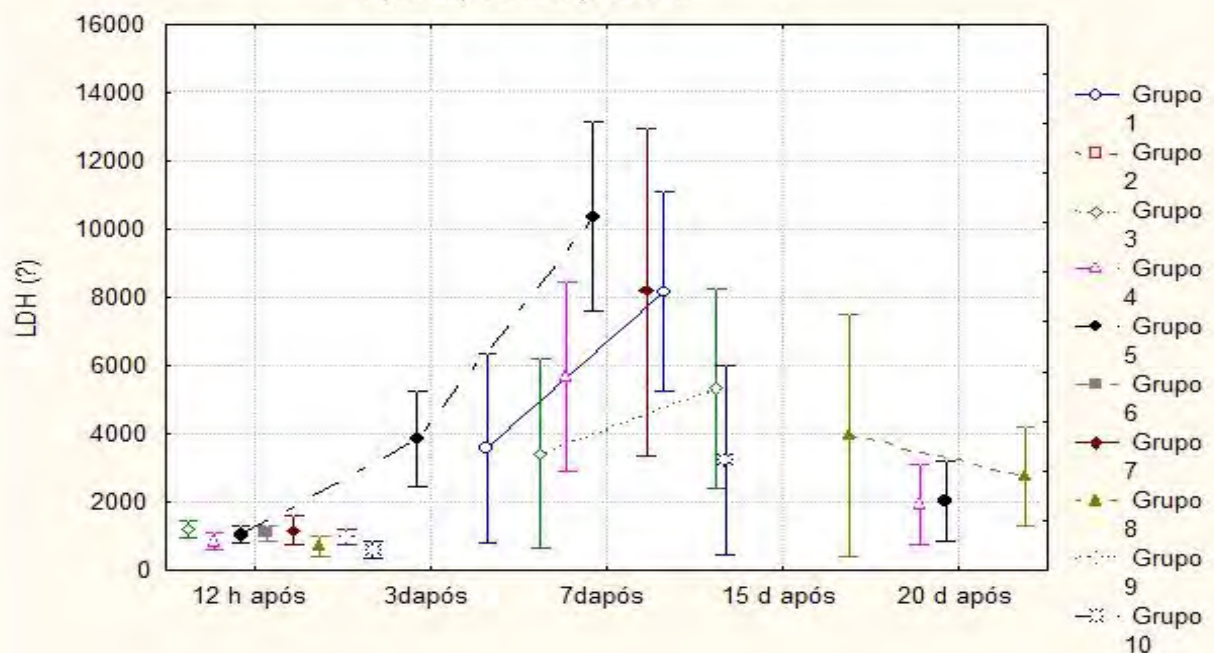


Figura 31- Gráfico LDH.

O parâmetro bioquímico desidrogenase lática (LDH) nos tempos mensurados de 12 horas, 3,7,15 e 20 dias dos 10 grupos foi considerado estatisticamente idêntico.

Para o tempo de 12 horas as médias dos grupos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 e 10 mantiveram-se elevadas, quando comparadas ao valor-referência normal 63-573 UL/L(THRALL, 2006), exceto o grupo 2, que apresentou valor da média dentro do valor-referência normal.

Para os tempos 3, 7,15 e 20 dias, as médias dos 10 grupos mantiveram-se elevadas, quando comparadas ao valor- referência normal.

Embora não tenham sido estatisticamente significativos, os resultados apresentam uma conotação clínica, no sangue a enzima desidrogenase lática catalisa a conversão de lactato a piruvato sendo liberada quando há dano celular e pode haver elevação nos níveis quando há hipóxia tecidual e inflamação (THRALL, 2006), justificando os valores elevados encontrados em nove grupos no tempo de 12 horas e nos 10 grupos nos tempos de 3,7,15 e 20 dias.

## V.11- PARÂMETRO BIOQUÍMICO TGO

Os resultados estatísticos referentes ao parâmetro bioquímico TGO encontram-se na Tabela 12 e estão representados na Figura 32.

**Tabela 12- Média e desvios-padrões do parâmetro bioquímico TGO**

Grupos (n=15)	Parâmetro bioquímico TGO (U/L)				
	X±SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	428,6±145,0	55,6±18,1	144,6±31	230,6±114,5	76,6±21,5
Grupo 2 (controle positivo)	299±39	70,3±16,2	116,6±19,5	108,6±30,8	87,33±7,5
Grupo3 (laser)	354,3±62,1	83,6±4,6	135,6±21,5	149,3±80,2	86±14
Grupo4 (Pomada 5%)	296±8,8	86,3±11,0	159±57,4	101,3±28,9	94±21,2
Grupo 5 ( Pomada 10%)	459±208,5	123±45,9	222±41,6	139±44,23	100,3±18,9
Grupo 6 (Pomada 20%)	428,3±77,5	105,3±28,9	108,3±40,6	136±17,6	85,3±
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	443±80,6	97±27,7	174,6±74,7	164±49,4	96,3±12
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	441,3±143,6	112,6±15,56	121±45,17	163,5±24,7	109,3±23,6
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	619±174,3 A	105,3±35,4	110±28,4	126±13,7	85±9,1
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	402,3±22	108,3±2,3	125±42	95,3±21,4	75,3±5,8

A (p= 0,1553)

12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
F(36, 68)=1,8034, p=,01827

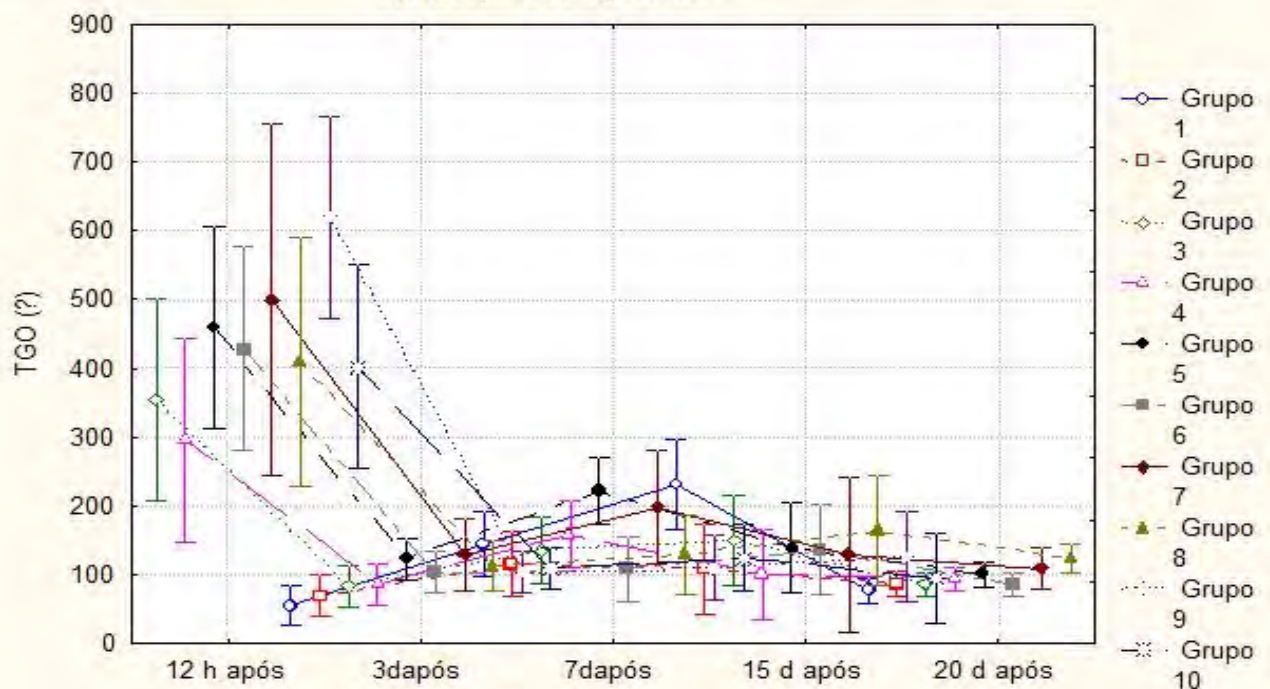


Figura 32- Gráfico TGO.

O grupo 9 no tempo de 12 horas apresentou resultado estatístico significativo quando comparado ao do grupo-controle positivo para o parâmetro bioquímico transaminase glutâmico-oxalacética ou aspartato aminotransferase (TGO). Os grupos 1,2,3,4,5,6,7,8,e10 foram considerados idênticos estatisticamente.

Para os tempos de 3, 7,15 e 20 dias, os 10 grupos foram considerados estatisticamente idênticos.

As médias dos 10 grupos para o parâmetro bioquímico de TGO mantiveram-se elevadas do primeiro ao último tempo avaliado quando comparadas ao valor referência normal 40-53 UI/L(THRALL, 2006).Os parâmetros bioquímicos: glicose, LDH e TGO mensurados no sangue dos animais durante o reparo tecidual apresentaram alterações estatísticas e clínicas consideráveis,revelando serem influenciados pelo processo de cicatrização.Dentre os estudos analisados, não se observaram relatos das atividades desses parâmetros no processo de cicatrização mesmo os autores consideram as fases do processo de cicatrização como uma sequência concomitante de eventos tissulares, celulares e bioquímicos.

Segundo Chrousos(2002), a exposição ao estresse por contenção leva a alterações comportamentais e metabólicas , num esforço de manter a homeostasia corporal e aumentar as chances de sobrevivência, justificando vários efeitos no organismo, como aumento da disponibilidade de substrato energético em diferentes partes do corpo, resposta imune, e adaptações às alterações do ambiente.

O estresse dos animais por contenção e o processo de cicatrização, mostraram modulações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos nos 10 grupos, inclusive o controle negativo durante todo o tempo do experimento.

## V.12- HEMORRAGIA

Os resultados estatísticos referentes à hemorragia encontram-se na Tabela 13 e estão representados na Figura 33.

**Tabela 13-Tabela de médias e desvios-padrões da hemorragia**

Grupos (n=15)	Parâmetro histológico Hemorragia
	X±SD 12hs
Grupo 1 (controle negativo)	0±0
Grupo 2 (controle positivo)	48±6,5
Grupo3 (laser)	46±0,2
Grupo4 (Pomada 5%)	38,6±12,2
Grupo 5 ( Pomada 10%)	27,6±2,5 <b>A</b>
Grupo 6 (Pomada 20%)	17,6±2,5 <b>B</b>
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	33,6±3,5
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	32,6±3,7
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	29,6±2,8 <b>C</b>
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	26,6±3,2 <b>D</b>

**A**, (p=0,0050), **B** (p=0,0020), **C** ( p= 0,0133), **D** (p=0,0030).

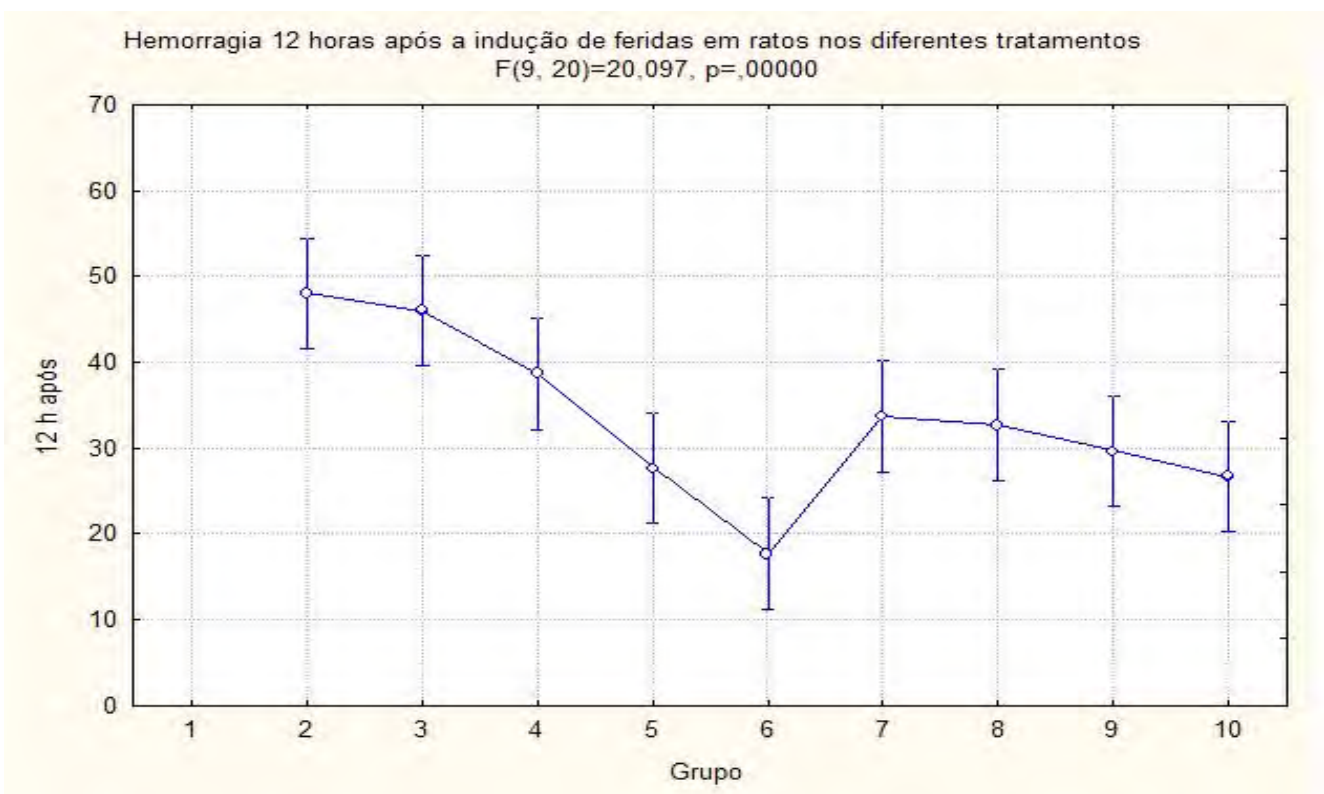


Figura 33—Gráfico: hemorragia.

Imediatamente após a indução cirúrgica das feridas, todos os animais apresentaram hemorragia e foram imediatamente tratados com a primeira dose da respectiva terapêutica. Os resultados no tempo de 12 horas demonstraram que os grupos 5, 6, 9 e 10 apresentaram diferença estatística significativa, quando comparados ao grupo-controle positivo. As médias foram menores no grupo 6, seguida dos grupos 9, 10 e 5, respectivamente. A atividade anti-hemorrágica da *Casearia* é descrita em estudos que avaliaram a sua ação antiofídica como o estudo de Borges (2001), que utilizou o extrato de folhas de *Casearia* e este inibiu as atividades hemorrágicas, proteolítica (fibrinolítica e caseinolítica) e coagulante de venenos de *Bothrops*. Segundo Raslan (2002), a ação da *Casearia* bloqueia a atividade da permeabilidade capilar, causando a inibição de atividades enzimáticas como as PLA2s, que são abundantes em venenos de cobras, atua na hidrólise de fosfolípidos e produz uma série de atividades tóxicas, como edema e efeito anticoagulante.

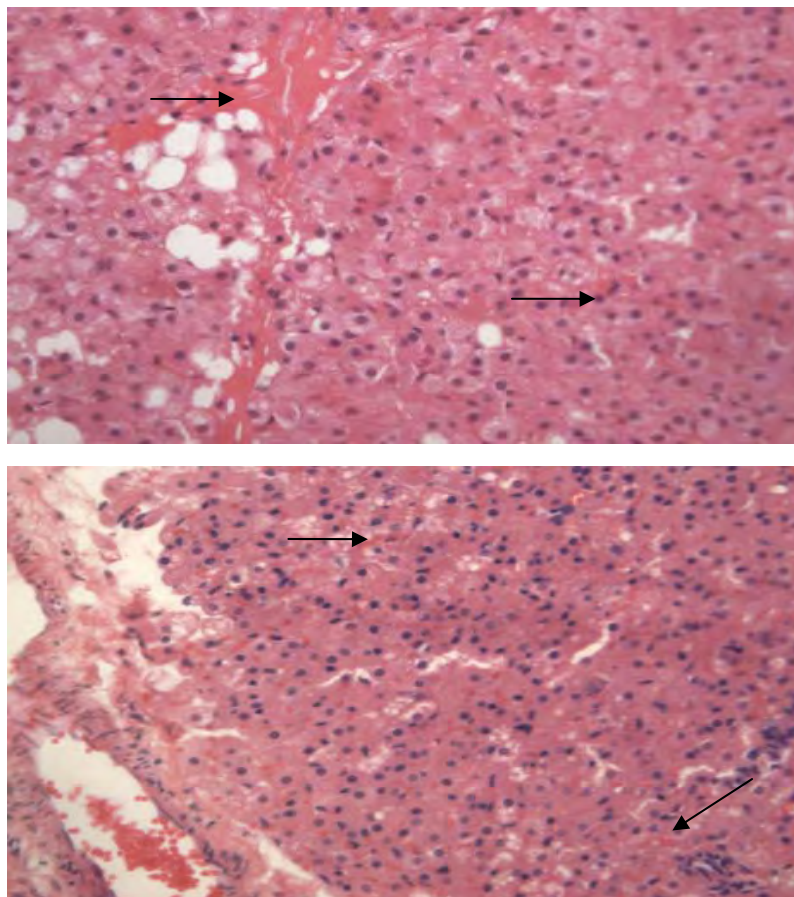


Figura 34 e 35 - Animal do grupo 2 e 6 no tempo 12 horas - extravasamento de hemácias no tecido-hemorragia. Hematoxilina e Eosina, 40X

## V.13- EDEMA

Os resultados estatísticos referentes ao edema encontram-se na Tabela 14 e estão representados na Figura 36.

**Tabela 14 – Tabela de médias e desvios-padrões do edema**

Grupos (n=15)	Edema X±S	
	12hs	3 dias
Grupo 1 (controle negativo)	0±0	0±0
Grupo 2 (controle positivo)	53,6±0,5 <b>A</b>	94±1,7 <b>B</b>
Grupo3 (laser)	42,6±2,5 <b>C</b>	70,6±1,1 <b>D</b>
Grupo4 (Pomada 5%)	61±1,7	84,3±1,5 <b>E</b>
Grupo 5 (Pomada 10%)	50,6±2,5	73±3
Grupo 6 (Pomada 20%)	70,3±3,2 <b>F</b>	90,6±1,5
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	47±2,6	93,6±1,1
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	73,6±4 <b>G</b>	75±4 <b>H</b>
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	37,6±1,5 <b>I</b>	68,3±1,1 <b>J</b>
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	20,6±0,5 <b>L</b>	71,6±1,5 <b>M</b>

**A**, (p= 0,0006), **B** (p= 0,0001), **C** ( p= 0,3789), **D**, ( p= 0,0024), **E** (p= 0,0001), **F** (p= 0,0001), **G** (p=0,0001), **H** (p= 0,0001), **I** ( p=0,0001), **J** (p=0,0001), **L** ( p=0,0001), **M** ( p= 0,0001).

Contagem de edema 12 horas e 3 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos

F(9, 20)=96,636, p=,00000

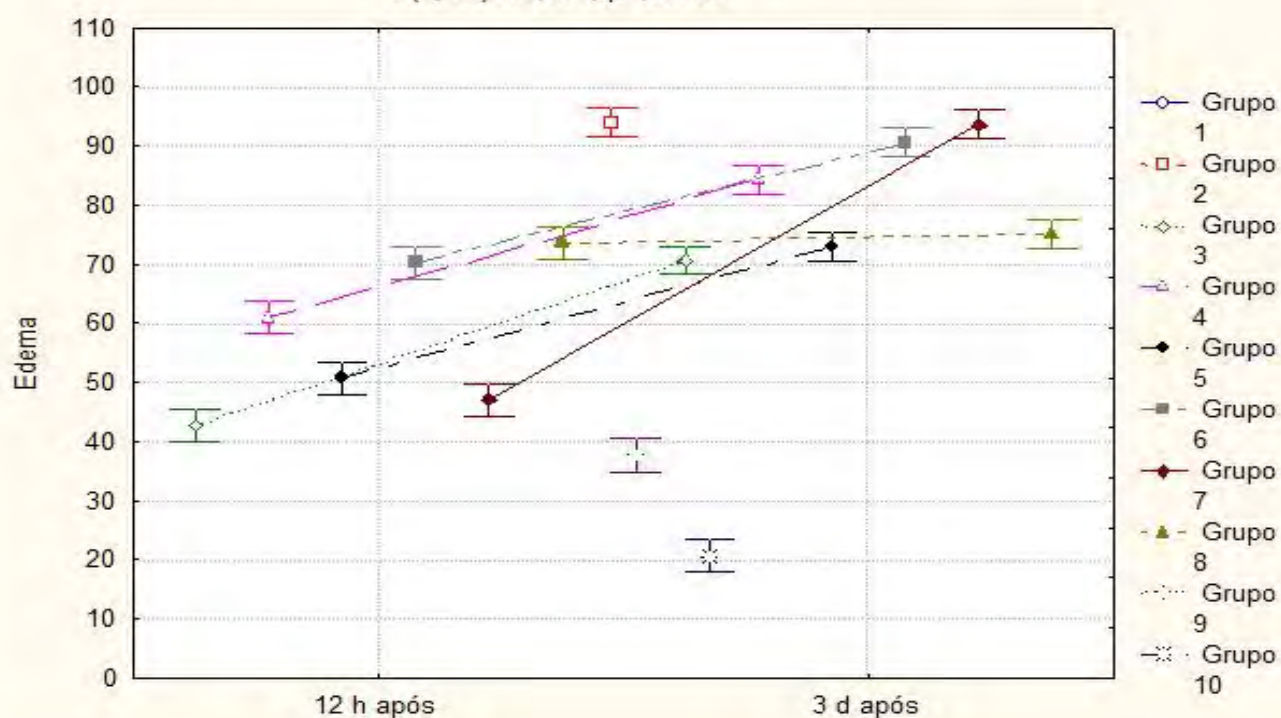


Figura 36 - Gráfico: Edema

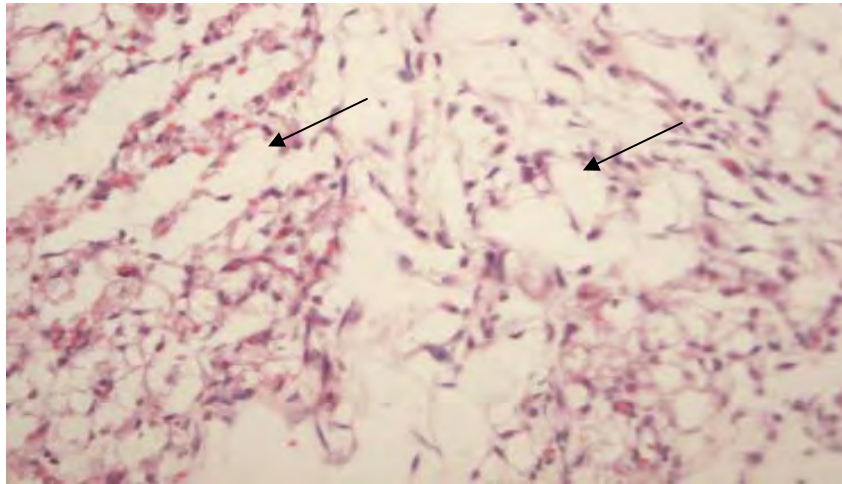
A observação clínica e a análise histológica demonstraram que todos os animais do experimento apresentaram edema nos tempos de 12 horas e 3 dias, em virtude do aumento da permeabilidade vascular do endotélio de vênulas por liberações de substâncias produzidas pelo organismo após agressões como a histamina, pelo desequilíbrio das forças que mantêm as trocas normais de fluidos( lei de Starling) e pelo aumento da pressão hidrostática vascular, resultando na exsudação de um fluido rico em proteínas para o espaço intersticial(JONES, 2000), caracterizado macroscopicamente por aumento do volume que cede facilmente por uma pressão localizada. Em cortes de tecidos,observam-se áreas com espaços aumentados resultantes do aumento de líquido entre os componentes do tecido conjuntivo(JUNQUEIRA,2004).

Os grupos 3,4,6,8,9 e 10 apresentaram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo-controle positivo no tempo de 12 horas.A média apresentada pelo grupo 10 tratado com a associação de laser e uso tópico de *Casearia* no tempo de 12 horas é a menor, quando comparada à dos demais grupos.Resultados obtidos por PUGLIESES (2003) demonstraram a eficiência do laser As Ga na redução de edema nos tempos de 24,48 e 72 horas após a indução de feridas em ratos.Borges (2000) classifica como mecanismo anti-inflamatório da *Casearia* a inibição da fosfolipase A<sup>2</sup> e Pereira (1990) relata o efeito bloqueador da permeabilidade capilar produzido pelo uso da *Casearia*.

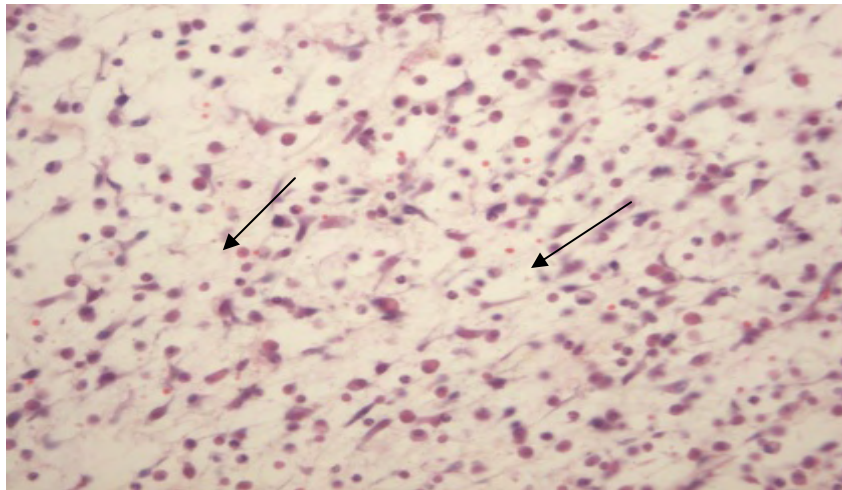
Todos os 9 grupos apresentaram o valor da média aumentado no 3° dia quando comparados as primeiras 12 horas.

No tempo de 3 dias, os grupos 3,4,5,8,9 e 10 mantiveram a diferença estatística significativa quando comparados à do grupo-controle positivo.

As médias dos grupos 3,9 e 10 foram menores quando comparadas demais grupos.



*Figura 37*



*Figura 38*

*Figura 37 e 38 – Animal do grupo 2 e 8 no tempo 3 dias- presença de espaços no tecido caracterizando a presença de líquido intersticial - edema. Hematoxilina e Eosina,40X.*

## V.14 – NEUTRÓFILOS

Os resultados estatísticos referentes à contagem de neutrófilos encontram-se na Tabela 15 e estão representados na Figura 39

**Tabela 15-Tabela de médias e desvios-padrões de neutrófilos**

Grupos (n=15)	Parâmetro histológico (neutrófilos) X±SD				
	12hs	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	1±	0±0	0±0	1,6±0,5	0±0
Grupo 2 (controle positivo)	34,6±1,5	20±1	7±1,7	1,6±1,5	2,6±0,5
Grupo3 (laser)	42±2,6 <b>A</b>	12±2 <b>B</b>	5,6±1,1	0,3±0,5	0±0
Grupo4 (Pomada 5%)	25,3±2 <b>C</b>	21,6±2	12,3±2,5	0±0	0±0
Grupo 5 ( Pomada 10%)	35,3±3,2	36,3±3,5 <b>D</b>	9,3±1,5	2±1	0±0
Grupo 6 (Pomada 20%)	26±1,7 <b>E</b>	7,6±1,5 <b>F</b>	9±1	1,6±1,1	5,3±1,1
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	36±3	13±1 <b>G</b>	13±2 <b>H</b>	4±1,7	0±0
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	29,6±2,8	6±1 <b>I</b>	23±3,6 <b>J</b>	0,3±0,5	0±0
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	33,6±1,1	18±3	6±1	0±0	0±0
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	27,3±1,5 <b>L</b>	13,6±2	13,6±2 <b>N</b>	20,3±1,1	0,3±0,5

**A** (p=0,0030), **B** (p= 0,0011), **C** (p=0,0002), **D** (p=0,0002), **E** (p=0,0004), **F** (p= 0,0002), **G** (p=0,0051), **H** (p= 0,2633), **I** (p=0,0002), **J** ( p= 0,0002), **L** (p=0,0030), **M** (p= 0,0153), **N** (p= 0,0002).

gem de neutrófilos 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias após indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos

F(36, 80)=52,684, p=0,0000

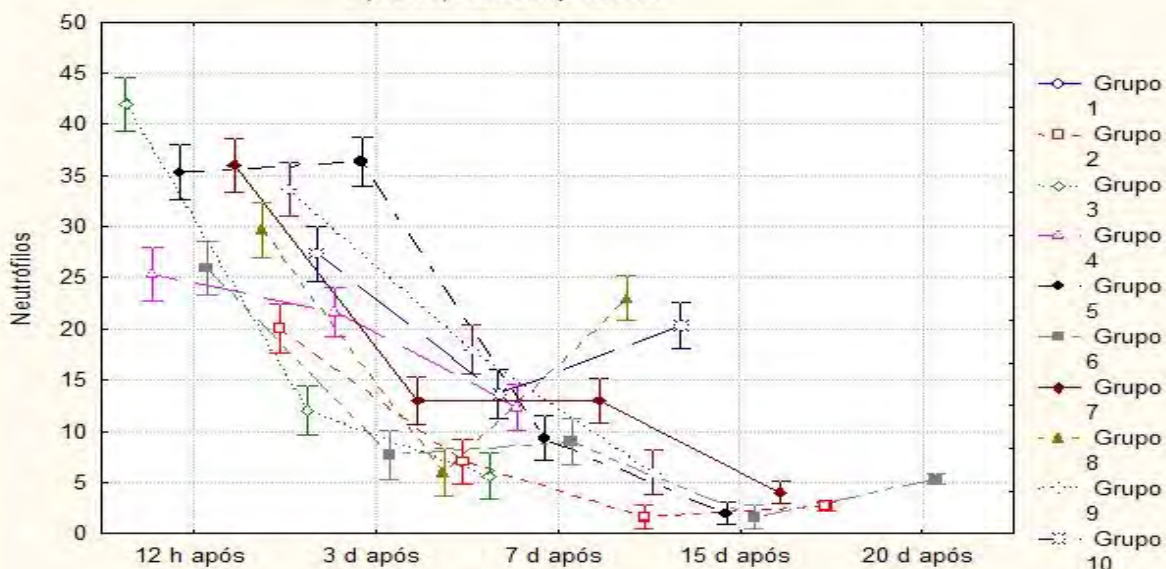


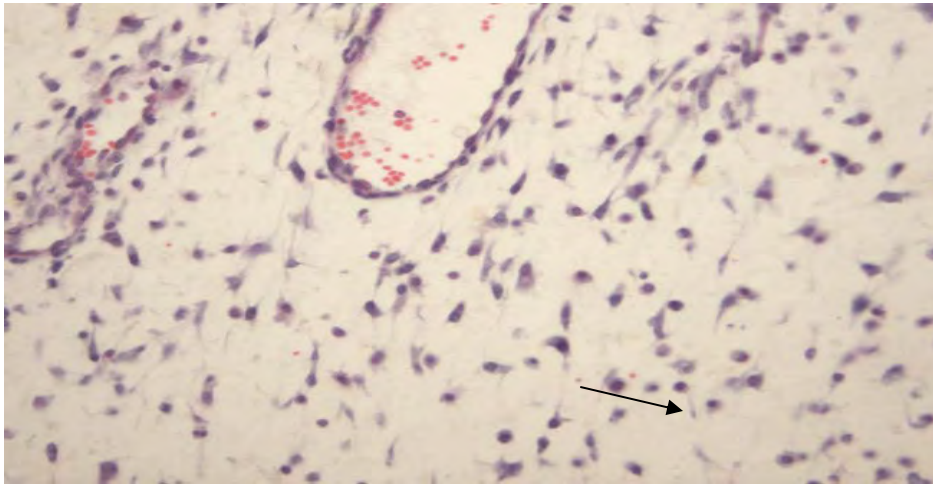
Figura 39- Gráfico: neutrófilos.

A análise histológica das amostras das feridas mostrou reação inflamatória de intensidade variável nos 9 grupos nos tempos de 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias.

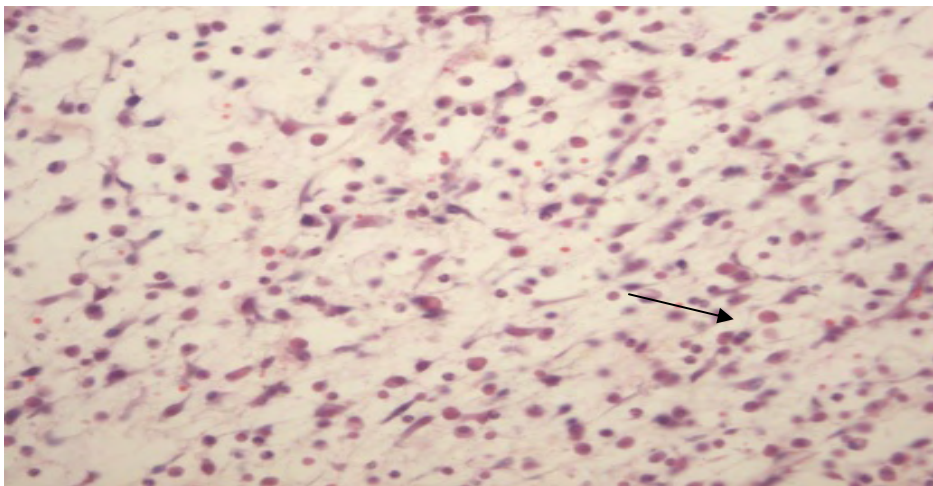
Para a contagem de neutrófilos no tempo de 12 horas, os grupos 3, 4, 6 e 10 apresentaram resultados estatísticos significativos, quando comparados aos grupo-controle positivo, indicando uma resposta inflamatória imediata e intensa caracterizada por uma aglomeração de células polimorfonucleares iniciada 6 horas após a lesão e desaparecendo aproximadamente no 3º dia. Estas células são responsáveis por fagocitar invasores e materiais estranhos no local da lesão, além de serem fontes de algumas citosinas pró-inflamatórias (CHANG,2000). No sítio da inflamação, neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio que são de vital importância na atividade microbicida e inflamatória destas células e estão intimamente envolvidas com as reações de formação de tecidos através da produção de fatores de crescimento e citocinas responsáveis pela recomposição de celularidade regional e restabelecimento homeostasia tecidual, proporcionando ambiente favorável para a sucessão de eventos celulares, tissulares e bioquímicos que acontecerão(MOLINEDO,1999).Ou seja a resposta inflamatória apresentou-se de maneira resolutiva, porém a duração prolongada desses eventos causa a cronicidade da inflamação.

No tempo de 3 dias, os grupos 3,5,6,7,8 e 10 apresentaram resultados estatísticos significativos quando comparados ao do controle positivo.

No tempo de 7 dias, os grupos 7,8 e 10 ainda apresentavam neutrófilos, indicando o laser e a Guaçatonga como terapêuticas prolongadoras da fase inflamatória . Segundo Viegas (2007), o laser não minimizou a reação inflamatória proveniente das feridas dérmicas induzidas em ratos, indicando, a necessidade do uso de anti-inflamatório nesta fase. Scavone (1979) relata que certos componentes existentes na Guaçatonga quando em contato com a intimidade tissular apresenta-se como irritante, portanto prolongador da ação inflamatória.A inflamação crônica é caracterizada pelo infiltrado de células mononucleares(macrófagos, linfócitos e plasmócitos) , destruição tecidual induzida pelos produtos de células inflamatórias e reparo envolvendo proliferação de novos vasos e fibrose(ROBBINS,2008).

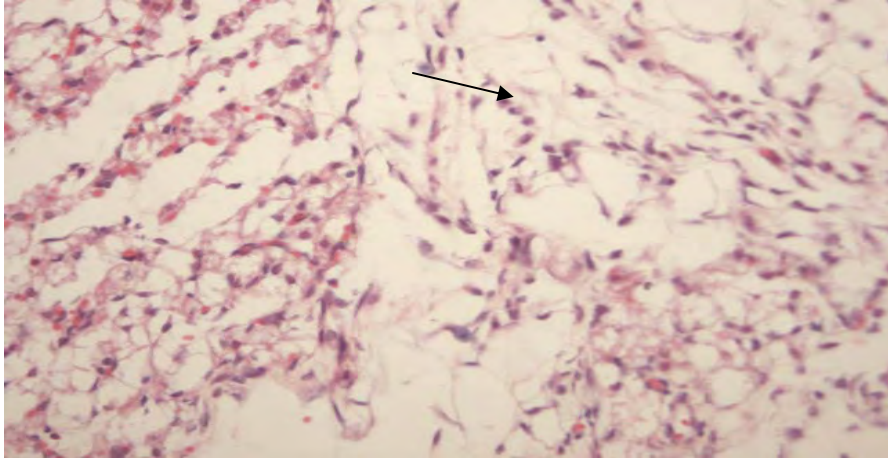


*Figura 40*

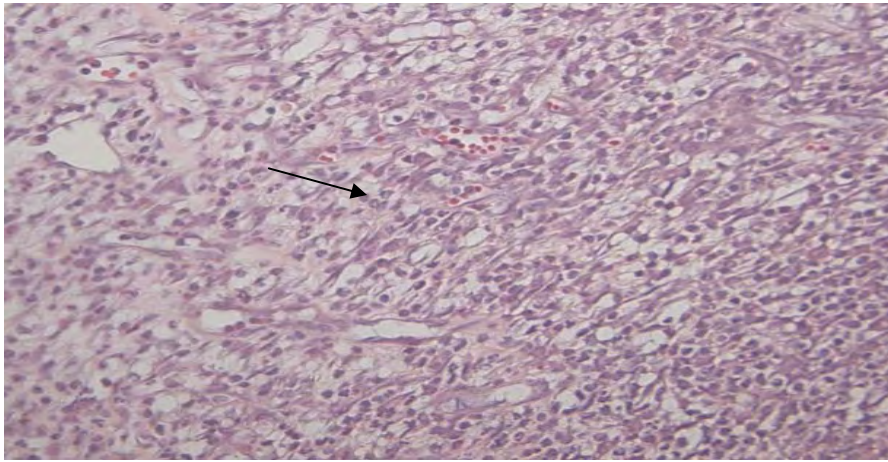


*Figura 41*

*Figuras 40 e 41 - Animais do grupo 2 e 5 no tempo 3 dias - infiltrado polimorfonuclear (neutrófilos).  
Hematoxilina e Eosina, 40X.*



*Figura 42*



*Figura 43*

*Figura 42 e 43 – Animais do grupo 2 e 7 no tempo 7 dias - infiltrado poliformonuclear (neutrófilos). Hematoxilina e Eosina, 40X.*

## V.15 - MACRÓFAGOS

**Tabela 16- Tabela de médias e desvios-padrões dos macrófagos**

Grupos (n=15)	Macrófagos				
	12hs	3 dias	7 dias	15 dias	20 dias
Grupo 1 (controle negativo)	0±0	0±0	1,6±1,1	0±0	0±0
Grupo 2 (controle positivo)	25,6±2,8	10±2	6±0	0±0	0±0
Grupo3 (laser)	27,3±1,5	23,3±3,5 <b>A</b>	0,3±0,5	1±0	5,6±0,5
Grupo4 (Pomada 5%)	18±3	9,6±2	6,3±1,1	1,6±1,5	0±0
Grupo 5 (Pomada 10%)	24,6±1,1	11±5,2	3,3±0,5	1,3±0,5	0±0
Grupo 6 (Pomada 20%)	16,3±1,1 <b>B</b>	2,6±2,5 <b>C</b>	0,3±0,5	3,3±2,5	0±0
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	23±1,7	2±1,7 <b>D</b>	5,6±0,5	0,6±1,1	0±0
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	25,3±1,1	1,6±1,5 <b>E</b>	11,6±0,5	0,3±0,5	0±0
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	29±2	7,3±2	2,6±0,5	3±2,6	0±0
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	20,6±0,5	10,6±4,9	6,3±0,5	0±0	0±0

**A**, ( P = 0,0002), **B** ( p= 0,0008), **C** ( p=0,1277), **D** ( p=0,0049), **E** ( p= 0,0030).

Quantidade de macrófagos 12 h, 3, 7, 15 e 20 dias após indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
 $F(36, 80)=23,939, p=0,0000$

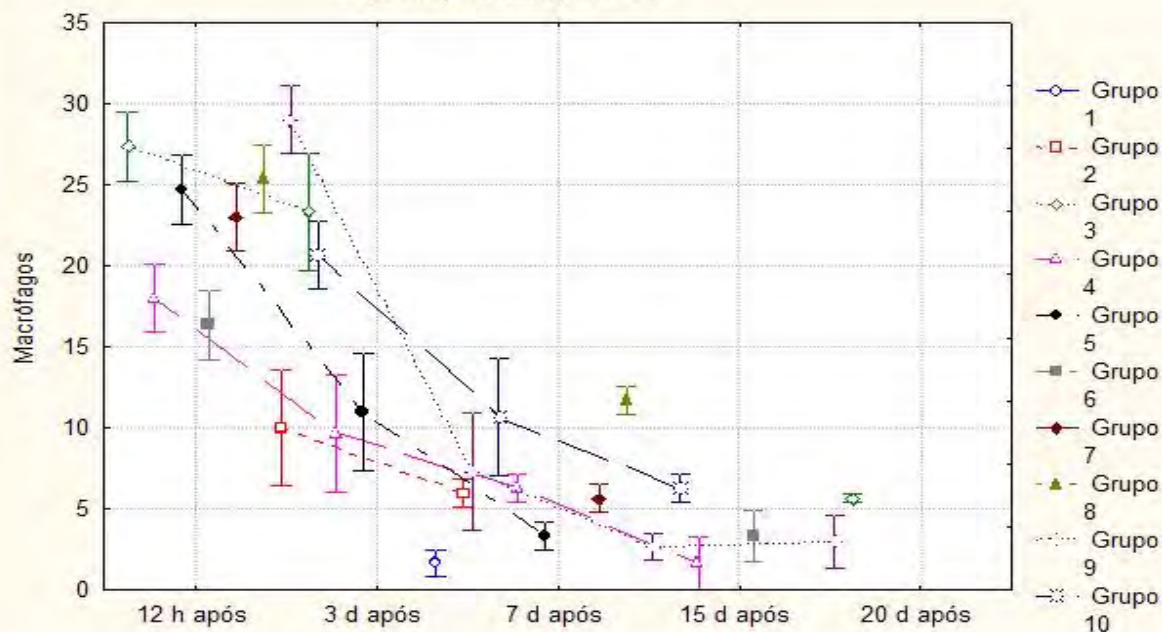
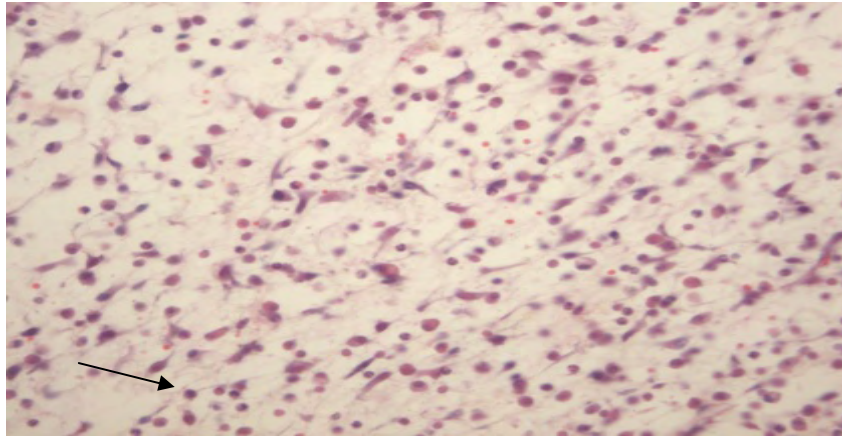


Figura 44 - Gráfico: macrófagos

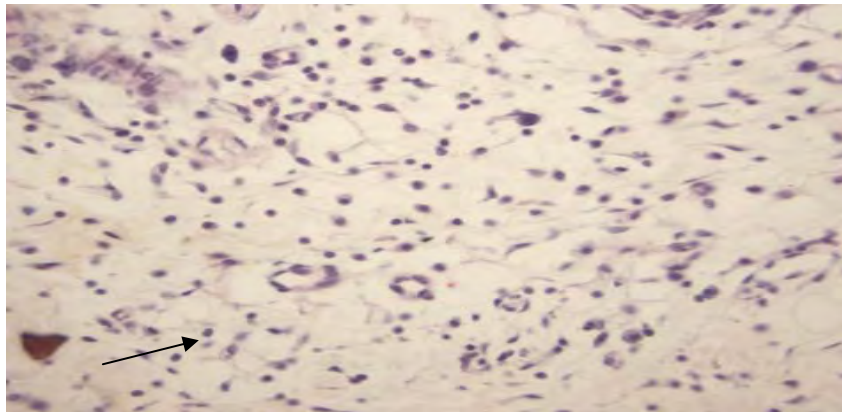
A avaliação histológica da contagem de macrófagos apresentou resultados estatísticos significativos no tempo 12 horas para o grupo 6 e no tempo 3 dias para os grupos 3,6,7 e 8. Na ferida a segunda célula de defesa encontrada é o macrófago derivado do monócito que apresenta características morfológicas que lhe conferem a ação de ajudar os neutrófilos na fagocitose de micro-organismos, detritos celulares, bem como na remoção de neutrófilos exauridos. Liberam, ainda, diversos fatores de crescimento e citocinas importantes na manutenção da resposta inflamatória, na iniciação, maturação e controle do processo de cura da ferida (BRASILEIRO FILHO, 1993). Os macrófagos estão presentes no local da ferida de 2 a 5 dias após a lesão, corroborando os resultados obtidos que apresentaram declínio nos valores com o passar dos dias. O grupo 8 no tempo de 7 dias manteve um resultado de média elevado quando comparado ao de outros grupos. E o grupo 3 manteve no tempo 20 dias o valor de média aumentado quando comparado ao dos demais grupos.

Os resultados estatísticos significativos para a contagem de neutrófilos e macrófagos demonstraram a presença destas células desde o tempo 12 horas até o 7º dia da lesão, caracterizando, juntamente com a presença da hemorragia, edema, hiperemia neste mesmo período, a resposta inflamatória do processo de cicatrização.

Os macrófagos são importantes para o recrutamento e ativação de fibroblastos produzindo citocinas que estimulam a sua proliferação, enzimas como colagenase e elastase, liberando fatores antimicrobianos como radicais de oxigênio e óxido nítrico, além de desempenharem papel importante no sistema imune, permitindo ligação entre a imunidade natural e a imunidade adaptativa (CHANG, 2000), contribuindo efetivamente para a continuidade do processo de cicatrização.



*Figura 45*



*Figura 46*

*Figura 45 e 46 - Animais do grupo 6 e 8 no tempo 3 dias-presença de macrófagos. Hematoxilina e Eosina, 40X.*

## V.16 – FIBROBLASTOS

Os resultados estatísticos referentes à contagem de fibroblastos encontram-se na Tabela 17 e estão representados na Figura 47.

**Tabela 17- Tabela de médias e desvios padrões dos fibroblastos**

Grupos (n=15)	Fibroblastos				
	12hs	3 dias	$\bar{X} \pm S$ 7 dias	15 dias	20 dias
Grupo 1 (controle negativo)	4,6±2	12,6±1,5	4,6±1,1	5±1	9,6±3
Grupo 2 (controle positivo)	5,6±0,5	7,3±1,5	12,3±0,5	20±1	20±13,8
Grupo3 (laser)	18,6±2,0 <b>A</b>	23±1,7 <b>B</b>	24±4	45,3±2 <b>C</b>	25,6±2,3
Grupo4 (Pomada 5%)	7±1	12±4	33±3 <b>D</b>	23±2,6	16,3±7,5
Grupo 5 (Pomada 10%)	11,6±0,5	13±1,7	24,6±3	13,3±1,5	11,3±1,5
Grupo 6 (Pomada 20%)	6,3±0,5	11,3±4	17,3±3,5	11,3±1,1	8,6±2,5
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	6,3±1,1	8,3±1,1	19,3±3,5	24±4	14,3±5,6
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	8,6±0,5	9,6±2,3	23,3±4,9	8,6±0,5	11,6±3,5
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	9,6±1,1	14,6±0,5	21,3±5,5	12,6±1,1	14±3,4
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	30,6±2 <b>E</b>	31,3±1,5 <b>F</b>	34,6±2 <b>G</b>	28±2,6	23,3±8

**A**, (p= 0,4700), **B** (P=0,0072), **C** (p= 0,0002), **D** (p= 0,0003), **E** ( p= 0,0002), **F** (p= 0,0002), **G** (p= 0,0002).

Contagem de fibroblastos 12 h , 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
 $F(36, 80)=7,2357, p=,00000$

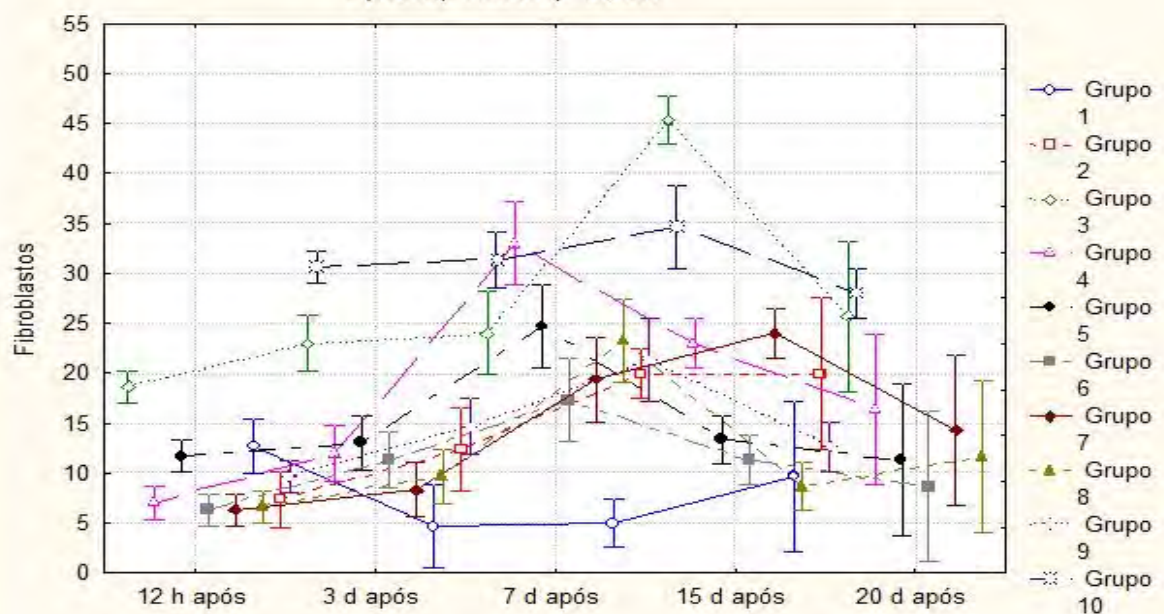


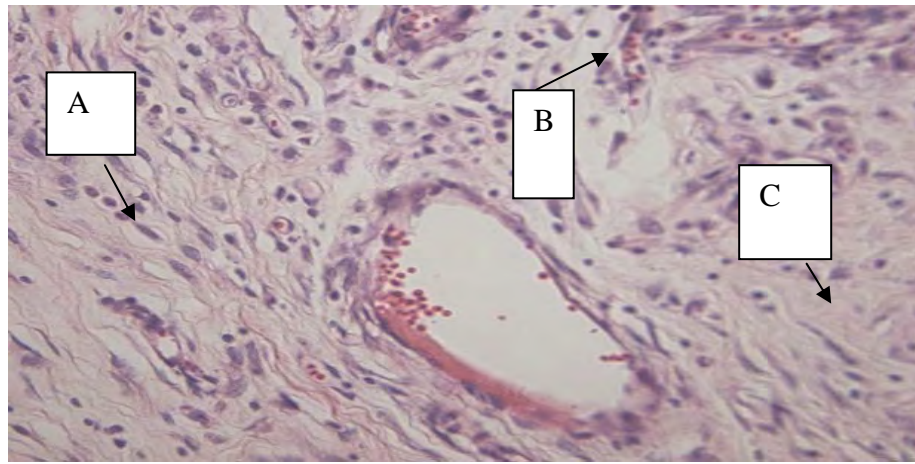
Figura 47 - Gráfico: fibroblastos

Foram encontrados fibroblastos nos 10 grupos nos tempos 12 horas, 3, 7, 15 e 20 dias, essas células sintetizam as proteínas colágenas e elastina, além de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular, produzem fatores de crescimento que controlam o crescimento e a diferenciação celular (JUNQUEIRA, 2004).

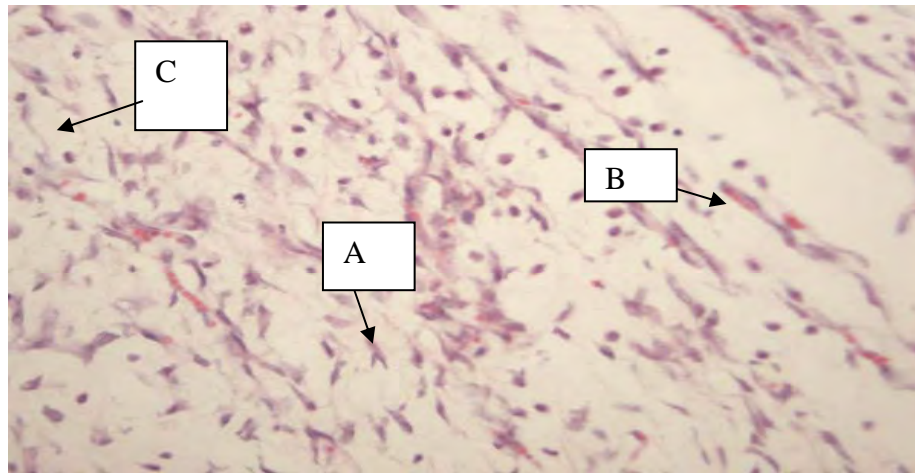
Nos tempos 12 horas, 3 e 15 dias, o grupo 3 apresentou resultado estatístico significativo, quando comparado ao controle positivo para a contagem de fibroblastos. Mirzaei(2007), utilizando o laser He Ne , 4 j/cm<sup>2</sup> em culturas celulares da pele de ratos diabéticos concluiu que esta irradiação resultou em aumento significativo na proliferação fibroblástica, resultados estes também encontrados por Kameya(1995) e Peter Gal(2008) em feridas de ratos, por Silveira(2009) em lesão muscular traumática do gastrocnêmio e por Rabelo(2006) em feridas de ratos diabéticos e não diabéticos.

No tempo 7 dias, os grupos 4 e 10 apresentaram resultados estatísticos significativos quando comparados aos do grupo-controle positivo, corroborando os resultados de Camargo (1995) que descreveu o pico da proliferação fibroblástica no 7º dia após a indução de feridas em ratos tratados com a Guaçatonga.

Os maiores valores das médias dos 10 grupos foram observados no tempo 7 e 15 dias, considerado a segunda fase do processo de cicatrização, a fase proliferativa que se caracteriza pela granulação, epitelização e contração. A granulação é a formação de um novo tecido composto por novos capilares , proliferação e migração dos fibroblastos responsáveis pela síntese de colágeno(STASHAK,1991).Neste momento, com a baixa tensão de oxigênio no centro da ferida e com o aumento no número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno, a angiogênese é essencial permitindo a troca de gases e a nutrição destas células metabolicamente ativas.



*Figura 48*



*Figura 49*

*Figura 48 e 49-Animais do grupo 3 nos tempos 7 e 15 dias. Tecido de granulação, fibroblastos (A), neoformação capilar (B) e colágeno (C). Hematoxilina e Heosina, 40X.*

## V.17 – ANGIOGÊNESE

Os resultados estatísticos referentes à contagem capilar encontram-se na Tabela 18 e estão representados na Figura 50.

**Tabela 50- Tabela de médias e desvios-padrões dos capilares**

Grupos (n=15)	Parâmetro histológico Capilares			
	X±SD			
	3dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	3,3±1,1	0±0	0±0	6,3±2,3
Grupo 2 (controle positivo)	0,3±0,5	0±0	1,6±1,5	8,3±0,5
Grupo3 (laser)	2,6±1,5	7,3±1,5 <b>A</b>	9,6±2 <b>B</b>	16,3±2,8 <b>C</b>
Grupo4 (Pomada 5%)	0,6±0,5	2,6±0,5	5,3±1,1	10,6±1,1
Grupo 5 ( Pomada 10%)	0,3±0,5	6,3±1,1 <b>D</b>	3±0	2,3±1,1 <b>E</b>
Grupo 6 (Pomada 20%)	0,3±0,5	2,6±0,5	7±1,7	3,6±1,1
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	0,6±0,5	0,3±0,5	2,6±0,5	3±0
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	0±0	2,6±0,5	0,6±1,1	0±0 <b>F</b>
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	1±1	4,3±1,5	3±1,7	6,3±0,5
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	1,6±1,5	9,3±1,5 <b>G</b>	10,3±4,5 <b>H</b>	13±2

**A**, (p= 0,0024), **B** (p= 0,0009), **C** (p= 0,009), **D** (p=0,0125), **E** (p= 0,0216) **F** (p=0,0005), **G** (p= 0,0002), **H** (p=0,0004).

ontagem de capilares 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos  
F(27, 60)=11,493, p=.00000

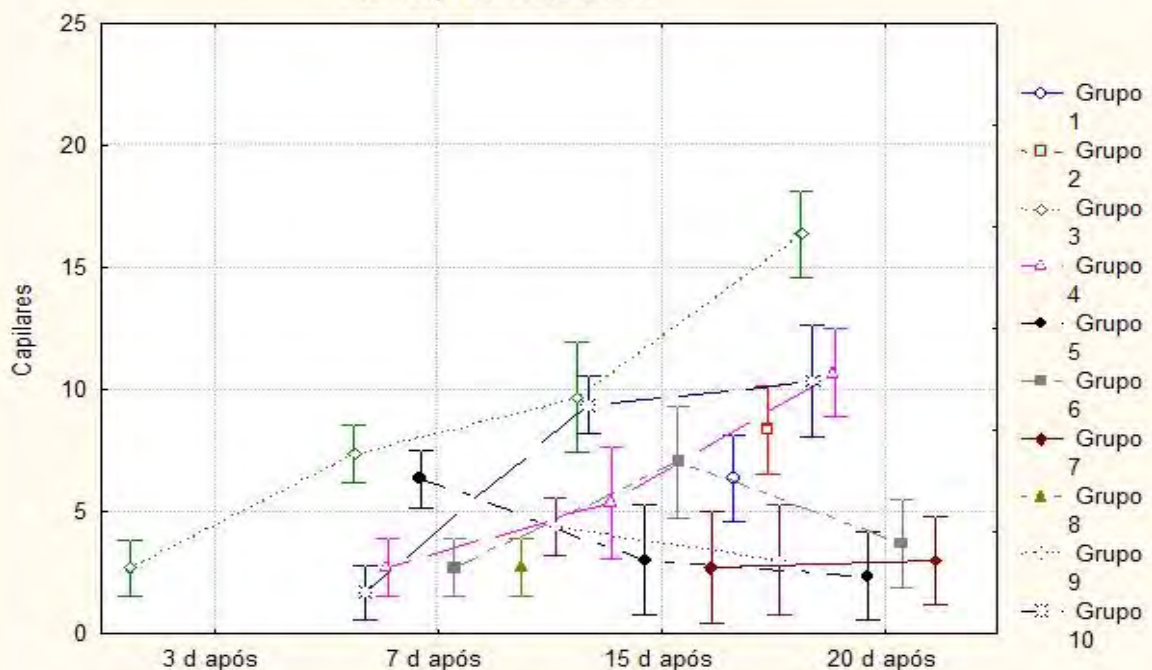
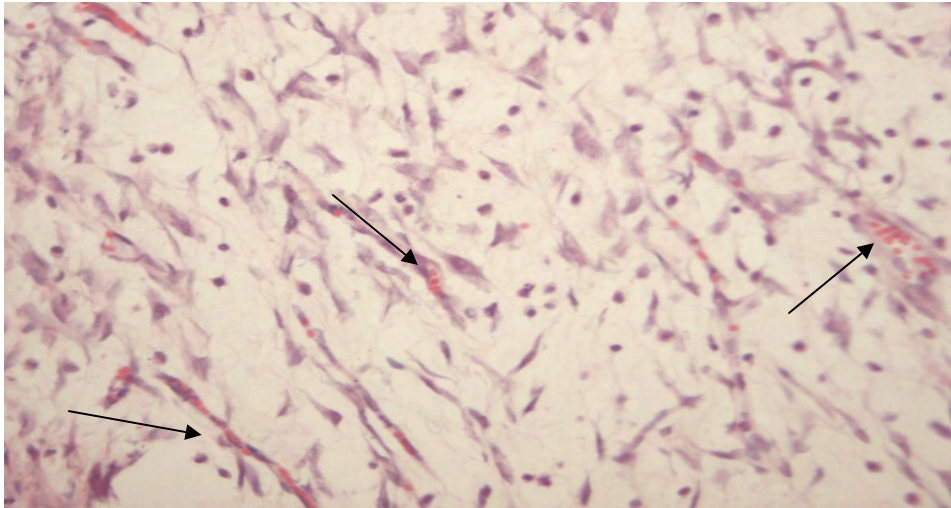


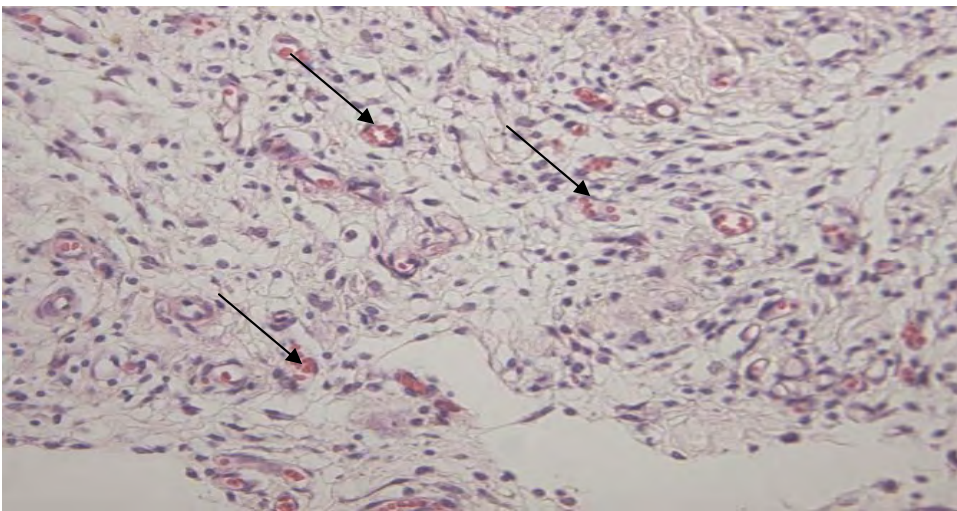
Figura 50 - Gráfico: angiogênese.

No presente estudo, a contagem de vasos neoformados não apresentou resultados estatísticos significativos no tempo 3 dias, mas os valores das médias apresentados pelos 9 grupos indicam o início da angiogênese neste tempo causada por fatores de crescimento e mediadores que promovem a abertura na membrana basal e permitem a migração das células endoteliais. Tais células, atravessando a parede dos vasos adjacentes à lesão e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção à região lesada, e, uma vez na região externa do vaso, passam pelo processo de diferenciação para a aquisição da capacidade de formação de novos capilares. (RUDOLPH & BALLANTYNE, 1990).

Observou-se resultados estatísticos significativos no tempo 7 dias para os grupos 3,5 e 10, no tempo 15 dias para os grupos 3 e 10 e no tempo 20 dias para os grupos 3,5 e 8 quando comparados aos do grupo-controle positivo. Nestes tempos, as células endoteliais migradas anteriormente formam no exterior do vaso um broto capilar que, em seguida, une-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (RUDOLF & BALLANTAYNE, 1990). A ação do laser e da Guaçatonga favorecendo a angiogênese demonstrada nestes resultados corroboram os do Mester (1977) que descreveu o efeito bioestimulador da laserterapia, como um aumento no metabolismo do local da irradiação favorecendo sucessivas mitoses celulares e de Gomes (2005), que relatou a eficiência da Guaçatonga na angiogênese das feridas de ratos quando comparadas ao grupo-controle.



*Figura 51*



*Figura 52*

*Figura 71 e72 - Animais do grupo 3 nos tempos 7 e 15 dias - neoformação capilar.  
Hematoxilina e Eosina,40X.*

## V.18 – COLÁGENO

Os resultados estatísticos referentes à contagem de colágeno encontram-se na Tabela 19 e estão representados na Figura 53.

**Tabela 19-Tabela das médias e desvios-padrões do colágeno**

Grupos (n=15)	Parâmetro histológico colágeno			
	X±SD			
	3 dias	7dias	15dias	20dias
Grupo 1 (controle negativo)	162±2,6	181,6±6	112,3±1,5	163±19,2
Grupo 2 (controle positivo)	63±3	127,3±4	117±3	141,3±3,7
Grupo3 (laser)	73,6±2	156±13 <b>B</b>	152,6±5,5 <b>C</b>	173,6±16,7 <b>D</b>
Grupo4 (Pomada 5%)	74,3±0,5	129,6±11	134,3±7,5	127,3±5,6
Grupo 5 ( Pomada 10%)	60,6±0,5	134,6±5,1	142,3±4,9	131,6±7,76
Grupo 6 (Pomada 20%)	53,3±2	120±15,3	144,3±1,5	146±19,1
Grupo 7 (Pom 5% + Tint 5%)	53,3±0,5	103±6	130±4	108±9,6 <b>E</b>
Grupo 8 (Pom 10% + Tint 10%)	65,3±4	87,3±3,5 <b>F</b>	146,3±3,5 <b>G</b>	123±4,3
Grupo 9 (Pom 20% + Tint 30%)	71,6±1,5	79±3,4 <b>H</b>	128,6±4,5	150±1
Grupo 10 (Laser+ Pom 20%)	91,6±1,5 <b>A</b>	135,3±10,2	153,3±10 <b>J</b>	191±3 <b>I</b>

**A** (p=0,3938), **B**, (p= 0,0393), **C** ( p= 0,0041), **D** (p= 0,0122), **E** (p= 0,0088), **F** (p=0,0011), **G**(p= 0,0319), **H** (p= 0,0002), **I** (p= 0,0033), **J** (p= 0,0002).

ontagem de colágeno 3, 7, 15 e 20 dias após a indução de feridas em ratos nos diferentes tratamentos

F(27, 60)=24,652, p=0,0000

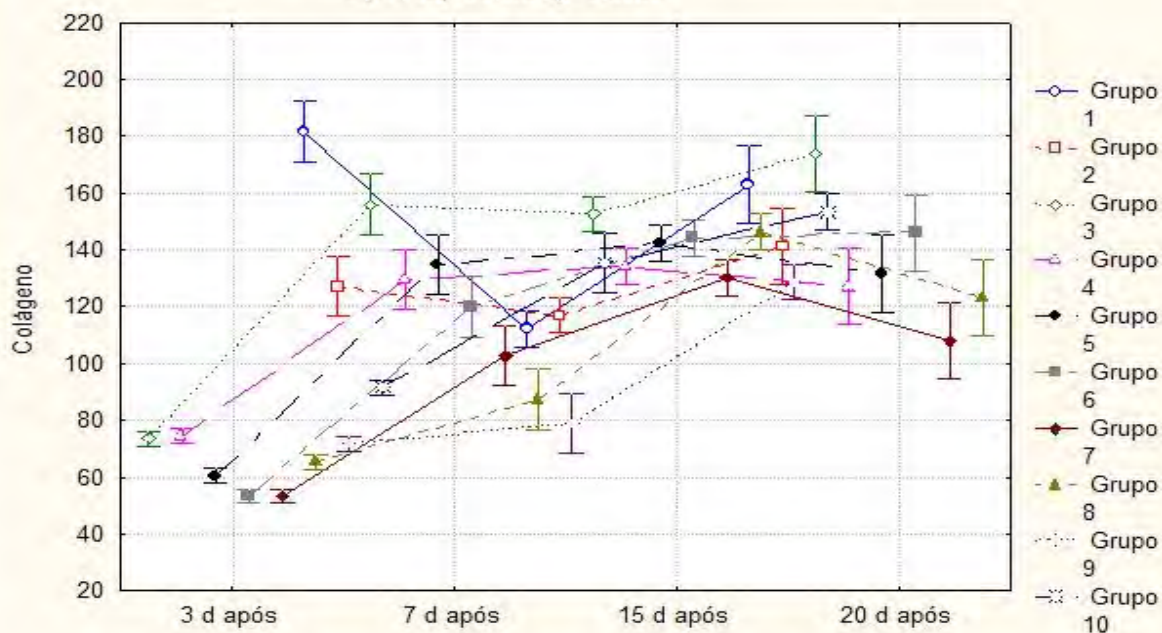
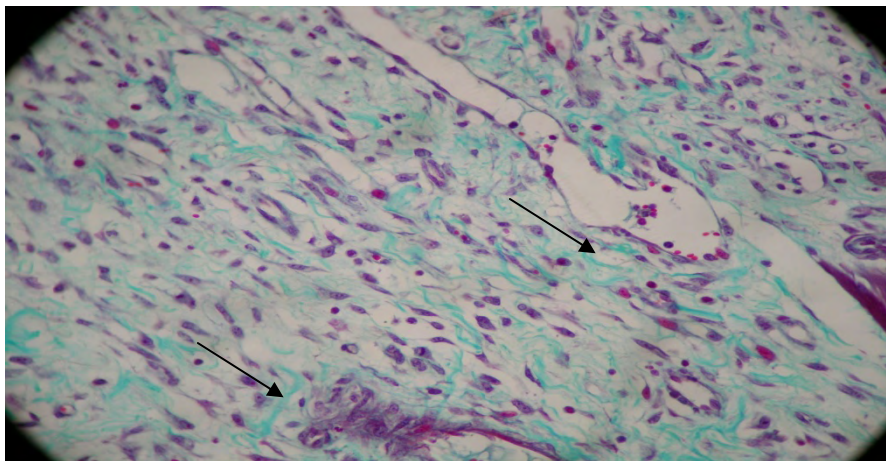


Figura 53 - Gráfico: Colágeno.

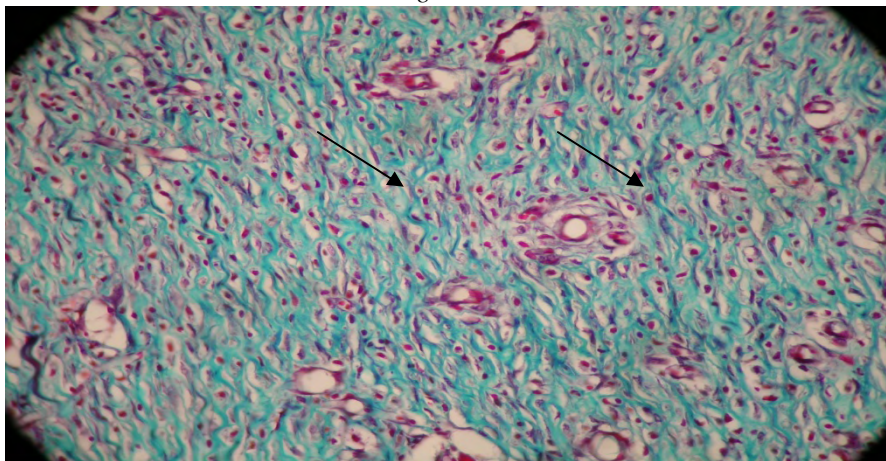
No 3º dia após a lesão o colágeno no grupo 10 apresentou resultado estatístico significativo comparado ao controle positivo, mas é por volta do 10º dia que o leito da ferida está completamente preenchido por tecido de granulação, com uma rede capilar atravessando-o, com a evolução do processo inicia-se o enriquecimento deste tecido com mais fibras colágenas, sendo este aumento gradativo com o passar dos dias (CLARK, 1999).

No tempo 7 dias, os grupos 3,8,9 e 10 apresentaram resultado estatístico significativo na contagem de colágeno, quando comparados aos do grupo-controle positivo, apresentando valores das médias superiores ao tempo anterior, demonstrando maior síntese de colágeno, e permaneceu no tempo 15 dias para os grupos 3,8 e 10 que apresentaram resultados estatísticos significativos na contagem de colágeno quando comparados ao grupo-controle positivo. A remodelagem e a maturação da cicatriz envolvem esta etapa de produção e depósito de colágeno, e sucessiva a ela digestão e orientação das fibrilas, repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz (CLARK, 1999). Estas características foram observadas no tempo 20 dias nos grupos 3,7 e 10 que apresentaram resultados estatísticos significativos na contagem de colágeno, quando comparados ao grupo-controle positivo. Observa-se nos tempos 15 e 20 dias a presença dos anexos da pele, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, a coloração da cicatriz permaneceu pálida, já que a regeneração de melanócitos é deficiente (JOHNSTON, 1990).

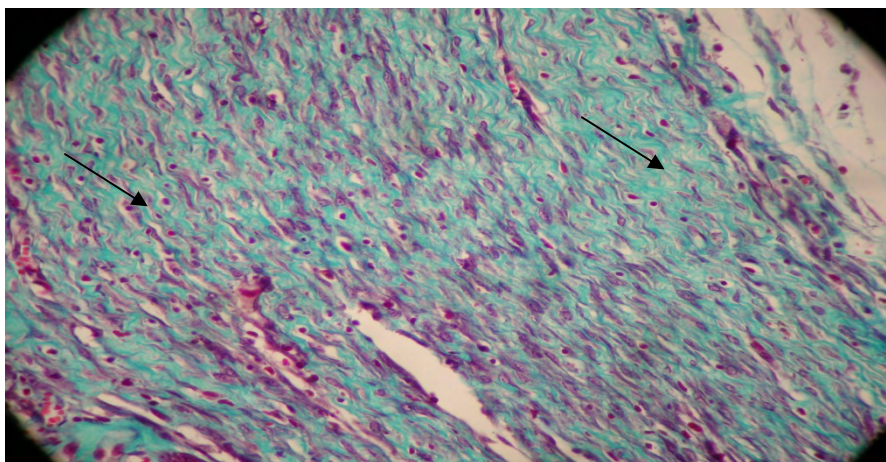
Atualmente, é consenso de que a resolução completa somente pode ser considerada após concluída a maturação e a remodelagem do tecido que ocorre lentamente levando muitos meses e, às vezes, anos, e mesmo assim uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal (CLARK, 1999).



*Figuras 54*

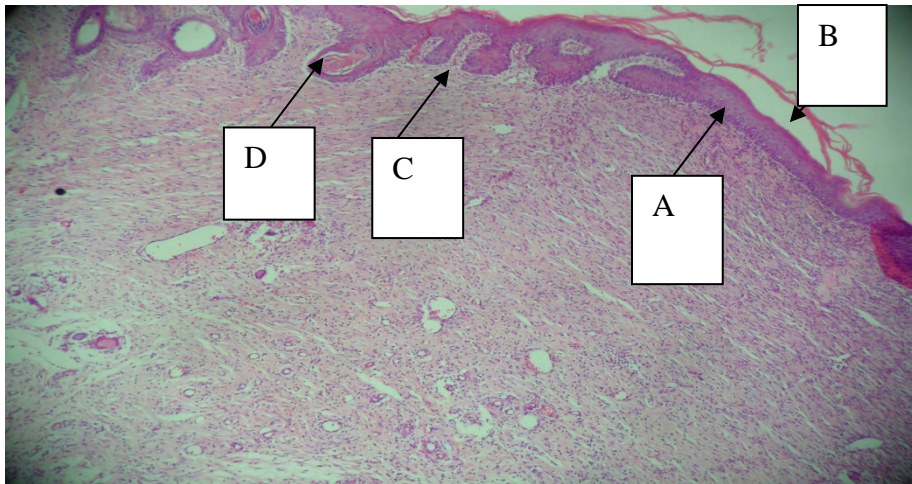


*Figuras 55*



*Figuras 56*

*Figuras 54,55 e 56 - Animais do grupo 10 nos tempos 7,15 e 20 dias - Colágeno: aumento gradativo na síntese, depósito e alinhamento das fibras. Tricrômico de Gomori, 40X.*



*Figura 57- Animal do grupo 4 no tempo 20 dias.  
Epitélio pavimentoso estratificado(A), com a camada  
queratinizada(B) da pele, papilas dérmicas(C) e anexos  
cutaneos(D). Hematoxilina e Eosina, 10X.*

## VI – CONCLUSÕES

O processo de cicatrização de feridas ocorre em fases sucessivas e dependentes, com características morfológicas e funcionais distintas que envolvem eventos celulares, tissulares e bioquímicos. Este estudo evidenciou a necessidade de terapêuticas distintas para cada fase .

A *Casearia sylvestris* Swartz e o laser foram ineficientes para acelerar o processo fisiológico de cicatrização; contudo, as características morfológicas e funcionais dos eventos celulares, tissulares e bioquímicos envolvidos neste processo foram modificadas pelo seu uso.

O uso oral da solução hidroalcoólica e tópico do extrato glicólico da *Casearia sylvestris* Swartz mostrou-se eficiente para: a coagulação sanguínea contendo a hemorragia nos momentos iniciais da lesão, a resolução do edema, a estimulação da angiogênese, a síntese e depósito de colágeno. Os animais tratados com a *Casearia sylvestris* Swartz apresentaram uma resposta imediata ,intensa e duradoura de células da inflamação, neutrófilos e macrófagos durante as fases do processo de cicatrização.

O uso do Laser In Ga P diodo de emissão contínua, 30mW de potência na dose de 4j/cm<sup>2</sup> apresentou-se eficiente para: a resolução do edema, a resposta imediata e duradoura dos neutrófilos, macrófagos, a proliferação fibroblástica, a síntese e depósito de colágeno, a estimulação da angiogênese durante as fases do processo de cicatrização.

Mediante os resultados obtidos os parâmetros hematológicos e bioquímicos dispensadas nos estudos com este delineamento experimental mostraram-se sensíveis ao processo de cicatrização e ao estresse dos animais, novos estudos devem ser realizados a fim de estabelecer esta relação.

## VII - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2005. 580p.

ABSY, M. L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, São Paulo, n. 30, p. 641-676, 1973.

AGREN, M. S. *et al.* A comparative study of three occlusive dressing in the treatment of full thickness wounds in pigs. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Auburn, MA, n. 36, p.53-58, 1997.

ALISON, M. R. Repair and regenerative Responses. In: MCGEE, J.O.; ISAACSON, P.; WRIGHT, N.A. **Textbook of Pathology**, Oxford, p. 365-368, 1992.

ALMEIDA, S. P. *et al.* **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.

AL-WATBAN, F. A. *et al.* Low level laser therapy enhances wound healing in diabetic rats: a comparison of different lasers. **Photomed Laser Surg**, New Rochelle, NY, v.25, n.2, p. 72-7, Apr. 2007.

ATAKA, I. Studies of Nd: YAG low power laser irradiation on stellate ganglion. **Lasers in dentistry**. Elsevier: Amsterdam, 1989. 271 p.

BANKS, W.J. **Histologia veterinaria aplicada**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.

BASFORD, J. R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Laser Surgery and Medicine**, v.9, p.1-5, 1989.

BAXTER, G. D. *et al.* Low level laser therapy: current clinical practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, v.77, p.171-178, 1991.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers; theory and practice**. United States of America: Churchill Livingstone, 1997.

BECKERMAN, H. *et al.* The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. **Physical Therapy**, v.72, p.483-491, 1992.

BENEDICENTI, A. La valutazione dell' effetto della luce laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo. In: BENEDICENTI, A. **Atlante di laser-terapia**. Genova: Langa Grafica, 1982. p.71-83.

BEUTLER, J. A. *et al.* Cytotoxic clerodane diterpenes esters from *Laetia procera*. **Phytochemistry**, v.55, p. 233-236, 2000.

BLÄS, B. *et al.* ent-Clerodane diterpenes and other constituents from the livewort *Adelanthus lindenbergianus* (Lehm.) Mitt. **Phytochemistry**, v. 65, p.127-137, 2004.

BOGLIOLO L. **Patologia Geral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 335p.

BOLTON, P. *et al.* The direct effect of 860nm light on cell proliferation and on succinic dehydrogenase activity of human fibroblasts in vitro. **Laser Therapy**, v.7, p.55-60, 1995.

BORGES, M. H. *et al.* Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127b, p. 21-30, 2000.

BORGES, M. H. *et al.* Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*). **Toxicon**, v.39, p.1863-1869, 2001.

BRASILEIRO FILHO, G. *et al.* Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G; PEREIRA, F:E:D.; PITTELA,J.E.H.; BAMBIRRA, E.A;BARBOSA,A, J.A(eds.) **Bogliolo Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 312p.

BUSCCHIAZZO, P. M. El concepto de medicamentos esenciales y la accesibilidad. **Boletim da Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos**, São Paulo, n. 36, p. 3-4, 2000.

CALDEIRA, S. I. B. Fisioterapia ganha cada vez mais espaço. **Saúde Equina**, v.3, p. 61-116, 1997.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, p.179-189, 2000.

CAMARGO, F.G. **Avaliação ultra estrutural da substância intercelular da polpa de dentes decíduos humanos através do relacionamento entre Glicosaminoglicanos e fibrilas colágenas**. 1995, 106f. Tese (Doutorado em odontologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

CAMARGO, F. G. *et al.* Ação do extrato alcoólico de guaçatonga diluído e tamponado em subcutâneo de camundongo – Parte II – Estudo histológico. **LECTA**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 61-86, 1996.

CARRILLO, J. S. *et al.* Acción del láser de He-Ne sobre el crecimiento de una cepa de estafilococcus aureus "in vitro". In: CONGRESS INTERNATIONAL LASER, **Anales...** 1987, p.26-28.

CARRINHO, P. M. *et al.* Comparative study using 685 nm and 830 nm lasers in the tissue repair of tenotomized tendons in the mouse. **Photomed Laser Surg**, v.24, n.6, p.754-758, Dec., 2006.

CARVALHO, P. R. F. *et al.* Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.

CARVALHO, J. C. A. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd,2004.

CARVALHO, E. S. *et al.* Diterpeno  $\Delta^{13(16),14}$  – diênico docaule de *Casearia sylvestris* Swartz. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS,8., 2007, São Paulo. **Anais eletrônico...** São Paulo, 2007. 1 CD-ROM.

CAVALCANTE, W. L. G. *et al.* Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490-497, 2007.

CHANG, L. *et al.* The Role of Immune System in Conjunctial Wound Healing After Glaucoma Sugery. **Survey of Ophthalmology**, v.45, n.1, July-August.2000.

CHEN, C. H. *et al.* Low energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration and NOS gene expression possibly via P13K signal pathway. **Lasers Surg. Med.**, v.40, n.1, p. 46-54, Jan. 2008.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 13, p. 701-725, 1985.

CLARK, J.O. Analgesia. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v.15, n.3, p.705-723, 1999.

COLLS, J. **La Terapia Laser Hoy**. Barcelona: Centro de Documentacion Laser de Meditec, 1985.

COOMBE, A. R. *et al.* The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin Orthop Res**, v.4, p.3-14. 2001.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura: IBDF, 1975. p. 514-516.

COTRAN, R. S.; ROBBINS, L.S. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277p.

DEALY, C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2001, p.49-65, 68-89, 200-207.

DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare.**Drugs**, v. 54, n. 6, p. 801-840, 1997.

ECKES, B.*et al.* Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. **Matrix Biology**, v.19, p.325-332, 2000.

EICHLER, A. G.; MARTIUS, C. F. P. *Bixaceae*. **Flora Brasiliensis**, v. 1, n. 13, p.421-488, 1871.

ENGELHARD, E. *et al.* Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. **Am. J. Pathol.**, v.153, p.1849-1860, 1998.

ENWEMEKA, C. S. *et al.* Morphometries of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, p.47-52, Dec. 1990.

ERDLEY, B. J. *et al.* Effects of continuous wave (670 nm) red light on wound healing. **Dermatol. Surg.**, v.34, n.3, p.320-325, Mar. 2008.

ESPÍNDOLA, L. S. *et al.* Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Médica**, v. 70, n. 11, p. 1093-1095, 2004

ESTEVES, I. *et al.* Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

ETSE, J. T. *et al.* Terpenoid and alkaloid compounds from the seeds of *Monodora brevipes*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2489-2492, 1989.

FAROUK A. H.; AL-WATBAN M. Low-Level Laser Therapy Enhances Wound Healing in Diabetic Rats: A comparison of Different Lasers. **Photomedicine and Laser Surgery**, Rochester, NY, 2006.

FERNANDES FILHO, E. I.; VIANA, J. H. M. Quantiporo: um novo programa para tratamento e quantificação de imagens digitais para aplicações em ciência do solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28., Londrina, 2001. Resumos. Londrina, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2001. p.224.

FUNK, O. J. *et al.* Cytokine production after helium-neon laser irradiation in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **J. Photochem Photobiol B: Biology**, v.16, p.347-355, 1992.

FULLER, A. T. Fundamentals of lasers in surgery and medicine. In: DIXON, J. A. (ed). **Surgical applications of lasers**. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1983.

GEOVANINI, T. A. **Manual de curativos**. São Paulo: Corpus, 2007.

GIBBONS, S. *et al.* Clerodane diterpenes from the bark of *Casearia tremula*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 565-570, 1996a.

GIBBONS, S. *et al.* Clerodane diterpenes from the leaves of *Laetia procera*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 3, p. 635-638, 1996b.

GOMES, C. L. N. *et al.* Avaliação do efeito cicatrizante da *Casearia sylvestris* Swartz (guaçatonga) em camundongos. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, Rio de

Janeiro, v. 3, n. 2, p. 48-55, 2005.

GONÇALVES, W. L. *et al.* Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. **Braz Med Bio Res.**, Ribeirão Preto, v. 40, n.6, p. 877-84, Jun. 2004.

GUIDUGLI NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts on superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. **Rev. Odontol. Univ. Sao Paulo**, São Paulo, v.6, p.66-71, 1992.

GUITTET, E. *et al.* Pitumbin, a novel kolavene acylal from *Casearia pitumba* Pleumer. **Tetrahedron**, v. 44, n. 10, p. 2893-2901, 1988.

HAYASHI, K-I. *et al.* Antitumor agents. Part 212 – Bucidasins A-C, three new cytotoxic clerodane diterpenes from *Bucida buceras*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 345-348, 2002.

GUYTON, C.A. **Tratado de fisiologia médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1977.

HARRIS, D.M. Biomolecular mechanisms of laser biostimulation.. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.9, n.4, p.277-280, 1991.

HAWKINS D.; ABRAHAMSE H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg.**, v.24, n.6, p.705-14, Dec. 2006.

\_\_\_\_\_. Influence of broad-spectrum and infrared light in combination with laser irradiation on the proliferation of wounded skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg.**, v.25, n.3, p.159-169, Jun. 2007.

HERCH J.; TERESI, D. **El rayo láser**. Barcelona: Salvat Editores.1987.

HOPKINS, J. T, *et al.* Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study. **J. Athl Train**, v.39, n.3, p.223-229, Sep. 2004.

HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE H. Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabetic-wounded fibroblast cells. **Photomed Laser Surg.**, v.25, n.6, p. 474-481, Dec. 2007.

HUNTER, M. S. *et al.* Four new clerodane diterpenes from the leaves of *Casearia guianensis* which inhibit the interaction of leukocyte function antigen 1 with intercellular adhesion molecule 1. **Journal of Natural Products**, Columbus, Ohio, v. 60, n. 9, p. 894-899, 1997.

HUSEYIN D.; HALIL B.; MEHMET K. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehabilitation Research and Development**, v.41, n.2, p. 147-15, Apr. 2004.

IJIMA, K. Evaluation of analgesic effect of low power He: Ne laser on postherpetic neuralgia using VAS and modified McGill pain questionnaire. **J. Clin Laser Med Surg**, v.2, n.9, p.121, 1991.

IN DE BRAEKT, M. *et al.* Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs. **Lasers Surg. Med.**, v.11, p.462-470, 1991.

ITOKAWA, H. Novo composto diterpênico e suas aplicações. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 460-470, 1989.

ITOKAWA, H. *et al.* New antitumor agent from paraguayan medicinal plant, *Casearia sylvestris* Sw. (*Samydaceae*). **Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 76, n. 11, p. 216, 1987.

ITOKAWA, H. *et al.* New antitumor principles, casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 4, p. 1585-1588, 1988.

ITOKAWA, H. *et al.* Antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (*Flacourtiaceae*), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2-D NMR spectroscopy. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3384-3388, 1990.

JOHNSTON, D.E. Wound healing in skin. **Veterinary clinics of North America: small animal practica**, v.20, n.1, p.1-25,1990.

JONES, T. C. *et al.* **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000. 1353p.

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

JULLIAN, V. *et al.* New clerodane diterpenoids from *Laetiapropera* (Poepp.) Eichler (*Flacourtiaceae*), with antiplasmodial and antileishmanial activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 5065-5070, 2005.

KAMEYA, T. *et al.* Effects of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. **Laser Therapy**, v.7, p.33-36, 1995.

KANA, J. Effect of low-power density laser radiation on healing of open wounds in rats. **Arch Surg.**, v.116, p.293, 1981.

KANOKMEDHAKUL, S. *et al.* New bioactive clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia grewiifolia*. **Journal of Natural Products**, Columbus, Ohio, v. 68, n. 2, p. 183-188, 2005.

KARU, T. I. **Photobiology of low-power laser therapy**. London: Harwood Academic Publishers, 1989, v.8.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: KARU, T. I.; LUBART, R. **Effects of low-power light on biological systems V**. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE, v. 4159, p.1-17, 2000.

KHAN, M. R. *et al.* Clerodane diterpenes from *Zuelania guidonia* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 2939-2942, 1990.

KHAN, R. *et al.* Clerodane diterpenes from *Casearia corymbosa* stem bark. **Phytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 3591-3595, 1990a.

KHAN, M. R. *et al.* Diterpenes from *Zuelania guidonia*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1609-1614, 1990b.

KIERSZENBAUM, A L. **Histologia e biologia celular**: uma introdução à patologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.3-53, 2004.

KITCHEN, S. S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. São Paulo: Manole, p.191-210, 1996.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. J. A. Infrared therapy. **Physiotherapy**, v.77, n.4, p.249-254, 1991.

KLOTH, LUTHER. **Wound Heding**: alternatives in management. USA: Churchill Livingstone, 1997. p.347-364.

KOPERA D. *et al.* Does the use of low-level laser influence wound healing in chronic venous leg ulcers? **J. Wound Care**, v.14, v.8, p. 391-394, Sep. 2005.

KUBOTA, J.; OHSHIRO, T. The effects of diode laser low reactive level laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model. **Laser Therapy**, v.1, n.3, p.127, 1989.

LAAKSOL, L. *et al.* Quality of light-is laser necessary for effective photobiostimulation? **J. Physiotherapy**, Australian, v.39, n.2, p.87-92,1993a.

\_\_\_\_\_. Factors affecting low level laser therapy. **J. Physiotherapy**, Australian, v.39, n.2, p.95-99,1993b.

LIEVENS, P. The influence of laser-irradiation on the motricity of the lymphatical system and on the wound healing process. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY. 4.,1986, Bologna. **Proceedings...** Bologna, Itália. 1986, p.171-174.

\_\_\_\_\_. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing. **LASER. J. Eur. Med. Laser Ass.**, v.1, n. 2, p.12, 1988.

\_\_\_\_\_. The effect of a combined He:Ne and I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. **Laser News**, v.3, n.3, p.3-9, 1990.

\_\_\_\_\_. The effect of I. R. Laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. **Laser Med. Sci.**, v.6, p.189-191, 1991.

LOW, L.; REED, A. **Eletroterapia Explicada: princípios e prática**. 3.ed., Barueri: Manole, 2001.

MAJNO,G.; JORIS, I. **Cells, tissues and disease: principles of general pathology**. Cambridge: Blackwell Science,1996. 974p.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte II.2003. **An. Bras. Dermatol.**, v.78, n.5, p. 521-522, 2003.

MANWARING, M. E. Contact guidance induced organization of extracellular matrix. **Journal Invest Dermatol**, v.25, p.3631-3638, 2004.

MARTINS, E. R. *et al.* **Plantas Medicinai**s. Viçosa: UFV, editora universitária, 1994, 220p.

MATTOS, E. S. *et al.* Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 1-6, 2007.

MAYAYO, E.; TRELLES, M. A. Irradiación láser experimental de la mucosa anal en el ratón de laboratorio. **Inv. Clin. Laser I**, v.4, p.28, 1984.

MEDRADO, A. R. *et al.* Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg. Med.**, v.32, n.3, p.239-244, 2003.

MEIER, J.; STOCKER, K. F. Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms. In: MEIER, J.; WHITE, J. **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Boca Raton: CRC Press, 1995.p. 367-412.

MENDEZ, T. M. T. V. *et al.* Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **Journal of Clinical Laser Medicine e Surgery**, v.22, n.1, p19-25, 2004.

MESQUITA, M. L. *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MESQUITA, M. L. *et al.* *In vitro* antiplasmodial activity of brazilian cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165-170, 2007.

MESTER, E. A. *et al.* Wundheilung und regeneration. Neuere untersuchugen über die wirkung der laserstrahlen auf die undheilung - Immunologische effekte. **Z Exper Chirurg**, v.10, p.301, 1977.

MIKAIL, S. Laser e ultra-som: novas abordagens. **Saúde Equina**, v.3, p.9, 1997.

MIRÓ, L. *et al.* Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. **Inv. Clin. Laser**, v.1, n.2, p.9-14, 1984.

MIRZAEI, M. *et al.* Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin diabetic rats. **Fotomed Laser Surg.**, v.25, n.6, p.519-25, Dec. 2007.

MOLLINEDO F. Novel trends in neutrophil structure function and development. **Immunol Today**, v.20, n.12, p.535-537,1999.

MORITA, H. *et al.* Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693-697, 1991.

MOSADDIK, M. A.; WATERMAN, P. G. A sesquiterpene, clerodane diterpenes and a furanone from the roots of *Casearia multinervosa* (Flacourtiaceae/Salicaceae). **Natural Products Communications**, Westerville, Ohio, v. 1, n. 8, p. 601-607, 2006.

NAVARRO,G. **Manual de hematologia veterinária**. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela,2005.

NOVATO, D. A. **Tratamento de feridas**: uma contribuição ao ensino de enfermagem. 2000, 99f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

OBERLIES, N. H. *et al.* Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, Columbus, Ohio, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OHSHIRO, T. **Low reactive-level laser therapy practical application**. Chichester: Ed.John Wiley & Sons, p. 3-10, 1991.

OHSHIRO, T.; FUJINO, T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. **Keio J. Med**, Tokio, Japan, v.42, n.4, p.191-195, 1993.

OHSHIRO, T.; CALDERHEAD, R. G. Laser therapy - a decade further on. **Laser Therapy**, v.10, p.5-6, 1998.

OLIVEIRA, P. V. A. *et al.* Ação de extrato etanólico de *Casearia sylvestris* contra leveduras do gênero *Candida*. **Jornal Brasileiro de Fitoterapia**, v. 5, n. 3, 2007.

OSHIMA-FRANCO, Y. *et al.* Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). **Journal of Venoms Animal Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 465-478, 2005.

OZCELIC, O. *et al.* Improved wound healing by low-level laser irradiation after gingivectomy operations: a controlled clinical pilot study. **J. Clin. Periodontol**, v.35, n.3, p. 250-24, Mar. 2008.

PALMGREN, N. Low-power laser therapy in rheumatoid arthritis. **Lasers Med. Sci.**, v. 12, p. 441, 1992.

PAURREAU-SCHNEIDER, N. *et al.* Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. **American Journal of Pathology**, v.137, p.171-178, 1990.

PEREIRA, B. M. R. *et al.* Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina popular III. Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 4, p. 85-86, 1992.

PETER, G. *et al.* R. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. **Lasers Med. Sci.**, v.24, n.4, p.539-547, Jul. 2009.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 45-61, 2002. Suplemento 1.

PUGLIESES, L.S. *et al.* The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.17, n.4, p.307-313, 2003

RABELO, S. B. *et al.* Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. **Photomed. Laser Surg.**, v.24, n.4, p.474-479, Aug. 2006.

RASLAN, D. S. *et al.* Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris Sw.* **Bolletín Chimie et Farmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

REDDY, G. K. *et al.* Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers Surg. Med.**, v.22, p.281-287, 1998.

ROBBINS, S.L. **Patologia Básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ROBBINS, S.L.; COTRAN; R. **Patologia**: bases patológicas da doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592p.

ROCHKIND, S. *et al.* Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg. Med.**, v.9, p.174-182, 1989.

RODRIGUES, A. M. S. *et al.* Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Association**, Fresno CA, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

RUDOLPH, R.; BALLANTYNE Jr. D. L. Skin grafts. In: MCCARTHY, J. G. **Plastic surgery**, Philadelphia: WB Saunders, v.1, p.221-267, 1990.

RUPPELT, B. M. *et al.* Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas. II-Bloqueio da atividade na permeabilidade

capilar e na letalidade do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*), **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 3, p. 57-58, 1990.

SANTOS, A. G. *et al.* Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 30, p. 1100-1103, 2007.

SASSIOTO, M. C. P. *et al.* Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 637-641, 2004.

SCAVONE, O. *et al.* Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz): aspectos botânicos da planta, ensaios fitoquímicos e propriedade cicatrizante da folha. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v. 19, n. 1, p. 73-81, 1979.

SCHALM, O. W. **Veterinary hematology**. 2.ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1975.

SCHEFFER, M. C. *et al.* Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para nordeste brasileiro**. (online). Petrolina: EMBRAPA, 1999. Disponível em: <<http://www.capta.embrapa.br>>. Acesso em: 20 mar. 2009.

SCHENK, P. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von oralen Schleimhautepithelien nach Bestrahlung mit dem Helium-Neon-Laser. **Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir**, v.9, p.278, 1985.

SCHIMITT, I. *et al.* Os efeitos da radiação laser arseneto de gálio (As Ga) sobre a regeneração de tendões em cães. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 30, p.145-149, 1993.

SCHNEIDER, N. F. *et al.* Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Casearia sylvestris* Swart. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 112-114, 2006.

SEITZ, L. M.; KLEINKORT, M. A. Low-power laser: Its applications in physical therapy. In: MICHLOVITZ, S. L.; WOLF, S. L. **Thermal Agents in Rehabilitation**. Philadelphia: F. A. Davis Company, 1986, p.217-238.

SERAFIM, F.; TEODOROSK, R. C. C. Laser arseneto de gálio (Ga-As) no tratamento das algias provocadas pela disfunção temporomandibular: estudo piloto. **Fisioterapia Brasil**, v.4, p.32-38, 2003.

SHEN, Y.C. *et al.* New cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia membranacea*. **Journal of Natural Products**, Columbus, Ohio, v. 67, n. 3, p. 316-321, 2004a.

SHEN, Y.C. *et al.* Two new cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 1, p. 108-110, 2004b.

SHEN, Y.C. *et al.* New clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, n. 1, p. 68-77, 2005a.

SHEN, Y.C. *et al.* Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia membranacea*. **Journal of Natural Products**, Columbus, Ohio, v. 68, n. 11, p. 1665-1668, 2005b.

SHEN, Y.C. *et al.* Three new clerodane diterpenes derivatives from *Casearia membranacea*. **Journal of Chinese Chemical Society**, Taipei, v. 52, n. 6, p. 1263-1268, 2005c.

SILVA, F. B. *et al.* Natural medicaments in endodontics: a comparative study of the anti-inflammatory action. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 174-179, 2004.

SILVA, M. A. S. da. **Variabilidade genética e fitoquímica de *Casearia sylvestris* Sw em populações do cerrado e mata atlântica do estado de São Paulo**. 2003, 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SILVA, G. A. A. B.; BAUER, L. Análise do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Sw – I. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, n. 6, p. 327-331, 1970.

SILVA, R. A. D. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926. p. 429, 503-504.

SILVEIRA, P.C.L. *et al.* Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 94, p. 143-146, 2009.

SILVEIRA, P. C. *et al.* Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **J. Photochem Photobiol B**, v.86, n.3, p.279-82, Mar. 2007.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Florianópolis: DA Longman Scientific & Technical, p. 1-4, 1993 UFSC, 2003.

SINGH, P. *et al.* Clerodane derivatives from *Grangea maderaspatana*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1537-1539, 1988.

SKOBELKIN, O. K. *et al.* Preoperative activation of the immune system by low reactive level laser therapy (LLLT) in oncologic patients: A preliminary report. **LLLT Cancer Surg.**, v. 3, p.169-175, 1991.

SLEUMER, H. O. **Flacourtiaceae: flora neotropica; monograph number 22**. New York: The New York Botanic Garden, 1980. p. 4, 281, 392-393, 400-401.

SOUSA, F. G. *et al.* Allelopathy and genotoxic potential of *Casearia sylvestris* Sw extracts. **Allelopathy Journal**, v. 20, n. 1, p. 195-202, 2007a.

SOUSA, F. G *et al.* Clastogenic and anticlastogenic effect of the essential oil from

*Casearia sylvestris* Swart. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 376-378, 2007b.

STASHAK, T. **Equine wound management**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991, 278p.

TAYLOR, R. A. *et al.* Physical therapy in canine sporting breeds. In: BLOOMBERG, M.S.; DEE, J.F.; TAYLOR, R.A. **Canine Sports Medicine and Surgery**. Philadelphia: w.b. Saunders, p.265-274, 1998.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: ROCA, 2006.

TININIS, A. G. **Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração e análise de casearinas em *Casearia sylvestris* Sw.** 2006, 182 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

TININIS, A. G. *et al.* Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006.

TORRES, R. B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (*Flacourtiaceae*) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, n. 9, p. 239-258, 1986.

TRELLES, M. A. *et al.* Histological study of the effect of the 632 nm HeNe irradiation on the nasal mucous of the rabbit. Its clinical interest. In: INTERNATIONAL CONGRESS OPTOELEKTRONIK **Proceedings...** 1983. p.105-109.

TRELLES, M. A. Herpes genital y láser de baja potencia. **Inv Clin Laser II**, v.3, p.120, 1986.

TUNÉR, J.; HODE, L. **Laser therapy in dentistry and medicine**. Stockholm: Prima Books, 1996.

TUNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy: Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books: 1999.

VELÉZ-GONZÁLEZ, M. *et al.* A. Treatment of relapse in Herpes simplex on labial & facial areas and of primary herpes simplex on genital areas and area pudenda with low power laser (He-Ne) or acyclovir administered orally. In: The international society for optical engineering. **Proceedings...** 1994. p.43-48.

VIEGAS, V. N. *et al.* Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparison with meloxicam. **Photomed Laser Surg.**, v.25, n. 6, p. 467-473, Dec. 2007.

WILLIAMS, R. B. *et al.* Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the Rainforest of Madagascar. **Journal of**

**Natural Products**, Columbus, Ohio, v. 70, n. 2, p. 206-209, 2007.