

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UFPB-UFBA
DOUTORADO EM ESTOMATOLOGIA



AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA QUITOSANA EM ORABASE NA REPARAÇÃO
TECIDUAL QUANDO ASSOCIADA OU NÃO AO LASER

VISÍVEL DE λ 660 NM

RICARDO A. S. GURGEL

João Pessoa
2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UFPB-UFBA
DOUTORADO EM ESTOMATOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA QUITOSANA EM ORABASE NA REPARAÇÃO
TECIDUAL QUANDO ASSOCIADA OU NÃO AO LASER**

VISÍVEL DE λ 660 NM

RICARDO ALEXANDRE SOARES GURGEL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, área de concentração em Estomatologia, para obtenção do título de Doutor.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Tânia Lemos Coelho Rodrigues

Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior

João Pessoa

2008

DATA DA DEFESA: 12 de DEZEMBRO de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Tânia Lemos Coelho Rodrigues
Orientadora

Prof. Dr. Riedel Frota
Examinador Externo

Prof. Dr. José Rodrigues Laurenó Filho
Examinador Externo

Prof^a. Dr^a. Claudia Roberta Leite Vieira de Figueiredo
Examinadora Interna

Prof. Dr. Fabiano Gonzaga Rodrigues
Examinador Interno

Prof. Dr. José Ivo Queiroz do Amaral
Suplente

Prof. Dr. Francisco de Assis Limeira Júnior
Suplente

Dedico este trabalho a memória de meu Pai **Garibaldi Gurgel**, por estar sempre preocupado com minha educação e apoiando meu crescimento na vida acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a **Deus** por me proporcionar tantas vitórias, por me dar forças para superar obstáculos e discernimento nas horas difíceis.

A minha Mãe, **Salet**, pela preocupação com minha formação profissional e pelos conselhos pertinentes.

Ao meu Irmão, **Garibaldi Jr.** e minha Cunhada, **Idê**, meus orientadores desde a infância, sempre me guiaram pelo melhor caminho.

Ao meu sogro, **Gil Braz** e minha sogra, **Iara** meus fiéis torcedores, me adotaram como filho e vibram a cada conquista.

A minha esposa, **Giliara Carol**, devo fazer um agradecimento especial por ter sido minha companheira em todos os momentos, devo confessar que a idéia para este trabalho partiu dela, mas isto fica só entre nós, espero que meu amor por você possa compensar tudo que fez por mim.

Ao meu filho, **Demétrio**, a inocência e a doçura da infância que transbordam de você, me revigoram todos os dias.

A minha cunhada **Ysa**, pela dedicação durante todo período experimental, cumprindo com louvor todas as tarefas que foram delegadas no laboratório.

Ao amigo **Álvaro**, companheiro de caminhada desde a especialização, compartilhando momentos de incerteza, dificuldades e conquistas.

Aos amigos e colegas de Doutorado **Allan, Denise, Karina, Luis, Marcos e Monique.**

A amiga **Andréa Queiroga**, por nos ajudar durante o período experimental e pelas dicas diante as dificuldades técnicas da pesquisa.

Aos meus orientadores Prof^a.Dr^a. **Tânia** e Prof. Dr. **Limeira** amigos e colegas de profissão, externo aqui minha gratidão pelo estímulo à pesquisa e a docência.

Aos Coordenadores da Pós-Graduação, Prof. Dr. **Ricardo Duarte**, Prof. Dr. **Lino** e Prof. Dr. **Fabiano** pela ajuda nas horas de dificuldade.

A Prof. Dr. **Claudia Roberta**, pela compreensão e dedicação em realizar as análises histológicas, sempre nos ajudando a melhorar o nosso trabalho.

Ao Prof. Dr **Emanuel**, por permitir o processamento histotécnico no Laboratório de Patologia Bucal da FOP-UPE.

Ao Prof. Dr. **Frederico**, do Laboratório de Microscopia do CCS, pela sua dedicação em nos ajudar a fotografar as lâminas.

A Dr^a **Célia** da Farmácia de manipulação Dilecta, por ter colaborado com a confecção dos fármacos utilizados durante a pesquisa.

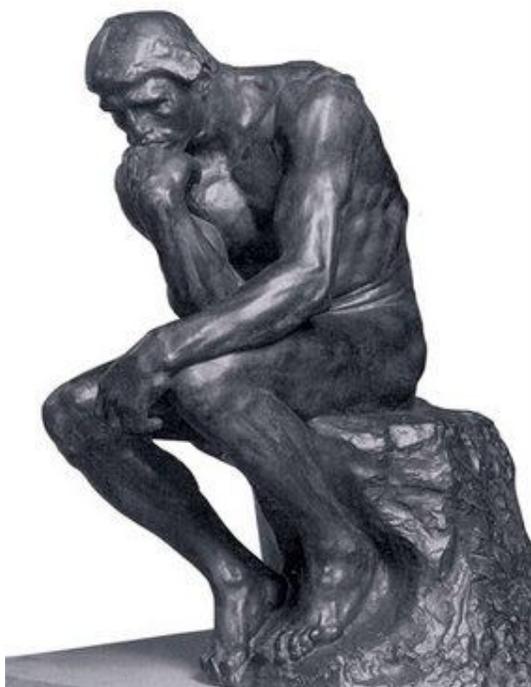
A **Armando, Catarina e Silvana**, pela paciência e colaboração para confeccionar nossas lâminas.

A **Crispim** responsável pelo Biotério do LTF, e **todos os funcionários** envolvidos com os cuidados dos animais destinados a pesquisa.

A **Fátima**, ACD dedicada, ajudou no preparo do instrumental cirúrgico para os experimentos.

Aos estagiários do LEA, **Suênnya, Thiago, Carol, Lariane** e em especial o amigo **Adelmo**, pela contribuição durante o período experimental.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente com o desenvolvimento deste trabalho, a todos vocês meu carinho e minha admiração.



***“Se não morre o homem que escreve um livro ou planta
uma árvore, com mais razão não morre o educador,
que semeia a vida e escreve na alma”.***

Bertold Brecht

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido como objetivo de avaliar macroscopicamente e morfológicamente os efeitos da quitosana em orabase associada ou não ao laser de 660 nm, na reparação tecidual. Neste estudo experimental foram utilizados 75 ratos, machos, da linhagem Wistar, divididos aleatoriamente em 5 grupos: G1 (controle), G2 (orabase), G3 (orabase de quitosana 2%), G4 (laser) e G5 (laser + quitosana em orabase à 2%). Foram confeccionados feridas no dorso dos animais medindo em torno de 5 mm. Foram obedecidos os períodos de observação e sacrifício com 3, 7 e 14 dias e os resultados foram submetidos a análise estatística. A partir dos resultados pode se concluir que: no período inicial da cicatrização, o uso da quitosana em orabase associado Laserterapia promoveu, macroscopicamente, maior contração da ferida e melhores padrões de cicatrização; O grupo tratado com quitosana apresentou resultados semelhantes, ao grupo tratado com Laserterapia, sobre o controle da inflamação, formação de crosta e angiogênese, além de promover maior precocidade na reepitelização. O tratamento com quitosana em orabase apresentou graus de colagenização semelhantes à Laserterapia.

Descritores: Quitosana, Quitina, Laser, Reparo Tecidual.

ABSTRACT

The present work was developed as objective to evaluate macroscopically and morphologically the effect of the chitosan in orabase, associated or not to the 660 nm laser in the tissue repair. In this experimental study were used 75 rats, male, of the Wistar strain, randomly divided into 5 groups: G1 (control), G2 (orabase), G3 (orabase of chitosan 2%), G4 (laser) and G5 (laser + orabase of chitosan 2%). They had been confectioned wounded in the back of the animals measuring around 5 mm and had been obeyed to the periods of observation and sacrifice with 3, 7 and 14. The results were subjected to statistical analysis. From the results can be concluded that in the initial period of healing, the use of chitosan in orabase associated laser promoted, macroscopically, greater contraction of the wound and better standards of healing. The group treated with chitosan showed similar results, as the group treated with Laser, about the control of inflammation, formation of crust and angiogenesis, in addition to promoting greater early in reepithelialization. Treatment with chitosan in orabase showed levels of collagen similar to the laser.

Key Words: Chitosan, Quitin, Laser, tissue repair.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1- Estrutura da Quitina e da Quitosana.	31
Fig. 2 – Acondicionamento dos Animais.	51
Fig. 3 – Acondicionamento dos Fármacos.	53
Fig. 4 – Mensuração da Massa Corporal dos Animais.	54
Fig. 5 – Aplicação dos Fármacos nas Feridas.	55
Fig. 6 – Contenção dos Animais.	55
Fig. 7 – Material para Aplicação dos Fármacos Sobre as Feridas.	56
Fig. 8 - Irradiação do Laser.	57
Fig. 9 – Remoção do espécime.	58
Fig. 10 – Aferição do Diâmetro da Ferida com Paquímetro.	60
Fig. 11 – Presença de halo hiperêmico e fundo sangrante (G1A).	65
Fig. 12 – Aspecto da borda necrótica (G1A).	66
Fig.13 – Aspecto da ausência de borda necrótica (G3A)	67
Fig. 14 – Presença da crosta (G4A)	67
Fig. 15 – Ausência da crosta (G5C).	68
Fig. 16 – Presença de crosta intensa, com 03 dias, em HE (Escala de referência 100 µm).	72
Fig. 17 – Presença de crosta intensa, com 03 dias, em HE (Maior aumento, escala de referência 100 µm).	72
Fig. 18 – Ausência de crosta, com 07 dias, em HE (Escala de referência 100 µm).	73
Fig. 19 – Presença intensa de células inflamatórias, na crosta, 03 dias, em HE (Escala de referência 100 µm).	75
Fig. 20 – Presença intensa de angiogênese, 03 dias, em HE (Escala de referência 100 µm).	76
Fig. 21 – Presença intensa de tecido de granulação, 03 dias, em HE (Escala de referência 100 µm).	79

Fig. 22 – Colagenização discreta, em TM, Grupo Controle com 03 dias (Escala de referência 100 µm)	81
Fig. 23 – Colagenização discreta, em TM, Grupo Controle com 07 dias (Escala de referência 100 µm)	82
Fig. 24 – Colagenização moderada, em TM, Grupo Controle com 14 dias (Escala de referência 100 µm)	82
Fig. 25 – Colagenização discreta, em TM, Grupo Orabase com 03 dias (Escala de referência 100 µm)	82
Fig. 26 – Colagenização moderada, em TM, Grupo Orabase 07 dias (Escala de referência 100 µm)	83
Fig. 27 – Colagenização moderada, em TM, Grupo Orabase com 14 dias (Escala de referência 100 µm)	83
Fig. 28 – Colagenização discreta /moderada, em TM, Grupo Quitosana com 03 dias (Escala de referência 100 µm)	83
Fig. 29 – Colagenização moderada/intensa, em TM, Grupo Quitosana com 07 dias (Escala de referência 100 µm)	84
Fig. 30 – Colagenização intensa, em TM, Grupo Quitosana com 14 dias (Escala de referência 100 µm).	84
Fig. 31 – Colagenização discreta /moderada, em TM, Grupo Laser com 03 dias (Escala de referência 100 µm)	84
Fig. 32 – Colagenização intensa, em TM, Grupo Laser com 07 dias (Escala de referência 100 µm).	85
Fig. 33 – Colagenização intensa, em TM, Grupo Laser com 14 dias (Escala de referência 100 µm).	85
Fig. 34 – Colagenização discreta /moderada, em TM, Grupo Quitosana e Laser com 03 dias (Escala de referência 100 µm).	85
Fig. 35 – Colagenização discreta /moderada, em TM, Grupo Quitosana e Laser com 14 dias (Escala de referência 100 µm).	86
Fig. 36 – Colagenização intensa, em TM, Grupo Quitosana e Laser com 14 dias (Escala de referência 100 µm).	86
Fig. 37 – Reepitelização da Ferida, em HE, com 14 dias (Escala de referência 100 µm).	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da infecção segundo o grupo por período.	63
Tabela 2 – Avaliação do halo hiperêmico segundo o grupo por período.	64
Tabela 3 – Avaliação da borda necrótica segundo o grupo por período.	66
Tabela 4 – Avaliação da crosta segundo o grupo por período.	68
Tabela 5 – Avaliação do fundo sangrante segundo o grupo por período.	69
Tabela 6 – Avaliação da contração da ferida segundo o grupo por período.	70
Tabela 7 – Avaliação da crosta segundo o grupo por período.	72
Tabela 8 – Avaliação da inflamação segundo o grupo por período.	74
Tabela 9 – Avaliação da angiogênese segundo o grupo por período.	76
Tabela 10 – Avaliação da angiogênese segundo o período por grupo.	77
Tabela 11 – Avaliação do tecido de granulação segundo o grupo por período.	79
Tabela 12 – Avaliação do colagenização segundo o grupo por período.	81
Tabela 13 – Avaliação da reepitelização segundo o período por grupo.	87
Tabela 14 – Avaliação da reepitelização segundo o grupo por período	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Médias do percentual de contração de ferida segundo o tempo de avaliação e o grupo.

70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão da amostra de acordo com os grupos.	51
Quadro 2 – Padronização da Laserterapia nos subgrupos.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina Trifosfato.

C3: Convertase.

Fig: Figura.

IL: Interleucina.

HE: Hematoxilina e Eosina.

LASER: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (luz por emissão estimulada de radiação).

LD 50: Dose letal, capaz de matar 50% dos animais testados.

LEA: Laboratório de Experimentação Animal.

LILT: Low Intensity Laser Therapy (Terapia a Laser de Baixa Intensidade).

LSD: Least significance differences (Mínimo de Diferença Significante)

LTF: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

MIP-1: Proteína Inflamatória do Macrófago.

PAF: Fator Ativador de Plaquetas.

PMN: Polimorfonucleares.

PVC: Poli Cloreto de Vinila.

SC: Sistema Complemento.

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences (Pacote Estatístico para as Ciências Sociais).

UFPB: Universidade Federal da Paraíba.

TM: Tricrômico de Masson.

TNF: Fator de Necrose Tumoral.

TGF: Fator de Crescimento Transformador

LISTA DE SÍMBOLOS

I: algarismo romano (um).

III: algarismo romano (três).

%: percentual.

α : letra grega “alfa”.

β : letra grega “beta”.

γ : letra grega “gama”.

λ : comprimento de onda.

cc: centímetro cúbico.

J: Joule.

J/cm²: Joule por centímetro quadrado.

J/m²: Joule por metro quadrado.

mm: milímetros.

μm : micra

nm: nanômetro.

pH: potencial de Hidrogênio.

s: unidade de tempo (segundo)

®: marca registrada

W: Watts.

W/cm²: Watts por centímetro quadrado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Histórico	24
2.2 Reparação Tecidual	26
2.3 Quitosana e Suas Propriedades	31
2.4 Laser e Suas Propriedades	39
3 Proposição	48
3.1 Objetivo Geral	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 Caracterização da Amostra.	50
4.2 Acondicionamento dos Animais	50
4.3 Divisão dos Grupos de Estudo	50
4.4 Identificação das Gaiolas e dos Animais	52
4.5 Obtenção da Orabase e da Quitosana	52
4.6 Anestesia	53
4.7 Tricotomia e Produção da Ferida Cutânea	54
4.8 Aplicação dos Fármacos nas Feridas	55
4.9 Irradiação da Luz Laser	56
4.10 Ciclo de Sacrifício dos Animais	57

4.11 Obtenção e Processamento Histotécnico dos Espécimes	58
4.12 Avaliação Macroscópica das Feridas	59
4.13 Avaliação Microscópicas das Feridas	60
4.14 Plano de Análise Estatística	61
4.15 Considerações Éticas	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Avaliação Macroscópica	63
5.2 Avaliação Morfológica	71
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÃO	103
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICE	117
ANEXOS	119

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO¹

Úlceras ou ulcerações são lesões fundamentais caracterizadas pela perda da camada do tecido epitelial, o que torna o tecido conjuntivo subjacente desprotegido e vulnerável às agressões do meio externo. Histologicamente observa-se a ausência do tecido epitelial e o tecido conjuntivo exibe um intenso infiltrado inflamatório que pode variar de agudo a crônico de acordo com o tipo de célula encontrada (DRIESSEN, et al., 2003). Estas, segundo Silva, et al. (2000) podem ser classificadas como agudas, recorrentes ou crônicas.

Existem vários fatores desencadeantes citados na literatura que explicam a causa das úlceras: aspectos hereditários, psicossomáticos, infecciosos, hormonais (menstruação, gravidez ou período pós-menopausa), traumatismos, estresse, alergia alimentar, deficiências nutricionais (ferro, vitamina B12 e ácido fólico), alterações hematológicas, e em casos de ex-fumantes, pois com a suspensão do tabaco a mucosa apresenta-se mais delgada e sensível, aumentando a frequência de úlcera aftosa recorrente. A hipótese que mais prevalece é da teoria do complexo auto-imune sendo a mais significativa e aceita hoje. Contudo, por não ter uma uniformidade dos seus efeitos na população, a etiologia ainda é desconhecida (BORDINI, et al., 2001).

¹Trabalho elaborado de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT): NBR 6023:2002 Referências; NBR 6024:2003 Numeração; NBR 6027:2003 Sumário; NBR: 6028:2003 Resumos; NBR 6032:1989 Abreviações; NBR 10520: 2002 Informação e Documentação - Apresentações de citações e NBR 14724:2002 informações e documentação - Trabalhos acadêmicos.

Pacientes portadores de úlceras bucais sejam elas agudas ou crônicas, de origem traumática ou sistêmica, apresentam quadro clínico doloroso, que muitas vezes dificulta a própria alimentação e, por vezes, a higienização bucal.

Quando tecidos moles são escoriados e o tecido conjuntivo é exposto, ocorre a formação de úlceras, tanto em pele quanto em mucosas, seguindo uma seqüência específica de processos com o objetivo de reparar o tecido lesionado (ALEMDAROGLU, et al., 2006).

No processo de reparação tecidual, a regeneração e a cicatrização devem ser consideradas como eventos distintos, que agem em conjunto a fim de restaurar a estrutura anatômica e a função da região afetada. Este fenômeno envolve vários fatores e o desequilíbrio ou a ausência de compostos (mediadores químicos, elementos figurados do sangue, matriz extracelular e células parenquimatosas), principalmente os envolvidos na formação do colágeno, compromete o resultado final da reparação (BLANES, 2004).

As tentativas do homem de intervir no processo de cicatrização de feridas remontam desde a antiguidade. A quitosana vem sendo utilizada como método alternativo para aceleração da reparação tecidual desde 1957. Devido as suas propriedades biológicas, eficácia no tratamento de lesões ulceradas e por ser economicamente viável, a quitosana vem conquistando cada vez mais espaço na indústria farmacêutica, sendo utilizada das mais diferentes formas (JENO, et al., 2001).

No mesmo sentido, o Laser vem despontando como uma importante ferramenta de trabalho. A Laserterapia tem demonstrado em vários estudos sua eficiência na cicatrização de úlceras cutâneas e mucosas, agindo na síntese protéica do colágeno, auxiliando na remodelação e na diminuição da sensação dolorosa das feridas (BOURGUIGNON-FILHO; et al., 2005).

Apesar de todas as vantagens encontradas no uso da quitosana e do Laser, ambos são uma realidade ainda pouco conhecida pelos profissionais da odontologia. Não existindo relatos ou experimentos da quitosana em orabase ou de sua ação conjunta com a Laserterapia.

Buscamos através deste trabalho, verificar a presença de efeitos precoces da ação da quitosana na forma de orabase e da Laserterapia de baixa potência sobre os processos reparativos em lesões cutâneas produzidas em ratos.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Há séculos o homem vem evoluindo no tratamento das feridas. Na pré-história, vários agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas (ANDRADE, et al., 1999).

Na Mesopotâmia, elas eram lavadas com água ou leite, e o curativo era realizado com mel ou resina. Lã de carneiro, folhas e cascas de árvore eram utilizadas para sua cobertura. Os egípcios perceberam que uma ferida fechada cicatrizava mais rápido do que aberta, por isso, utilizavam tiras de pano para manter unidas as margens da lesão. Hipócrates sugeria que as feridas contusas fossem tratadas com calor e pomadas para promover a supuração, remover material necrótico e reduzir a inflamação (BLANES, 2004).

No início da era cristã, Celsus preconizava o fechamento primário das feridas recentes e desbridamento das contaminadas para posteriormente poderem ser suturadas. Além disso, classificou os diferentes tipos de lesões de pele e deu detalhes do tratamento de cada uma delas. A introdução das armas de fogo nas guerras européias, no século XIV, levou ao surgimento de um novo tipo de ferida de cura mais difícil, e Ambroise Paré, na Renascença reformulou seu tratamento. O avanço da química trouxe a descoberta de compostos de cloro e iodo, que foram utilizados para limpeza do material e da pele nos séculos XVIII e XIX. Nos últimos anos, muito já foi descoberto sobre a fisiologia

do reparo tecidual e formação das cicatrizes, apesar disto, muitas pesquisas continuam sendo realizadas em busca de novos fármacos, e da compreensão de suas interações com os fenômenos moleculares na reparação tecidual (BLANES, 2004).

A descoberta da quitina ocorreu em 1811, pelo francês Henri Braconnot, inicialmente isolada em cogumelos e sendo denominada fungina. Em 1823, Odier isolou um resíduo insolúvel de insetos, chamando-o de quitina, sendo este nome derivado da palavra grega “Chiton”, que significa carapaça ou capa protetora. Em 1843, Payen verificou a presença de nitrogênio na composição da quitina. Posteriormente, em 1859, a quitosana foi descoberta por Rouget, através da ebulição de uma solução de hidróxido de potássio com quitina, sendo a quitina a precursora da quitosana (SHAHID; ARACHCHI; JEVON, 1999).

Já o Laser, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, originou-se da abreviação de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, cuja teoria é do físico Albert Einstein, que em seu artigo “Zur Quantum Theories der Strahlung”, de 1917, expôs os princípios físicos da emissão estimulada (fenômeno Laser), sendo este classificado como de “alta potência” (cirúrgico) e em “baixa potência” (terapêutico) (ORTIZ, 2001).

2.2 A REPARAÇÃO TECIDUAL

Ao longo dos anos, muito se tem pesquisado sobre o processo de reparação das feridas, objetivando esclarecimentos sobre o processo de reparo normal, bem como fatores que alteram este processo, sejam eles locais ou sistêmicos (BLANES, 2004).

Danos tissulares de qualquer natureza, seja física química ou biológica, desencadeiam de imediato uma série de eventos que de forma simplificada se traduzem como rubor, tumor, calor e dor. Estes sinais resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química feita por estruturas das células rompidas (porções da membrana celular e organelas), fragmentos dos elementos inertes dos tecidos (colágenos, elastinas, fibronectinas, e outros), proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados ou neo-sintetizados como, por exemplo, o (PAF) fator ativador de plaquetas (BALBINO; PEREIRA L; CURTI, 2005).

A reparação tecidual é um processo complexo e envolve vários mecanismos, como: coagulação, inflamação, síntese e deposição de matriz, angiogênese, epitelização, contração e remodelação (ALEMDAROGLU, et al., 2006).

No processo de reparação, a regeneração e a cicatrização de feridas devem ser consideradas como eventos distintos. Na regeneração, a reposição

tecidual é realizada por meio de células do mesmo tipo das células perdidas no momento da lesão, sendo assim, se houver pouca alteração no estroma, a regeneração será completa. Na cicatrização, entretanto, o tecido lesado é substituído por um tecido conjuntivo próprio que é a cicatriz (GUYTON, 1998).

A cicatrização compreende várias fases complexas interdependentes e simultâneas. Na análise morfológica, identificam-se três fases consecutivas onde ocorre um dinamismo com sobreposição entre elas. Estas fases podem ser divididas didaticamente em três estágios importantes: inflamação, proliferação e remodelação (ROBBINS, et al., 2005).

A coagulação sanguínea acontece imediatamente após o surgimento da ferida, dependendo da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Ocorre a liberação de substâncias vasoativas, proteínas adesivas, proteases e fatores de crescimento, contribuindo para a fase seguinte. A formação do coagulo além de coaptar as bordas da ferida, oferece matriz provisória em que os fibroblastos, os queratinócitos e células endoteliais possam migrar e atuar na ferida. A fase inflamatória depende de inúmeros mediadores químicos e das células inflamatórias como leucócitos, polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. Essa fase varia de 3 a 5 dias, permanecendo os polimorfonucleares e os macrófagos por 3 a 10 dias, fagocitando bactérias, removendo materiais estranhos e facilitando a formação do tecido de granulação (BLANES, 2004).

A fase inflamatória se inicia imediatamente após a lesão, ocorrendo vasoconstrição por 5 a 10 minutos. Essa vasoconstrição reflexa propicia o

fechamento dos vasos e favorece a hemostasia. Posteriormente, as células endoteliais retraem-se e perdem suas conexões, aumentando a permeabilidade, permitindo a passagem de elementos sanguíneos para a ferida como plasma, eritrócitos e leucócitos, através do fenômeno de diapedese. A vasodilatação com extravasamento para o exterior dos vasos forma um exsudato causando calor, rubor e dor. Sua intensidade correlaciona-se com o tipo e grau de agressão. Juntamente com todas essas alterações, que correspondem a resposta vascular, existe uma resposta celular. São importantes nesta fase os neutrófilos, responsáveis pela eliminação das bactérias e tecidos desvitalizados e os monócitos que se transformam em macrófagos e auxiliam na fagocitose. Após o trauma, são liberados mediadores celulares que estimulam a elaboração de substâncias, promovendo o processo inflamatório tais como: histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, tromboxanos, linfocinas e interleucinas (GUYTON, 1998; STEENKAMP, et al., 2004; PARK e BARBUL, 2004).

A fase proliferativa ou fibroplástica é responsável pelo fechamento da ferida. Ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio, formando o tecido de granulação, que é composto por fibroblastos, que surgem por volta do segundo e terceiro dia após o trauma, e vasos sanguíneos neoformados. O fibrinogênio do exsudato inflamatório transforma-se em fibrina, forma uma rede, onde os fibroblastos depositam-se e passam a multiplicar-se e a secretar os componentes protéicos do tecido cicatricial. Concomitante a esta fibroplasia ocorre intensa proliferação vascular. O tecido formado por fibroblastos, substâncias e vasos denomina-se tecido de granulação, tem aspecto granuloso

e avermelhado. O miofibroblasto é uma célula que está presente no tecido de granulação e confere a capacidade contrátil, facilitando a epitelização (RESENDE; PEREIRA; CASTRO, 2005).

A atividade mitótica do fibroblasto praticamente desaparece em torno do 15º dia, passando a secretar as proteínas presentes no tecido de granulação, produzindo componentes da substância fundamental e colágeno. A substância fundamental é composta por água, eletrólitos e glicosaminoglicanos, têm aspecto semelhante a um gel e está distribuído entre as fibras do tecido conjuntivo. A formação do epitélio é outro fenômeno que acontece na fase de fibroplasia. A epitelização faz-se pelo aumento de tamanho e da migração de células da camada basal da epiderme por sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente (CARVALHO, et al., 2003).

A fase de maturação é caracterizada por eventos importantes: deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e regressão endotelial (CARVALHO, et al., 2003).

A remodelação do colágeno inicia-se na formação do tecido de granulação e persiste por meses após a reepitelização. As colagenases e outras proteínas produzidas por macrófagos e células epidérmicas dão direção correta às fibras colágenas difusas. Há diminuição de todos os elementos celulares, inclusive fibroblastos. A regressão endotelial ocorre através da diminuição progressiva dos vasos neoformados. A cicatriz torna-se menos

espessa passando de uma coloração rosada para esbranquiçada (GUYTON, 1998).

Alguns fatores inibem o processo de cicatrização, tais como infecção, desnutrição, hipóxia tecidual, envelhecimento, radiação ionizante e medicamentos, como quimioterápicos e glicocorticóides (WITTE; BARBUL, 1997).

2.3 A QUITOSANA E SUAS PROPRIEDADES

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de β (1 \rightarrow 4) glucosamina (2-amino-2-deoxi-D-glucose) e da N-acetil-D-glucosamina (2-acetamino-2deoxi-D-glucose), que é obtida a partir da desacetilização da quitina (UENO, et al., 1999). Este é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos (SENEL e McCLURE, 2004; FREIER, et al., 2005), podendo também estar naturalmente presente na parede celular de alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (KAFETZOULOS; MARTINOV; BOURIOTIS, 1993).

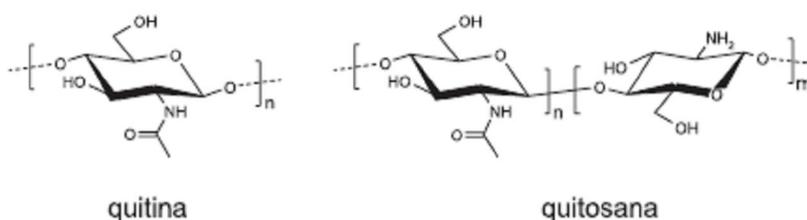


Fig. 1- Estrutura da Quitina e da Quitosana (HÉLIO, et al., 2006)

A quitina pode ser encontrada de três formas: α , β e γ , que diferem no arranjo de suas cadeias. A α encontrada principalmente em crustáceos insetos e fungos, apresenta um arranjo alternado de cadeias paralelas e antiparalelas. A ocorrência da forma β é menos comum, sendo encontrada exclusivamente em organismos marinhos como lulas e algas microscópicas e possui um arranjo em cadeias paralelas. A forma γ ainda não foi completamente

caracterizada, mas sugeriu-se um arranjo de duas cadeias paralelas e antiparalelas. A forma α é mais estável que as outras duas β e γ , mas estas últimas podem ser convertidas à forma α através de tratamentos adequados (SIGINI, 1998).

A quitosana é insolúvel em água ou em soluções com pH neutro e alcalino, mas pode ser solúvel em ácidos inorgânicos e orgânicos como: ácido glutâmico, hidrocloreídrico, láctico e ácido acético (SENEL; McCLURE, 2004).

A história da quitina e seus derivados utilizados como aceleradores da reparação tecidual teve início com os estudos de Pruden, et al. (1957), que verificaram que a cartilagem de tubarão acelerava a reparação tecidual e sugeriram que a glucosamina, que é um dos compostos da cartilagem, era responsável por este fenômeno. Posteriormente foi identificado a N-acetil-D-glucosamina, que é um derivado da glucosamina, seria o acelerador da reparação. Já com o uso tópico da quitosana foi percebido que este polissacarídeo acelerava a reparação tecidual devido ao aumento da granulação. Em grandes ferimentos o processo de formação do novo tecido é denominado granulação, que precede a epitelização (UENO, et al., 2001).

O estudo e o emprego da quitina e quitosana e as pesquisas por novas aplicações têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura e indústria de alimentos, mas, especialmente, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos e biomateriais, tais como

géis, filmes, membranas poliméricas (SILVA, et al., 2006) e colutórios (SANO, et al., 2003).

Uma grande variedade de propriedades físico-químicas e biológicas está associadas à quitosana: biocompatível, biodegradável, bioadesivo, não tóxico, não carcinogênico (JAYAKUMARA, et al., 2005), ação aceleradora do reparo tecidual, até mesmo em regiões previamente irradiadas com Raio-X (UENO, et al., 2007), ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (OKAMOTO, et al., 2002), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivaries* (SHIMOJOH; FUKUSHIMA; KURITAS, 1996), *Candida* (KOIDE, 1998; AKSUNGUR, et al., 2004), *Porphyromonas gingivalis* (IKINCI, et al., 2002), ação hemostática, analgésica, osteoindutora, imuno-moduladora (HÉLIO, et al., 2006), anti-úlceras (ITO; BAN; ISHIHARA, 2000), entre outras características; sendo bastante utilizada como auxiliar na reparação de grandes feridas (DENG, et al., 2007).

Alemdaroglu, et al. (2006) comprovaram a eficácia do gel de quitosana contendo fator de crescimento epidérmico, na reparação de lesões provocadas por cauterização em pele de ratos. De acordo com os autores, o padrão de epitelização foi melhor e mais rápido no grupo em que o gel de quitosana foi utilizado.

O colutório de quitosana a 0,5% possui eficácia na redução da formação de placa e promove a diminuição significativa das colônias de *Streptococcus mutans* após 14 dias de uso (SANO, et al., 2003).

Estudos em ratos, comparando o desempenho da quitosana de diferentes pesos moleculares em úlceras gástricas, comprovaram que as fórmulas com baixo peso molecular apresentaram maior potencial tanto na proteção da mucosa como na promoção do reparo. O aumento do muco gástrico promovido pela quitosana pode, em parte, estar relacionado com o seu efeito anti-úlceras (ITO; BAN; ISHIARA, 1999).

A quitosana na forma de gel atua como um protetor ideal em ferimentos extensos, devido as suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, hemostasia, anti-infecciosa e a mais importante de todas a, aceleração da reparação tecidual (ISHIHARA, et al., 2002).

O gel de quitosana possui propriedades adesivas e antimicrobianas contra a *Porphyromonas gingivalis*, podendo também servir como veículo para administração de drogas antimicrobianas como a clorexidina na terapia periodontal (IKINCI, et al., 2002).

A propriedade imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago e explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a biodegradabilidade desse polímero no organismo (UENO, et al., 2001).

Quando a quitosana é aplicada no organismo é biodegradada por enzimas (quitinase e quitosanase) e conseqüentemente é transformada em oligômeros e monômeros. Estudos prévios verificaram que não apenas a

quitosana, mas também seus oligômeros e monômeros influenciam a migração de fibroblastos e células endoteliais, influenciando a reparação tecidual *in vivo*. Entretanto, as relações entre as propriedades químicas da quitosana e a reparação tecidual permanecem não esclarecidas (MINAGAWA, et al., 2007).

Em estudos realizados em cães, Okamoto (1995) verificou que aplicações tópicas de quitosana aceleravam a reepitelização e a regeneração neurovascular, assim como promoviam o aumento da migração de células polimorfonucleares.

Na fase inicial de reparação da ferida, o infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (PMN) remove os agentes estranhos na área da ferida. A quitosana acelera a infiltração PMN, conseqüentemente acelerando o reparo. Estudos recentes demonstram que os PMN respondem produzindo citocinas em adição a sua função fagocitária. Citocinas derivadas de PMN realizam um importante papel de iniciação e controle da resposta inflamatória (UENO, et al, 1999).

Segundo Ueno, et al (1999) a quitosana atua na reparação tecidual acelerando o infiltrado de células PMN no local da injúria, aumentando a densidade da fibrina e ativando a migração de fibroblastos para a área lesada, estimulando a proliferação de macrófagos, fibroblastos e a produção de colágeno tipo III.

Além de acelerar a infiltração de polimorfonucleares para área da ferida, que por sua vez secretam mediadores como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL) 1, IL 8, IL 12, proteína inflamatória do macrófago (MIP-1 α e MIP-1 β) como adição a fagocitose. A quitosana acelera a produção de osteopontina pelos PMN, uma fosfoproteína glicosilada, que desempenha importante função durante o processo de granulação da reação inflamatória, ligando vários tipos de células (UENO, et al., 2001).

A quitosana influencia a ativação do sistema complemento (SC), essa ativação pode ser determinada pelo aumento da concentração de C3 no plasma, isto faz com que os PMN tenham a sua função melhorada direta e indiretamente pela quitosana, tanto devido a mediação química para produção de PMN como pelo aumento da ação fagocitária destas células. Os macrófagos apresentam receptores que reconhecem as unidades β (1 \rightarrow 4) glucosamina e da N-acetil-D-glucosamina da quitosana, sendo assim estimulados para migrarem para o local da ferida. A quitosana promove ainda estimulação para os macrófagos produzirem citocinas e fatores de crescimento que influenciam na reparação tecidual. Com o aumento da granulação durante as fases primárias do reparo tecidual devido a ação da quitosana, ocorre também maior proliferação de fibroblastos e síntese de matriz extracelular pela ação direta dos fatores de crescimento (UENO, et al., 2007).

Em pesquisas experimentais com animais, verificou-se que a quitosana influencia todos os estágios da reparação tecidual. A atividade hemostática da quitosana pode ser percebida nas fases iniciais da reparação. Ela interage e

regula a migração de neutrófilos e a ativação dos macrófagos no processo de reparo, assim como a fibroplasia e reepitelização. Durante as fases de inflamação, a quitosana acelera a infiltração de células inflamatórias, como os neutrófilos, além de promover a remoção de corpos estranhos. Simultaneamente, inicia-se a fibroplasia. Geralmente em feridas grandes abertas, verifica-se a formação de cicatrizes hipertróficas, assim como o desequilíbrio entre a formação de colágeno tipo I e III. Com o uso da quitosana não se percebe estes fenômenos (HOWLING, et al., 2001).

A segurança do uso da quitosana foi demonstrada em experimentos realizados em ratos e cães, onde foram testados aditivos em alimentos e outros materiais cosméticos a base de quitosana. No teste de toxicidade de dose letal (LD 50) foi verificado efeito tóxico em dose acima de 1,5g/kg administrada por via oral, 10g/kg pela via subcutânea e 5,2g/kg pela via peritoneal, em ratos. Entretanto, um efeito característico foi verificado em cães: várias concentrações de quitosana (10 – 200/kg) foram administradas pela via subcutânea. Anorexia e mortalidade foram observadas com o uso de doses acima de 50mg/kg e 150mg/kg, respectivamente. Após necropsia foi observada pneumonia em todos os animais que foram a óbito, além de leucocitose e demais discrasias. Foi confirmado o quadro de pneumonia letal nos cães, com o uso da quitosana (UENO; et al, 2001).

De acordo com Shigehiro Hirano (1990), a toxicidade da quitosana é menor do que a glicose (açúcar comum) ou sacarose. A dose letal de glicose em mamíferos é da ordem de 8 a 12 gramas, por quilograma de peso corporal,

enquanto que a Quitosana é 18 gramas, não apresentando qualquer sinal de toxicidade ou mortalidade. Esta propriedade é especialmente interessante para o emprego da quitosana em fármacos a serem aplicados em feridas abertas e em úlceras.

2.4 LASER E SUAS PROPRIEDADES

O Laser é produzido a partir de elétrons ou moléculas que sofrem salto quântico quando previamente estimulados, passando de baixo para alto estado de energia. Neste processo, ocorre a emissão de ondas na mesma frequência, comprimento e direção, originando o feixe de Laser que possui mais potência que outras radiações ópticas não modificadas ou estimuladas (ORTIZ, et al., 2001).

Quando um fóton ou partícula energética de luz é direcionado a um átomo, ele pode ser absorvido, refletido ou transmitido. Se a partícula é transmitida ou refletida não há mudança da energia luminosa. Entretanto, se o fóton é absorvido, a energia elétrica no orbital é aumentada. Ocorre mudança na posição de um ou mais elétrons, partindo de uma órbita interna para uma mais periférica. No momento em que o elétron se encontra num estado de energia mais alto, diz-se que ele está excitado. Este estado permanece por um período muito curto (cerca de 10^{-8} s), ao retornar a sua órbita original elimina sua energia na forma de fóton de luz, exatamente com as mesmas características do fóton incidente. Essa emissão estimulada de radiação, em pouco tempo, ganha proporções relevantes na ativação atômica, produzindo uma constante emissão de Laser (LOW; REED, 2001).

Para produzir o feixe luminoso, as fontes de luz Laser dependem de alguns componentes essenciais. Um deles é a fonte de energia que permita o bombeamento do meio ativo para o estímulo inicial da excitação atômica,

possibilitando a seqüência na produção da emissão estimulada da radiação. Esta energia pode ser entregue de vários modos: energia elétrica, luminosa ou por outro Laser. O meio ativo é constituído por materiais sólidos, gasosos, líquidos e semi-sólidos, que podem produzir a radiação Laser (GENOVESE, 2000). Outro componente fundamental da produção de radiação é a cavidade ou câmara ressonante óptica, que é constituída por um tubo reto contendo um meio ativo. Em cada extremidade do tubo existem espelhos, sendo um deles totalmente refletivo e outro uma saída de luz semi-refletiva. Quando elétrons são estimulados por uma fonte de energia externa numa rápida taxa, os fótons resultantes são alinhados na câmara refletora. Quando eles alcançam o espelho semi-transparente, são refletidos de volta ao espelho refletor. O constante retorno e a forte reflexão entre os espelhos promovem a ampliação da luz. Com a continuidade do processo, mais e mais fótons são estimulados até que a câmara não pode mais conter o nível energético e libera a emissão da luz Laser (CORAZZA, 2005).

O Laser possui características que a diferem dos diferentes tipos de fontes de luz. Toda luz, em geral, pode interagir com a matéria sendo refletida, refratada ou absorvida (CORAZZA, 2005). O Laser é uma luz amplificada produzida por radiação eletromagnética que se manifesta como luz monocromática; enquanto a luz branca (policromática) emitida pelas lâmpadas comuns, apresenta ondas no mesmo comprimento e nas mesmas fases ondulatórias, e, portanto, somam energia (ROCHA, 2004).

As propriedades que diferem o Laser das fontes luminosas incandescentes e fluorescentes são a monocromaticidade, coerência, colimação e a polarização (ORTIZ, et al., 2001).

A monocromaticidade indica que cada meio gerador de Laser corresponde a um comprimento de onda, essa propriedade é considerada o atributo mais importante da luz Laser, determina quais biomoléculas absorverão a radiação incidente, portanto, a interação fotobiológica e os efeitos terapêuticos da Laserterapia. A colimação refere-se ao paralelismo do feixe, mantendo um pequeno diâmetro de saída por uma distância relativamente grande, também denominada unidirecionalidade. Genovese (2000) afirma que a luz colimada permite concentrar a energia em um único ponto focal, mantida a potência óptica mesmo em distâncias consideráveis. A coerência refere-se à sincronicidade das ondas de luz, que pode ser temporal ou espacial, quando os fótons estão ajustados em um plano espacial paralelo entre si. A polaridade ocorre quando as ondas de luz estão todas orientadas em um só plano, assim vibrando em seus campos elétricos em uma só direção, podendo ser linear ou circular (ORTIZ, et al., 2001).

A densidade de potência ou irradiância é a potência de saída da luz, medida em watts por centímetro quadrado (W/cm^2), por área irradiada, já a fluência ou densidade de energia ou dose é a energia total transmitida por um feixe de Laser, por unidade de área, é medida em Joule por metro quadrado (J/m^2) ou Joule por centímetro quadrado (J/cm^2) (ORTIZ, et al, 2001). A diferença entre os vários tipos de Lasers é dada pelo comprimento de onda.

Quanto menor o comprimento de onda, maior sua ação e poder de penetração. Os Lasers podem ser contínuos ou pulsáteis. Sua potência é expressa em watts (W), variando de deciwatts a megawatts e a energia medida em joules por centímetro quadrado (J/cm²), sendo igual à potência multiplicada pelo tempo de aplicação (DALLAN; OLIVEIRA, 2000).

O Laser terapêutico de baixa intensidade (LILT) ganhou aplicabilidade clínica após os estudos realizados por Mester e colaboradores no início dos anos 70. Foi verificada a efetividade da cicatrização das feridas mediante análise histológicas, imunológicas e testes funcionais. Os resultados demonstraram melhora na síntese do colágeno, indução da neovascularização e melhora da síntese de enzimas em toda área irradiada (SIMUNOVIC, et al, 2000; VINCK, et al, 2003).

Tecnologias luminosas de baixa intensidade e monocromáticas exercem elevada ação biomoduladora sobre as células irradiadas. As interações da luz com o tecido vivo dependem da penetração, absorção e espalhamento da luz no tecido (CORAZZA, 2005).

A profundidade de penetração no tecido é relacionada ao comprimento de onda da radiação, sendo 0,5 a 2,0 mm para a luz vermelha e de 2,0 a 4,0 mm para infravermelho (LOW; REED, 2001).

A energia do Laser é absorvida apenas por uma fina camada de tecido adjacente além do ponto atingido pela radiação, sendo por esta razão a

recomendação atual para a aplicação de Lasers de baixo poder de penetração, com comprimentos de onda entre 640 a 940nm, é que esta aplicação seja realizada de modo pontual à lesão (PARIZOTTO; BARANAUSKAS, 1998).

A absorção da radiação equivale à energia transportada pelo fóton, sendo esta absorção específica para comprimento de onda o que determina qual o tipo de tecido irá preferencialmente absorver a radiação incidente e a profundidade de penetração desta energia (ROCHA, 2004).

O espalhamento é a mudança de direção da propagação da luz, enquanto esta transita nos tecidos, devendo-se a variabilidade dos índices refratários dos componentes do tecido, com relação à água. O espalhamento provocará o aumento do diâmetro do feixe, durante sua passagem no tecido irradiado, ocorrendo rápida perda da coerência (CORAZZA, 2005).

Os efeitos fisiológicos do Laser podem ser divididos em: efeitos primários, efeitos secundários e efeitos terapêuticos (COLLS, 1984). Os efeitos primários por sua vez podem ser divididos em bioquímico, bioelétrico e bioenergético (ROCHA, 2004):

Efeito Bioquímico: o Laser pode provocar a liberação de substâncias pré-formadas como a histamina, serotonina e bradicinina, bem como modificar reações enzimáticas normais, tanto acelerando como retardando essas reações.

Efeito Bioelétrico: a radiação Laser proporciona aumento na produção de ATP, o que promoveria um aumento na eficiência da bomba sódio-potássio, com isso a diferença de potencial elétrico existente entre o interior e o exterior da célula é mantida com melhores resultados.

Efeito Bioenergético: defende-se que o aporte energético da radiação Laser tem capacidade de normalizar o contingente energético que coexiste com o contingente físico dos indivíduos.

Dentre os efeitos secundários ou indiretos da irradiação Laser verifica-se o estímulo à microcirculação, a histamina liberada faz com que os esfíncteres pré-capilares paralisem-se, como consequência ocorre o aumento do fluxo sangüíneo. Estímulo ao trofismo celular, com o estímulo à produção do ATP, a atividade mitótica é também aumentada, o que proporciona em escala tissular, aumento na velocidade de cicatrização e melhor trofismo dos tecidos. Os efeitos terapêuticos do Laser estão relacionados com a ação analgésica, antiinflamatória, antiedematoso e cicatrizante (AMORIM, 2001). Em nível local a Laserterapia de baixa intensidade provoca a redução da inflamação e reabsorção dos exsudatos, favorecendo a eliminação de substâncias alógenas, através do estímulo a microcirculação, que por sua vez garante o aporte de nutrientes e células de defesa para região lesada e permite a drenagem do plasma, que forma o edema (COOLS, 1984).

Ocorre também diminuição da sensação dolorosa, pois o Laser mantém o potencial da membrana dificultando a sua despolarização; normaliza e

mantém o equilíbrio da energia no local da lesão, com o aumento da permeabilidade das vênulas e dilatação das arteríolas, corrigindo os níveis de histamina e bradicinina, além de atuar direta e indiretamente na liberação de beta endorfinas. A interferência na síntese de prostaglandinas, provocada pelo Laser, faz decrescer as alterações proporcionadas pela inflamação (VEÇOSO, 1993).

O efeito de maior destaque na Laserterapia é sua ação cicatrizante, pois o Laser eleva a produção do ATP, promovendo o aumento da atividade mitótica e aumento da síntese de proteína por intermédio da mitocôndria. O estímulo a microcirculação e a formação de novos vasos, à partir de vasos pré-existentes, associado ao aumento da atividade mitótica aceleram a cicatrização dos tecidos (COOLS, 1984).

Baseando-se em estudos prévios, Kitchen e Partridge (1991) relataram efeitos danosos, provocados por crescentes aplicações do Laser de Baixa Potência, sem o devido da dosimetria necessária para determinado tecido a ser irradiado. Assim afirmaram que a densidade média de energia de ou acima, pode resultar em um processo inibidor ou danoso, sendo mais seguro a inibição da dose. Baxter (1998), afirmou que a dose não deve ser mais de 1J por ponto, ou aproximadamente 10 J/cm^2 , entretanto a dose comumente recomendada no leito da ferida é de 4J/cm^2 .

Em Odontologia, o emprego terapêutico dos Lasers de baixa potência é conhecido pela sigla LILT (“Low Intensity Laser Therapy” ou Terapia a Laser

em baixa Intensidade). Dentre esses, os mais conhecidos e estudados no momento são os de diodo (GaAlAs ou GaAs), com comprimento de onda variando de 660 a 909 nm e os de Hélio-Neônio (HeNe), com comprimento de onda de 632 nm (LENHARO, et al, 2006).

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar macroscopicamente e morfológicamente, a ação da quitosana² em orabase na cicatrização tecidual *in vivo*, quando associada ou não ao Laser de 660 nm.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Comparar macroscopicamente a cicatrização tecidual entre os grupos, de acordo com os períodos observacionais.

3.2.2 Comparar microscopicamente a cicatrização tecidual entre os grupos do estudo.

3.2.3 Avaliar microscopicamente, através do Tricrômico de *Masson*, a colagenização em cada grupo.

² Ingredient C

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 75 ratos albinos, da linhagem *Wistar*, adultos, machos, pesando em torno de 350g, procedentes do biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 ACONDICIONAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) do Centro de Ciências da Saúde, em gaiolas individuais, em fotoperíodos de 12 horas, temperatura e umidade controladas (Fig. 2). Os animais receberam água e ração sólida peletizada³, com alto teor de proteína (20 a 27%) *ad libitum*.

4.3 DIVISÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos distintos (GRUPOS 1, 2, 3, 4 e 5), sendo cada um destes, composto por 15 animais, que por sua vez foram divididos em três subgrupos (A, B e C), contendo cinco animais cada, obedecendo os períodos observacionais de três, sete e quatorze dias, respectivamente. Os animais do grupo 1 foram o controle; no grupo 2 foi utilizado a orabase sem quitosana; no grupo 3 orabase com quitosana à 2%; no

³ Labina® - Purina Nutrimentos

grupo 4 foi realizada a laserterapia de baixa potência e no grupo 5 a associação da orabase de quitosana à 2% com a Laserterapia (Quadro 1).



Fig. 2 – Acondicionamento dos Animais.

GRUPOS	DESCRIÇÃO	QUANTIDADE
GRUPO 1 (G1)	CONTROLE	15 ANIMAIS
GRUPO 2 (G2)	ORABASE	15 ANIMAIS
GRUPO 3 (G3)	QUITOSANA 2%	15 ANIMAIS
GRUPO 4 (G4)	LILT	15 ANIMAIS
GRUPO 5 (G5)	QUITOSANA 2 % e LILT	15 ANIMAIS

Quadro 1 – Divisão dos amostra de acordo com os grupos.

O tamanho da amostra configurada esta baseada na literatura científica correlata, na qual se pode constatar um número de animais compatível com a necessidade de resultados confiáveis, do ponto de vista de significância estatística, bem como com o respeito às questões bioéticas. Além disso, estudos anteriores realizados e publicados pelo grupo de pesquisa, corroboram o tamanho da amostra previsto neste estudo (LIMEIRA JÚNIOR, 2003; LIMEIRA JÚNIOR, et al, 2004, QUEIROGA, 2007).

Cada procedimento foi realizado por um único operador, seguindo rigorosamente a mesma metodologia. Cada animal foi identificado de acordo com o grupo, no qual foi incluído.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS GAIOLAS E DOS ANIMAIS

Cada gaiola foi identificada com etiquetas (Apêndice), onde constavam: data de nascimento, cirurgia, sacrifício, massa corporal, nome do experimento e responsáveis pela pesquisa. Os animais foram identificados com marcações na cauda, de forma circular, realizados com caneta piloto de ponta romba, cada anel pintado correspondeu a um número específico.

4.5 OBTENÇÃO DA ORABASE E DA QUITOSANA

Todos os fármacos necessários para este estudo foram obtidos com o auxílio da Farmácia Dilecta^{®4}, ou seja, a orabase pura e a associação da orabase com a quitosana à 2%, evitando-se assim o viés de veículo.

Os produtos foram acondicionados em bisnagas plásticas estéreis apropriadas, rotulados e conservados em temperatura ambiente e ao abrigo do sol até o início do trabalho experimental (Fig. 3).

A opção pela Orabase deveu-se ao fato de padronizar o veículo e por ser de uso consagrado em odontologia. Muito embora a Orabase não seja de uso dermatológico, como foi testada em todos os grupos como veículo,

⁴ Dilecta[®] – Farmácia de Manipulação (João Pessoa – PB).

credencia ao fármaco testado o resultado obtido, já que se evitou o viés de veículo. A escolha da concentração baseou-se na literatura correlata (ALEMDAROGLU, 2006) que comprova a sua eficácia da quitosana a 2% na cicatrização dos tecidos.



Fig. 3 – Acondicionamento dos Fármacos.

4.6 ANESTESIA

Os animais inicialmente foram pesados e posteriormente devolvidos à gaiola de origem (Fig. 4). Conhecido o peso dos animais, eles foram anestesiados conforme preconizado em 2003 por Massone, através da mistura de cloridrato de ketamina⁵ a 5% e cloridrato de xilazina⁶ a 2%, diluídas na proporção de 1:1. A partir desta solução, calculou-se a dose individual de cada animal obedecendo a proporção de 0,2 ml da referida mistura para cada 100g de peso animal, injetadas profundamente na musculatura das patas traseiras. Após um período de latência médio de sete

⁵ Vetanarcol® - König

⁶ Kensol®, König

minutos, foi observada a prostração completa de cada animal, a confirmar pela diurese espontânea comumente apresentada e abolição total de reflexos palpebrais.



Fig. 4 – Mensuração da Massa Corporal dos Animais

4.7 TRICOTOMIA E PRODUÇÃO DA FERIDA CUTÂNEA

Os animais foram mantidos em decúbito dorsal, em seguida realizada a tricotomia manual do dorso, seguindo-se a anti-sepsia do campo operatório com Clorexidina⁷ a 2% e, posteriormente, a excisão cirúrgica de um fragmento de pele, em sua extensão total, medindo em torno de 5 mm, com o auxílio de um punch⁸, padronizando desta forma a ferida e tomando-se o cuidado para que todas as camadas fossem removidas, restando apenas a musculatura subjacente.

⁷ Gluconato aquoso de clorexidina 2% - Manipulação Dilecta[®].

⁸ Bisturi circular – ABC[®]

4.8 APLICAÇÃO DOS FÁRMACOS NAS FERIDAS

Para aplicação dos fármacos (Fig. 5) os animais foram contidos com o auxílio de um dispositivo artesanal (Fig. 6), que consistia em tubo de plástico, no qual foi confeccionado uma abertura onde os animais eram delicadamente inseridos, permanecendo em seu interior durante todo o procedimento, sendo também confeccionado na extremidade orifício para permitir a respiração dos mesmos. A orabase de quitosana foi utilizada diariamente, obedecendo sempre o mesmo horário. Foi padronizada a quantidade do fármaco com o auxílio de seringas de insulina (0,1cc) e com o auxílio de espátulas estéreis os fármacos eram aplicados, cobrindo toda a extensão da ferida com margem ultrapassando as bordas em 5 mm (Fig. 7). As aplicações seguiram até a véspera do último dia de sacrifício dos grupos.



Fig. 5 – Aplicação dos Fármacos nas Feridas.



Fig. 6 – Contenção dos Animais.



Fig. 7 – Material para Aplicação dos Fármacos Sobre as Feridas.

4.9 IRRADIAÇÃO DA LUZ LASER

Para os procedimentos de Laserterapia (Fig. 8), foi utilizado um diodo Laser⁹ GaAlInP com comprimento de onda de 660 nm e potência de 40 mW. Os animais foram irradiados imediatamente após o procedimento cirúrgico e o protocolo de irradiação seguia os respectivos períodos de observação de cada subgrupo. A dose de irradiação foi aplicada em dois pontos padronizados de cada lado da ferida cirúrgica, sendo para cada ponto aplicada uma energia de 2J (25J/cm²). O número de sessões e a quantidade de energia aplicada variaram de acordo com cada subgrupo (Quadro 2).

⁹ Twin Laser (MM Optics[®]) – diodo de Gálio, Alumínio, Índio e Fósforo.



Fig. 8- Irradiação do Laser.

Subgrupo	G4A G5A	G4B G5B	G4C G5C
Sessões	2 sessões	3 sessões	7sessões
Energia	8J	12J	28J

Quadro 2 – Padronização da Laserterapia nos subgrupos.

4.10 CICLO DE SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais em cada grupo eram divididos em três subgrupos (contendo cinco animais cada), de acordo com a cronologia de sacrifício sendo obedecidos os períodos de 3, 7 e 14 dias de pós-operatório. Os animais foram sacrificados com dose letal dos anestésicos utilizados anteriormente.

4.11 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO DOS ESPÉCIMES

Imediatamente após o sacrifício dos animais as feridas cicatriciais foram removidas por excisão cirúrgica com margem de segurança de 10 mm em toda sua extensão (Fig. 9), com o auxílio de lamina de bisturi¹⁰ n° 15, montada em cabo¹¹ n° 3 pinça de *Adisson*¹² e tesoura de *Metzenbaum*¹³. As peças foram fixadas em formol tamponado a 4% por 24 horas.

Todo processamento histotécnico foi realizado no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Pernambuco. As peças foram incluídas em blocos de parafina e submetidas a cortes transversais de 4 µm. Cada lâmina foi corada com hematoxilina e eosina (HE) e com Tricrômico de *Masson* (TM).

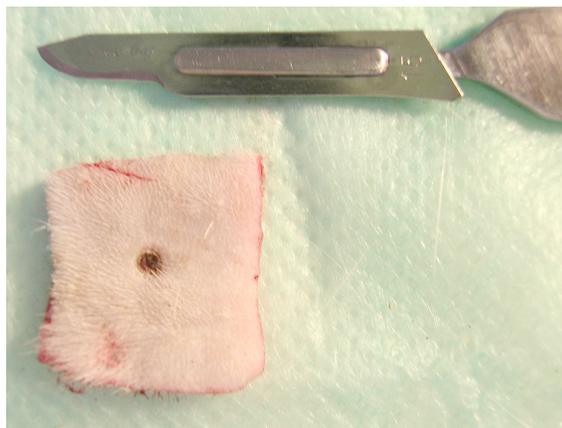


Fig. 9 – Remoção do espécime.

¹⁰ Laminas SurgiBlade® – Sunshine Int'l

¹¹ Cabo de Bisturi - Quinelato® - Schobell Industrial Ltda.

¹² Pinça para manipulação de tecido (12 cm) - Quinelato® - Schobell Industrial Ltda.

¹³ Tesoura romba para dissecação (15 cm) - Quinelato® - Schobell Industrial Ltda.

4.12 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

Esta avaliação foi realizada em todos os animais no dia do sacrifício dos animais em cada subgrupo por 2 avaliadores independentes, previamente calibrados. Foram avaliados quanto a ausência (0) ou a presença (1) as seguintes características: infecção; halo hiperêmico em torno da ferida; formação de crosta; borda necrótica e fundo sangrante da ferida.

A contração foi avaliada mediante cálculo da área da ferida, pela aferição dos diâmetros maior e menor, com auxílio de um paquímetro digital¹⁴ (Fig. 10), foi utilizada a equação matemática proposta por Prata, et al. (1988):

$$A = \pi \cdot R \cdot r$$

Onde "A" representa a área, "R" o raio maior e "r" o raio menor da ferida. O cálculo do percentual de contração foi expresso através da equação matemática sugerida por Ramsey et al. (1995), onde W_o representa a área inicial da ferida, W_i área da ferida:

$$\% \text{ de contração} = 100 \cdot [(W_o - W_i)/W_o]$$

Os dados foram registrados em tabelas confeccionadas para cada período de análise.

¹⁴ Paquímetro Digital 500-144B - Mitutoyo®.



Fig. 10 – Aferição do Diâmetro da Ferida com Paquímetro.

4.13 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FERIDAS

As lâminas foram observadas através de microscopia de luz, por dois examinadores devidamente calibrados. Foram observados na análise em HE os seguintes critérios: formação de crostas, inflamação, angiogênese, tecido de granulação e reepitelização. Todas essas características foram graduadas em: ausente (0), discreta (1), moderada (2) e intensa (3), de acordo com o seu aspecto histológico. Na análise com Tricrômico de *Masson* foi evidenciada a colagenização, sendo esta graduada em: ausente (0), leve (1), entre leve e moderado (2), moderado (3), entre moderado e intenso (4) e intenso (5). Os dados foram registrados em tabelas confeccionadas para cada período de análise.

4.14 PLANO DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas e percentuais (Técnicas de estatística descritiva) e foi utilizado o teste Exato de Fisher desde que as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas e o teste F (ANOVA) com comparações pareadas de LSD (Least significance differences), desde que as comparações pelo teste de Tukey não mostraram coerência com os resultados do teste F (ANOVA).

O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%. Os dados foram digitados na planilha Excel e o “software” estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

4.15 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto pauta-se pelos preceitos éticos, conforme as Normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA): quando estes são utilizados em pesquisas, objetiva-se adequar os animais ao menor desconforto, angústia ou dor. Considerando que os animais submetidos a tais estudos são indefesos e não podem escapar aos procedimentos, foram respeitadas as normas para prática didático-científica da vivissecção de animais de acordo com a Lei Federal nº 6638 de maio de 1979. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais conforme parecer em anexo.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A análise macroscópica foi baseada de acordo com a presença ou ausência das determinadas características clínicas das feridas. Foi verificado durante os períodos observacionais que todos os animais avaliados nos períodos observacionais apresentaram ausência de infecção e por este motivo os resultados dos testes comparativos não são apresentados (Tabela 1).

Tabela 1 – Avaliação da infecção segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	<i>Infecção</i>				TOTAL	Valor de p	
		Presente		Ausente				
		n	%	n	%			n
• 3 dias	1	-	-	5	100,0	5	100,0	**
	2	-	-	5	100,0	5	100,0	
	3	-	-	5	100,0	5	100,0	
	4	-	-	5	100,0	5	100,0	
	5	-	-	5	100,0	5	100,0	
	Grupo Total		-	-	25	100,0	25	
• 7 dias	1	-	-	5	100,0	5	100,0	**
	2	-	-	5	100,0	5	100,0	
	3	-	-	5	100,0	5	100,0	
	4	-	-	5	100,0	5	100,0	
	5	-	-	5	100,0	5	100,0	
	Grupo Total		-	-	25	100,0	25	
• 14 dias	1	-	-	5	100,0	5	100,0	**
	2	-	-	5	100,0	5	100,0	
	3	-	-	5	100,0	5	100,0	
	4	-	-	5	100,0	5	100,0	
	5	-	-	5	100,0	5	100,0	
	Grupo Total		-	-	25	100,0	25	

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de uma das categorias.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

Na Tabela 2 analisa-se a ocorrência de halo hiperêmico (Fig. 11) por grupo e tempo de avaliação. Desta tabela destaca-se que: na avaliação com 03 dias, no grupo 1, 40% dos animais apresentaram halo hiperêmico; em todos os animais do grupo 2 o halo hiperêmico estava presente; no grupo 3, 60% dos animais apresentaram hiperemia ao redor da ferida; no grupo 4 houve ausência de hiperemia em 100% dos animais e no grupo 5, em 20% dos animais houve hiperemia. Existe diferença significativa entre os grupos em relação ao halo hiperêmico ($p = 0,018$).

Na avaliação com 7 dias, com exceção do grupo 5, que apresentou 100% dos animais com halo hiperêmico, em todos os demais animais avaliados verificou-se a ausência halo hiperêmico e comprova-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Na avaliação com 14 dias nenhum animal apresentava halo hiperêmico e por este motivo não se apresenta teste estatístico comparativo.

Tabela 2 – Avaliação do halo hiperêmico segundo o grupo por período

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	<i>Halo hiperêmico</i>						Valor de p
		Presente		Ausente		TOTAL		
		n	%	n	%	n	%	
• 3 dias	1	2	40,0	3	60,0	5	100,0	$p^{(2)} = 0,018^*$
	2	5	100,0	-	-	5	100,0	
	3	3	60,0	2	40,0	5	100,0	
	4	-	-	5	100,0	5	100,0	
	5	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
	Grupo Total	11	44	14	56	25	100,0	
• 7 dias	1	-	-	5	100,0	5	100,0	$p^{(2)} < 0,001^*$
	2	-	-	5	100,0	5	100,0	
	3	-	-	5	100,0	5	100,0	
	4	-	-	5	100,0	5	100,0	
	5	5	100,0	-	-	5	100,0	
	Grupo Total	5	20,0	20	80,0	25	100,0	

• 14 dias	1	-	-	5	100,0	5	100,0	**
	2	-	-	5	100,0	5	100,0	
	3	-	-	5	100,0	5	100,0	
	4	-	-	5	100,0	5	100,0	
	5	-	-	5	100,0	5	100,0	
Grupo Total		-	-	100	100,0	25	100,0	

(*): Associação significativa a 5,0%.

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de uma das categorias.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

Através do teste Exato de Fisher.



Fig. 11 – Presença de halo hiperêmico e fundo sangrante (G1A).

Na Tabela 3 referente ao estudo de borda necrótica destaca-se que: na avaliação com 03 dias (Fig.12 e 13) a maioria (76,0%) dos animais apresentava borda necrótica e entre os grupos as freqüências variaram de 2 (grupo 5) a 5 casos (grupos 3 e 4) e não se comprova diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Na avaliação com 7 dias observa-se que: no grupo 1, 100% dos animais apresentavam borda necrótica, enquanto que no grupo 5 apresentavam ausência borda necrótica. Nos outros três grupos a freqüência variou de 2 a 3 casos com presença de borda necróticas e comprova-se diferença significativa entre os grupos.

Na avaliação com 14 dias nenhum animal apresentava borda necrótica, por este motivo não se apresenta teste estatístico comparativo.

Tabela 3 – Avaliação da borda necrótica segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	Borda necrótica				TOTAL		Valor de p
		Presente		Ausente		N	%	
		N	%	N	%			
• 3 dias	1	4	80	1	20	5	100,0	p ⁽²⁾ = 0,202
	2	3	60	2	40	5	100,0	
	3	5	100	-	-	5	100,0	
	4	5	100	-	-	5	100,0	
	5	2	40	3	60	5	100,0	
	Grupo Total	19	76,0	6	24,0	25	100,0	
• 7 dias	1	5	100	-	-	5	100,0	p ⁽²⁾ = 0,026*
	2	3	60	2	40	5	100,0	
	3	2	40	3	60	5	100,0	
	4	2	40	3	60	5	100,0	
	5	-	-	5	100	5	100,0	
	Grupo Total	12	48,0	13	52,0	25	100,0	
• 14 dias	1	-	-	5	100,0	5	100,0	**
	2	-	-	5	100,0	5	100,0	
	3	-	-	5	100,0	5	100,0	
	4	-	-	5	100,0	5	100,0	
	5	-	-	5	100,0	5	100,0	
	Grupo Total	-	-	25	100,0	25	100,0	

(*): Associação significativa a 5,0%.

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de uma das categorias.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.



Fig. 12 – Aspecto da borda necrótica (G1A).

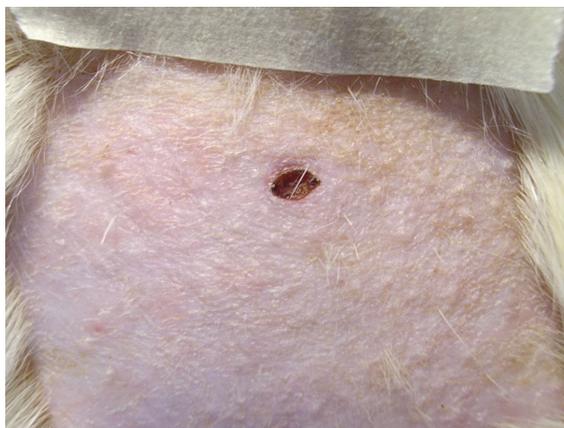


Fig.13 – Aspecto da ausência de borda necrótica (G3A)

Quanto a avaliação da crosta nas feridas, com 3 dias, todos os animais do experimento apresentavam crosta (Fig. 14). Na avaliação com 7 dias nos grupos 1 e 3 nenhum animal apresentava crosta, enquanto que, 100% dos animais dos grupos 2 e 5 apresentavam crosta; no grupo 4, 60% dos animais apresentavam crosta, diferenças estas que se revelam significantes entre os grupos. Na avaliação com 14 dias todos os animais havia ausência de crosta (Fig. 15) e por este motivo não se apresenta teste estatístico comparativo.



Fig. 14 – Presença da crosta (G4A)



Fig. 15 – Ausência da crosta (G5C).

Tabela 4 – Avaliação da crosta segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	<i>Crosta</i>				TOTAL	Valor de p	
		Presente		Ausente				
		n	%	N	%			n
• 3 dias	1	5	100	-	-	5	100,0	**
	2	5	100	-	-	5	100,0	
	3	5	100	-	-	5	100,0	
	4	5	100	-	-	5	100,0	
	5	5	100	-	-	5	100,0	
Grupo Total		25	100	-	-	25	100,0	
• 7 dias	1	-	-	5	100	5	100,0	p ⁽²⁾ < 0,001*

	2	5	100	-	-	5	100,0	
	3	-	-	5	100	5	100,0	
	4	3	60	2	40	5	100,0	
	5	5	100	-	-	5	100,0	
	Grupo Total	13	52	12	48	25	100,0	
• 14 dias	1	-	-	5	100	5	100,0	**
	2	-	-	5	100	5	100,0	
	3	-	-	5	100	5	100,0	
	4	-	-	5	100	5	100,0	
	5	-	-	5	100	5	100,0	
	Grupo Total	-	-	25	100	25	100,0	

(*): Associação significativa a 5,0%.

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de uma das categorias.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

A ausência de fundo sangrante nas feridas foi verificada em todos os grupos em todos os períodos de observação, com exceção de um animal (20%) do grupo 1 (Fig. 11) que, apresentava fundo da ferida sangrante na avaliação com 3 dias (Tabela 5).

Tabela 5 – Avaliação do fundo sangrante segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	<i>Fundo sangrante</i>						Valor de p
		Presente		Ausente		TOTAL		
		n	%	N	%	n	%	
• 3 dias	1	1	20,0	4	80,0	5	100,0	p ⁽²⁾ = 1,000
	2	-	-	5	100	5	100,0	
	3	-	-	5	100	5	100,0	
	4	-	-	5	100	5	100,0	
	5	-	-	5	100	5	100,0	
	Grupo Total	1	4,0	24	96,0	25	100,0	
• 7 dias	1	-	-	5	100	5	100,0	**

	2	-	-	5	100	5	100,0	
	3	-	-	5	100	5	100,0	
	4	-	-	5	100	5	100,0	
	5	-	-	5	100	5	100,0	
	Grupo Total	-	-	25	100	25	100,0	
• 14 dias	1	-	-	5	100	5	100,0	**
	2	-	-	5	100	5	100,0	
	3	-	-	5	100	5	100,0	
	4	-	-	5	100	5	100,0	
	5	-	-	5	100	5	100,0	
	Grupo Total	-	-	25	100	25	100,0	

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de uma das categorias.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

A média e o desvio padrão do percentual da contração da ferida segundo os grupos em cada uma das avaliações, pode ser verificada na Tabela 6; nesta é possível destacar que: no período de 03 dias os grupos 3 e 5 apresentaram maior média de contração, em comparação aos demais grupos. Através dos testes de comparações pareadas, comprova-se diferença significativa entre cada um dos grupos. Em cada um dos grupos a média aumentou com o tempo de avaliação; em todos os grupos a média foi igual ao valor máximo de 100,0% na avaliação com 14 dias. Diferenças significativas foram registradas entre os tempos de avaliação para cada um dos grupos e se comprova diferenças significativas entre cada um dos tempos de avaliação.

Tabela 6 – Avaliação da contração da ferida segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo					Valor de p
	1	2	3	4	5	
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
3 dias	32,24 ± 7,77 ^(A, a)	34,88 ± 19,64 ^(A, a)	51,94 ± 9,14 ^(B, a)	32,98 ± 8,56 ^(A, a)	50,26 ± 10,74 ^(B, a)	p ⁽²⁾ = 0,030*

7 dias	70,92 ± 6,20 ^(b)	79,58 ± 2,91 ^(b)	79,34 ± 4,13 ^(b)	79,20 ± 9,51 ^(b)	81,24 ± 5,86 ^(b)	P ⁽²⁾ =0,106
14 dias	100,00 ± 0,00 ^(c)	**				
Valor de p	p⁽³⁾ < 0,001*					

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(**): Não foi determinado devido à ocorrência de resultados iguais em todos os grupos.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste F(ANOVA).

Obs.: Se todas as letras maiúsculas entre parênteses são distintas comprova-se diferença significativa entre os grupos correspondentes através das comparações pareadas de LSD.

Obs.: Se todas as letras minúsculas entre parênteses são distintas comprova-se diferença significativa entre os tempos de avaliação correspondentes através das comparações pareadas de Tamhane's T2.

No gráfico 1 pode ser percebido o aumento da contração em todos os grupos com os tempos de avaliação, sendo mais acentuado nos grupos 3 e 5, no terceiro dia, com diferença estatística comprovada ($p = 0,030$). No sétimo dia a diferença entre os grupos não foi significativa, seguindo uma tendência de equilíbrio até o décimo quarto dia.

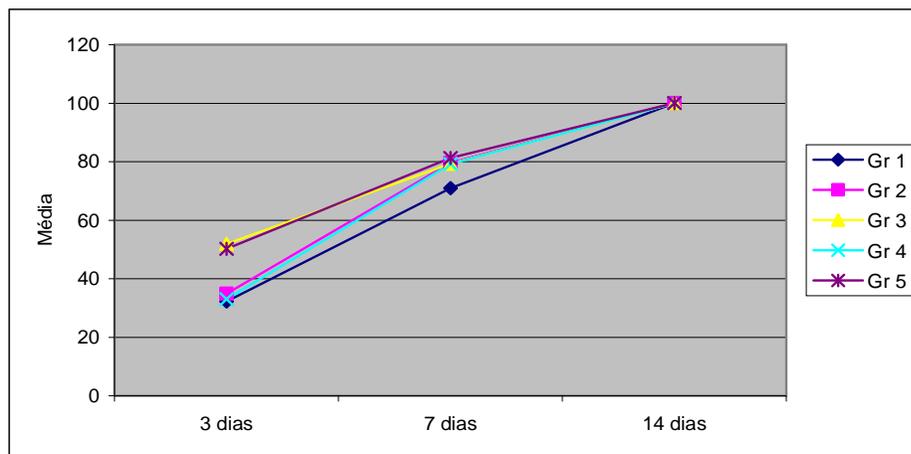


Gráfico 1 – Médias do percentual de contração de ferida segundo o tempo de avaliação e o grupo.

5.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

Na avaliação morfológica, as lâminas foram coradas em HE e em TM, para evidenciar a colagenização. Os critérios analisados em HE foram: formação de crostas, inflamação, angiogênese, tecido de granulação e reepitelização. Todas essas características foram graduadas em: ausente (0), discreta (1), moderada (2) e intensa (3), de acordo com o seu aspecto histológico. Na análise com TM, foi evidenciada a colagenização, sendo esta

graduada em: ausente (0), leve (1), entre leve e moderado (2), moderado (3), entre moderado e intenso (4) e intenso (5).

Na Tabela 7 analise-se a formação da crosta de acordo com o período. Com 03 dias de observação, 100% dos espécimes nos grupos 1 e 3 apresentaram crosta intensa (Fig. 16 e 17); no grupo 2 foi verificada a presença intensa de crosta em 60% dos espécimes e em 40%, presença moderada de crosta; nos grupos 4 e 5, em 80% dos espécimes houve presença de crosta intensa, e nos demais a crosta apresentava-se moderada em ambos os grupos.

Na avaliação com 07 dias, 100% dos espécimes dos grupos 1 e 3 a crosta estava ausente (Fig. 18); no grupo 2, 100% foram classificados com crosta no grau leve; no grupo 4, 40% apresentaram ausência, 20% com crosta no grau leve e 40% com grau moderado; no grupo 5, 75% dos espécimes com grau leve e 25% no grau intenso de crosta. Sendo a diferença significativa ao nível de 5,0% apenas para este período de avaliação ($p < 0,05$).

Na avaliação com 14 dias com exceção de um espécime do grupo 2, que apresentou grau leve de crosta, todos os demais analisados apresentavam ausência de crosta.

Tabela 7 – Avaliação da crosta segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	Crosta								TOTAL	Valor de p	
		Ausente		Leve		Moderado		Intenso				
		n	%	n	%	n	%	n	%			
• 3 dias	1	-	-	-	-	-	-	5	100,0	5	100,0	$p^{(2)} = 0,753$
	2	-	-	-	-	2	40,0	3	60,0	5	100,0	
	3	-	-	-	-	-	-	5	100,0	5	100,0	
	4	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
	5	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
Grupo Total		-	-	-	-	4	16,0	21	84,0	25	100,0	
• 7 dias	1	4	100,0	-	-	-	-	-	-	4	100,0	$p^{(2)} < 0,001^*$

	2	-	-	4	100,0	-	-	-	-	4	100,0
	3	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0
	4	2	40,0	1	20,0	2	40,0	-	-	5	100,0
	5	-	-	3	75,0	-	-	1	25,0	4	100,0
	Grupo Total	11	50,0	8	36,4	2	9,1	1	4,5	22	100,0
• 14 dias	1	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0
	2	4	80,0	1	20,0	-	-	-	-	5	100,0
	3	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0
	4	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0
	5	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0
	Grupo Total	24	96,0	1	4,0	-	-	-	-	25	100,0

$p^{(2)} = 1,000$

(*): Associação significativa a 5,0%

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de uma das categorias.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3 Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

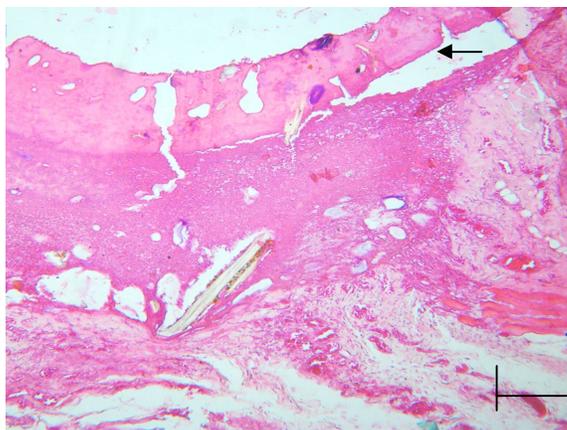


Fig. 16 – Presença de crosta intensa, com 03 dias, em HE (Escala de referência 100 μ m).

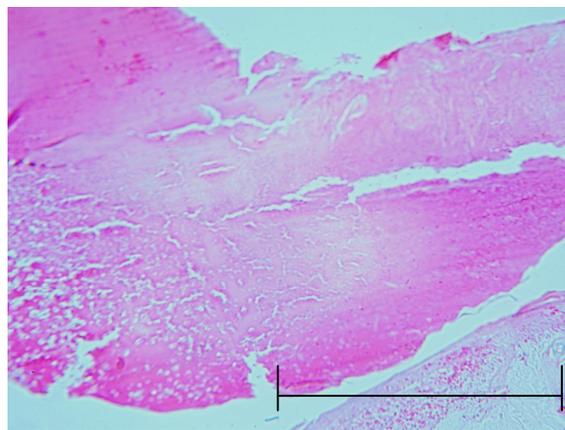


Fig. 17 – Presença de crosta intensa, com 03 dias, em HE (Maior aumento, escala de referência 100 μ m).

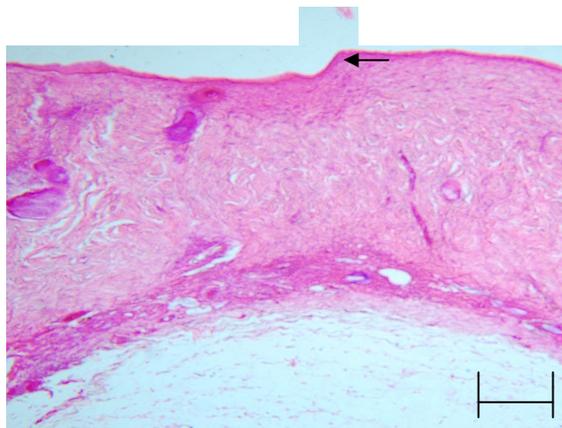


Fig. 18 – Ausência de crosta, com 07 dias, em HE (Escala de referência 100 μ m).

Na avaliação da inflamação (Tabela 8) destaca-se que: com 03 dias 80% dos animais do grupo 1 apresentaram inflamação intensa (Fig. 19) e 20% inflamação moderada; no grupo 2, 100% apresentaram grau intenso de inflamação; no grupo 3 em 20% dos espécimes houve ausência de inflamação, 20% com grau leve e 60% com inflamação intensa; no grupo 4, 80% apresentaram grau leve e 20% inflamação moderada; no grupo 5, 40% com grau moderado e 60% com grau intenso de inflamação. Foi verificada diferença significativa entre os grupos na referida avaliação ($p < 0,05$).

Com 07 dias no grupo 1 verificou-se que 25% dos espécimes apresentavam grau leve de inflamação e os demais (75%) inflamação intensa, no grupo 2 todos apresentaram inflamação no grau intenso; o grupo 3 verificou-se que 20% apresentava inflamação leve e 80% inflamação intensa; no grupo 4, 40% apresentaram grau leve e 60% grau intenso de inflamação; no grupo 5, 75% com inflamação leve e 25% inflamação moderado, entretanto ao nível de 5,0% não se comprova diferença significativa entre os grupos.

Na avaliação com 14 dias no grupo 1 a inflamação estava ausente em 40 % dos animais e 60% apresentaram inflamação leve; no grupo 2, 20% apresentaram inflamação leve, 20% moderada e 60% inflamação intensa, no grupo 3, 60% grau leve de inflamação e 40% com inflamação moderada; no grupo 4, 60% com grau leve, 20% com moderado e 20% com inflamação intensa e no grupo 5, 40% dos espécimes apresentaram grau leve e 60% com inflamação moderada. Entretanto, não se comprova diferença significativa entre os grupos na avaliação com 14 dias ($p > 0,05$).

Tabela 8 – Avaliação da inflamação segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	Inflamação								TOTAL	Valor de p	
		Ausente		Leve		Moderado		Intenso				
		n	%	n	%	n	%	n	%			
• 3 dias	1	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0	$p^{(2)} = 0,004^*$

	2	-	-	-	-	-	-	5	100,0	5	100,0	
	3	1	20,0	1	20,0	-	-	3	60,0	5	100,0	
	4	-	-	4	80,0	1	20,0	-	-	5	100,0	
	5	-	-	-	-	2	40,0	3	60,0	5	100,0	
	Grupo Total	1	4,0	5	20,0	4	16,0	15	60,0	25	100,0	
• 7 dias	1	-	-	1	25,0	-	-	3	75,0	4	100,0	$p^{(2)} = 0,087$
	2	-	-	-	-	-	-	4	100,0	4	100,0	
	3	-	-	1	20,0	-	-	4	80,0	5	100,0	
	4	-	-	2	40,0	-	-	3	60,0	5	100,0	
	5	-	-	3	75,0	1	25,0	-	-	4	100,0	
	Grupo Total	-	-	7	31,8	1	4,5	14	63,6	22	100,0	
• 14 dias	1	2	40,0	3	60,0	-	-	-	-	5	100,0	$p^{(2)} = 0,117$
	2	-	-	1	20,0	1	20,0	3	60,0	5	100,0	
	3	-	-	3	60,0	2	40,0	-	-	5	100,0	
	4	-	-	3	60,0	1	20,0	1	20,0	5	100,0	
	5	-	-	2	40,0	3	60,0	-	-	5	100,0	
	Grupo Total	2	8,0	12	48,0	7	28,0	4	16,0	25	100,0	

(*): Associação significativa a 5,0%

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

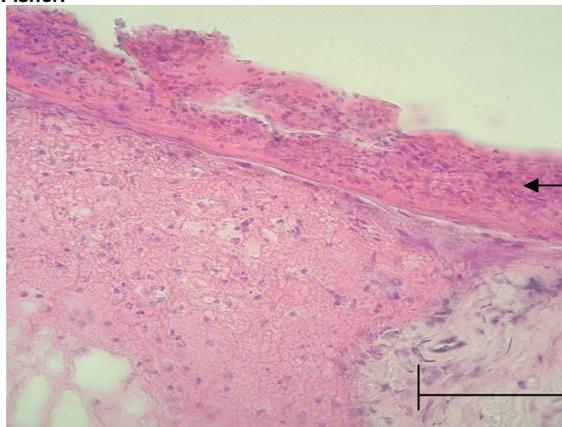


Fig. 19 – Presença intensa de células inflamatórias, na crosta, 03 dias, em HE (Escala de referência 100 μ m).

No estudo do grau de angiogênese na avaliação com 03 dias todos os animais dos grupos 1 e 4 apresentaram grau intenso (Fig. 20); no grupo 2, 20% com grau leve, 20% com grau moderado e 60% com grau intenso de angiogênese; no grupo 3, 40% com grau leve, 20%

com moderado e 40% com angiogênese intensa; no grupo 5, 40% com grau moderado e 60% com angiogênese intensa. Não existindo significância estatística para este período (Tabela 9).

Na avaliação com 07 dias 100% dos espécimes do grupo 1 apresentaram grau leve de angiogênese, enquanto 100% do grupo 2 apresentaram intensa; no grupo 3, 20% apresentaram grau moderado e 80% angiogênese intensa; no grupo 4, 20% com grau leve, 20% moderado e 60% intensa; no grupo 5, 75% com grau leve e 25% com angiogênese moderada ($p = 0,002$).

Com 14 dias: no grupo 1, 20% com ausência de angiogênese e 80% com grau leve; no grupo 2, 20% com grau leve, 20% moderada e 60% intensa; no grupo 3, 40% com grau leve, 40% moderado e 20% intensa; no grupo 4, 60% com grau leve e 40% intensa e no grupo 5, 100% grau moderado de angiogênese ($p = 0,004$).

Tabela 9 – Avaliação da angiogênese segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	Angiogênese								TOTAL		Valor de p
		Ausente		Leve		Moderado		Intenso		n	%	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
• 3 dias	1	-	-	-	-	-	-	5	100,0	5	100,0	$p^{(2)} = 0,196$
	2	-	-	1	20,0	1	20,0	3	60,0	5	100,0	
	3	-	-	2	40,0	1	20,0	2	40,0	5	100,0	
	4	-	-	-	-	-	-	5	100,0	5	100,0	
	5	-	-	-	-	2	40,0	3	60,0	5	100,0	
Grupo Total		-	-	3	12,0	4	16,0	18	72,0	25	100,0	
• 7 dias	1	-	-	4	100,0	-	-	-	-	4	100,0	$p^{(2)} = 0,002^*$
	2	-	-	-	-	-	-	4	100,0	4	100,0	
	3	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
	4	-	-	1	20,0	1	20,0	3	60,0	5	100,0	
	5	-	-	3	75,0	1	25,0	-	-	4	100,0	
Grupo Total		-	-	8	36,4	3	13,6	11	50,0	22	100,0	
• 14 dias	1	1	20,0	4	80,0	-	-	-	-	5	100,0	$p^{(2)} = 0,004^*$

2	-	-	1	20,0	1	20,0	3	60,0	5	100,0
3	-	-	2	40,0	2	40,0	1	20,0	5	100,0
4	-	-	3	60,0	-	-	2	40,0	5	100,0
5	-	-	-	-	5	100,0	-	-	5	100,0
Grupo Total	1	4,0	10	40,0	8	32,0	6	24,0	25	100,0

(*): Associação significativa a 5,0%

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

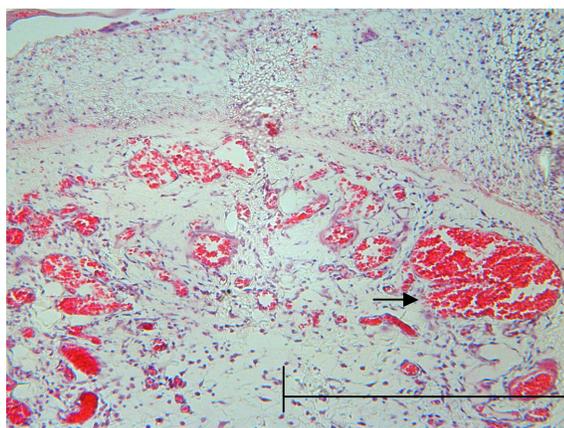


Fig. 20 – Presença intensa de angiogênese, 03 dias, em HE (Escala de referência 100 μ m).

Avaliando-se a angiogênese segundo o período, percebe-se que houve diferença significativa nos três períodos nos grupos 1 e 5. No grupo 1, a angiogênese diminuiu gradativamente, já no grupo 5, houve diminuição do terceiro para o sétimo dia e aumento do sétimo para o décimo quarto dia (Tabela 10).

Tabela 10 – Avaliação da angiogênese segundo o período por grupo.

Grupo ⁽¹⁾	Período	Angiogênese								TOTAL	Valor de p	
		Ausente		Leve		Moderado		Intenso				
		n	%	n	%	n	%	n	%			
• 1	3 dias	-	-	-	-	-	-	5	100,0	5	100,0	$p^{(2)} = 0,001^*$
	7 dias	-	-	4	100,0	-	-	-	-	4	100,0	
	14 dias	1	20,0	4	80,0	-	-	-	-	5	100,0	
Grupo Total		1	7,1	8	57,1	-	-	5	35,7	14	100,0	
• 2	3 dias	-	-	1	20,0	1	20,0	3	60,0	5	100,0	$p^{(2)} = 1,000$

	7 dias	-	-	-	-	-	-	4	100,0	4	100,0	
	14 dias	-	-	1	20,0	1	20,0	3	60,0	5	100,0	
	Grupo Total	-	-	2	14,3	2	14,3	10	71,4	14	100,0	
• 3	3 dias	-	-	2	40,0	1	20,0	2	40,0	5	100,0	$p^{(2)} = 0,560$
	7 dias	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
	14 dias	-	-	2	40,0	2	40,0	1	20,0	5	100,0	
	Grupo Total	-	-	4	26,7	4	26,7	7	46,7	15	100,0	
• 4	3 dias	-	-	-	-	-	-	5	100,0	5	100,0	$p^{(2)} = 0,131$
	7 dias	-	-	1	20,0	1	20,0	3	60,0	5	100,0	
	14 dias	-	-	3	60,0	-	-	2	40,0	5	100,0	
	Grupo Total	-	-	4	26,7	1	6,7	10	66,7	15	100,0	
• 5	3 dias	-	-	-	-	2	40,0	3	60,0	5	100,0	$p^{(2)} = 0,008^*$
	7 dias	-	-	3	75,0	1	25,0	-	-	4	100,0	
	14 dias	-	-	-	-	5	100,0	-	-	5	100,0	
	Grupo Total	-	-	3	21,4	8	57,1	3	21,4	14	100,0	

(*): Associação significativa a 5,0%.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

Com relação à presença de tecido de granulação verifica-se que: na avaliação com 3 dias com exceção de dois espécimes do grupo 1 e um espécime do grupo 2 que apresentavam granulação no grau intenso os demais animais não apresentavam tecido de granulação. Mas sem significância estatística (Tabela 11).

Na avaliação com 07 dias observou-se que: no grupo 1, 50% apresentaram tecido de granulação no grau leve e 50% com grau intenso; no grupo 2, 25% apresentaram ausência de granulação, 50% grau leve e 25% grau intenso de tecido de granulação; no grupo 3, 20% com grau moderado e 80% granulação intensa; no grupo 4, 40% apresentaram grau leve e 60% no grau intenso de granulação e no grupo 5, 50% com grau leve, 25% moderado e 25%

granulação intensa. Para as avaliações com 3 e 7 dias não se comprova diferença significativa para nenhum dos grupos ($p > 0,05$).

Com 14 dias, todos os espécimes apresentavam tecido de granulação; no grupo 1 todos os espécimes apresentaram granulação no grau leve; no grupo 2, 20% apresentaram grau leve e 80% grau intenso; no grupo 3, 60% dos espécimes com grau leve e 40% com moderado; no grupo 4, 60% com grau leve e 40% com intenso de granulação e no grupo 5, 40% grau moderado e 60% com grau intenso. Comprova-se diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 11 – Avaliação do tecido de granulação segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	Granulação										Valor de p
		Ausente		Leve		Moderado		Intenso		TOTAL		
		n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	
• 3 dias	1	3	60,0	-	-	-	-	2	40,0	5	100,0	P ⁽²⁾ = 0,457
	2	4	80,0	-	-	-	-	1	20,0	5	100,0	
	3	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	4	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	5	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
Grupo Total		22	88,0	-	-	-	-	3	12,0	25	100,0	
• 7 dias	1	-	-	2	50,0	-	-	2	50,0	4	100,0	P ⁽²⁾ = 0,458
	2	1	25,0	2	50,0	-	-	1	25,0	4	100,0	
	3	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
	4	-	-	2	40,0	-	-	3	60,0	5	100,0	
	5	-	-	2	50,0	1	25,0	1	25,0	4	100,0	
Grupo Total		1	4,5	8	36,4	2	9,1	11	50,0	22	100,0	
• 14 dias	1	-	-	5	100,0	-	-	-	-	5	100,0	P ⁽²⁾ = 0,004*

2	-	-	1	20,0	-	-	4	80,0	5	100,0
3	-	-	3	60,0	2	40,0	-	-	5	100,0
4	-	-	3	60,0	-	-	2	40,0	5	100,0
5	-	-	-	-	2	40,0	3	60,0	5	100,0
Grupo Total	-	-	12	48,0	4	16,0	9	36,0	25	100,0

(*): Associação significativa a 5,0%.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3: Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

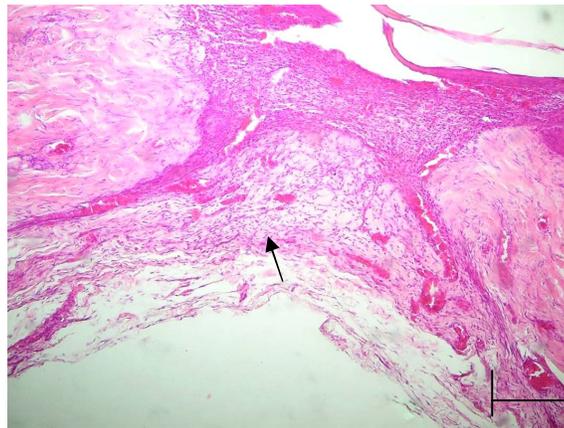


Fig. 21 – Presença intensa de tecido de granulação, 03 dias, em HE (Escala de referência 100 μ m).

A Tabela 12 demonstra a avaliação da colagenização (Fig. 22 à 36) através de coloração especial em Tricrômico de Masson. Com 03 dias a maioria (79,2%) dos espécimes apresentava colagenização discreta e os 20,8% restantes apresentaram colagenização entre discreta e moderada, sendo que entre os grupos as frequências com colagenização discreta, variaram de 3 a 5 espécimes, em cada grupo, sem comprovação de diferença significativa.

Na avaliação com 07 dias, no grupo 1, 100% dos espécimes apresentaram colagenização discreta; no grupo 2, 80% com colagenização discreta e 20% com colagenização moderada; no grupo 3, 60% com colagenização discreta, 20% moderada e 20% entre moderada e intensa; no grupo 4, 60% entre discreta e moderada, 20% moderada e 20% com colagenização intensa; no grupo 5, 50% com grau discreto de colagenização e 50 com grau moderado. As diferenças se revelam significantes entre os grupos.

Com 14 dias, no grupo 1, 100% apresentavam colagenização moderada; no grupo 2, 40% com grau moderada e 60% com grau entre moderado e intenso de colagenização; nos grupos 3 e 4, 20% com colagenização entre moderada e intensa e 80% com colagenização intensa; no grupo 5, 20% com colagenização discreta, 20% com colagenização moderada, 20% entre moderada e intensa e 40% com colagenização intensa. Comprova-se diferença significativa entre os grupos em relação aos resultados da questão.

Tabela 12 – Avaliação do colagenização segundo o grupo por período.

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	Colagenização										TOTAL	Valor de p	
		Discreta		Discreta/ Moderada		Moderada		Moderada/ Intensa		Intensa				
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
• 3 dias	1	4	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	4	100,0	p ⁽²⁾ = 0,471
	2	5	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	3	4	80,0	1	20,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	4	3	60,0	2	40,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	5	3	60,0	2	40,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
Grupo Total		19	79,2	5	20,8	-	-	-	-	-	-	24	100,0	
• 7 dias	1	4	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	4	100,0	p ⁽²⁾ = 0,029*
	2	4	80,0	-	-	1	20,0	-	-	-	-	5	100,0	
	3	3	60,0	-	-	1	20,0	1	20,0	-	-	5	100,0	
	4	-	-	3	60,0	1	20,0	-	-	1	20,0	5	100,0	
	5	2	50,0	-	-	2	50,0	-	-	-	-	4	100,0	
Grupo Total		13	56,5	3	13,0	5	21,7	1	4,3	1	4,3	23	100,0	
• 14 dias	1	-	-	-	-	4	100,0	-	-	-	-	4	100,0	p ⁽²⁾ = 0,005*

2	-	-	-	-	2	40,0	3	60,0	-	-	5	100,0
3	-	-	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0
4	-	-	-	-	-	-	1	20,0	4	80,0	5	100,0
5	1	20,0	-	-	1	20,0	1	20,0	2	40,0	5	100,0
Grupo Total	1	4,2	-	-	7	29,2	6	25,0	10	41,7	24	100,0

(*): Associação significativa a 5,0%.

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de uma das categorias.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3 Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

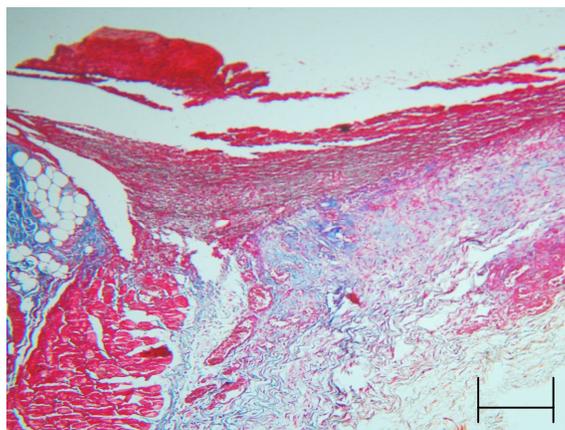


Fig. 22 – Colagenização discreta, em TM, Grupo Controle com 03 dias (Escala de referência 100 μ m)

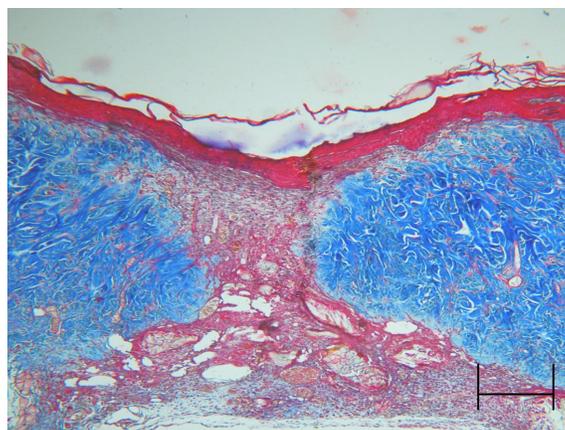


Fig. 23 – Colagenização discreta, em TM, Grupo Controle com 07 dias (Escala de referência 100 μ m)

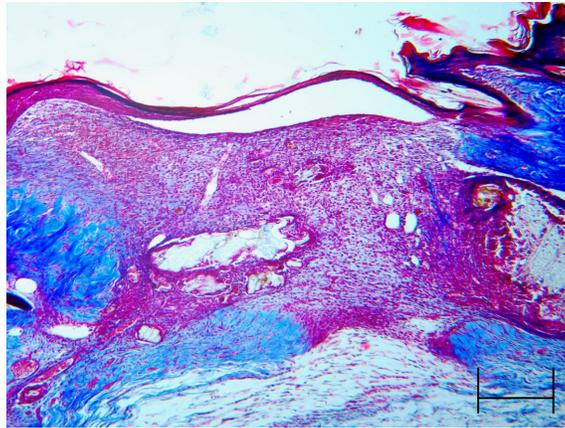


Fig. 24 – Colagenização moderada, em TM, Grupo Controle com 14 dias
(Escala de referência 100 μ m)

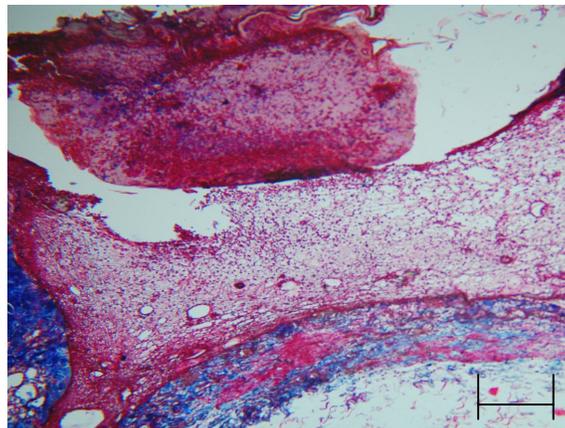


Fig. 25 – Colagenização discreta, em TM, Grupo Orabase com 03 dias
(Escala de referência 100 μ m)

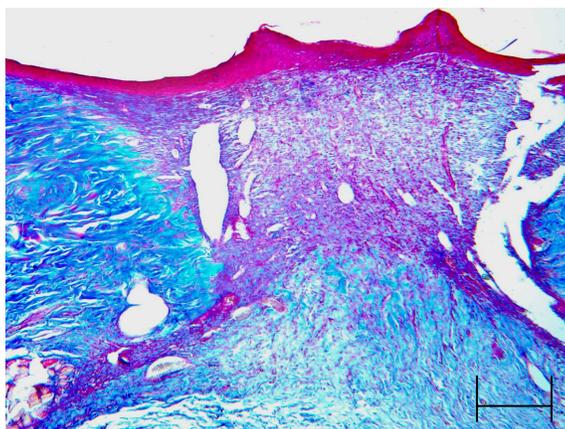


Fig. 26 – Colagenização moderada, em TM, Grupo Orabase 07 dias
(Escala de referência 100 μ m)

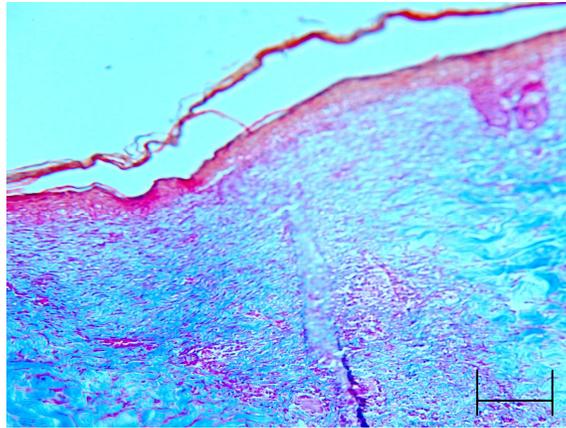


Fig. 27 – Colagenização moderada, em TM, Grupo Orabase com 14 dias (Escala de referência 100 μm)

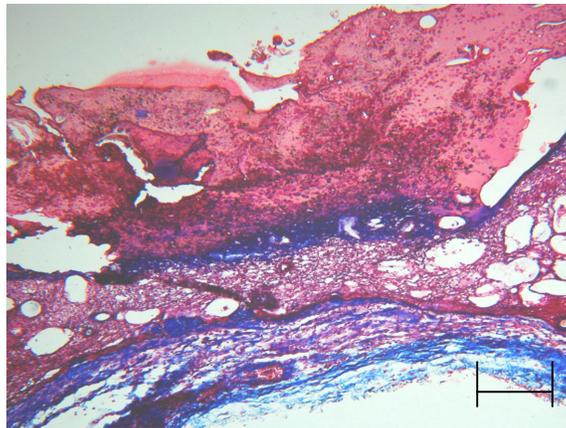


Fig. 28 – Colagenização discreta /moderada, em TM, Grupo Quitosana com 03 dias (Escala de referência 100 μm)

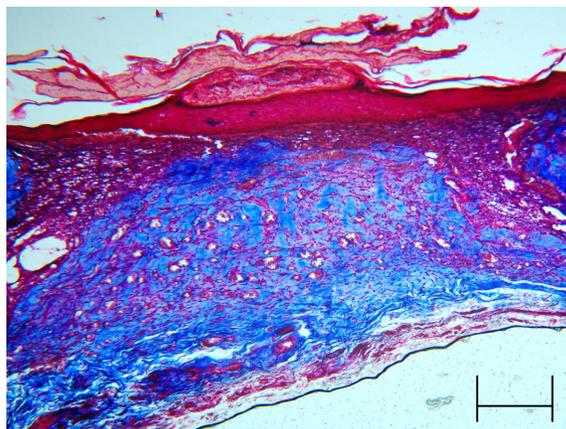


Fig. 29 – Colagenização moderada/intensa, em TM, Grupo Quitosana com 07dias (Escala de referência 100 μm)

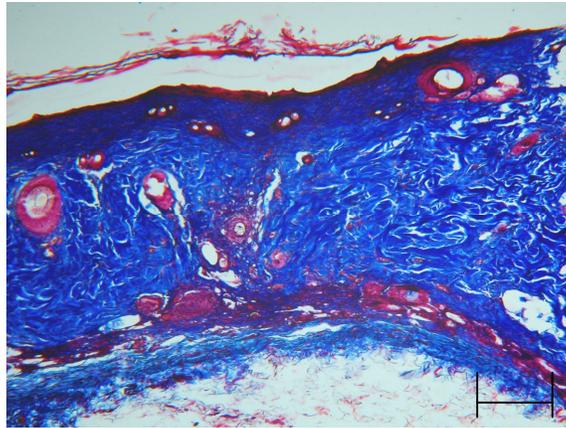


Fig. 30 – Colagenização intensa, em TM, Grupo Quitosana com 14 dias (Escala de referência 100 μ m).

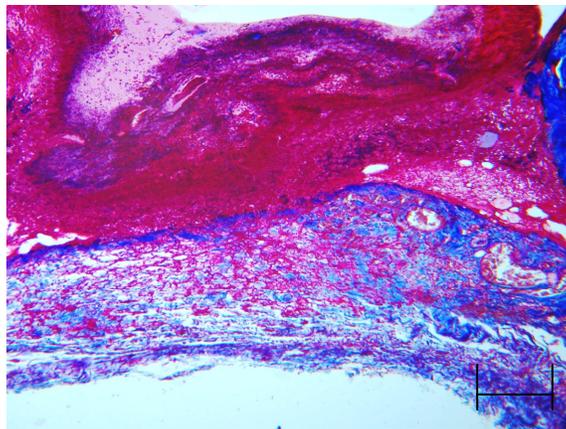


Fig. 31 – Colagenização discreta /moderada, em TM, Grupo Laser com 03 dias (Escala de referência 100 μ m)

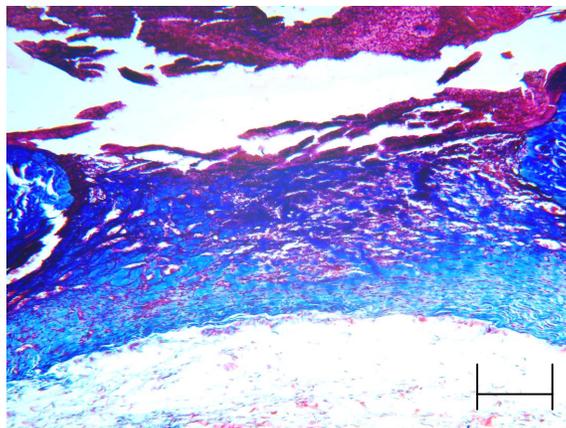


Fig. 32 – Colagenização intensa, em TM, Grupo Laser com 07 dias (Escala de referência 100 μ m)

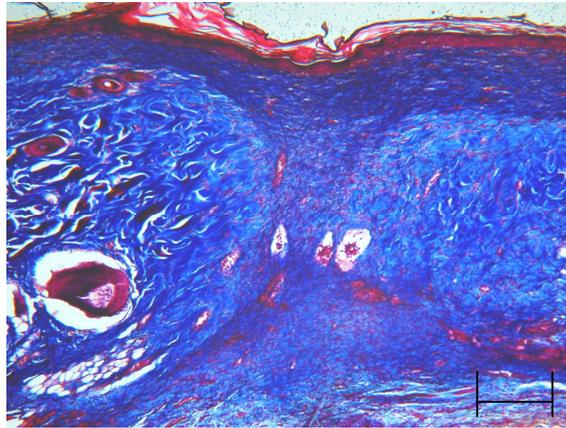


Fig. 33 – Colagenização intensa, em TM, Grupo Laser com 14 dias
(Escala de referência 100 μ m).

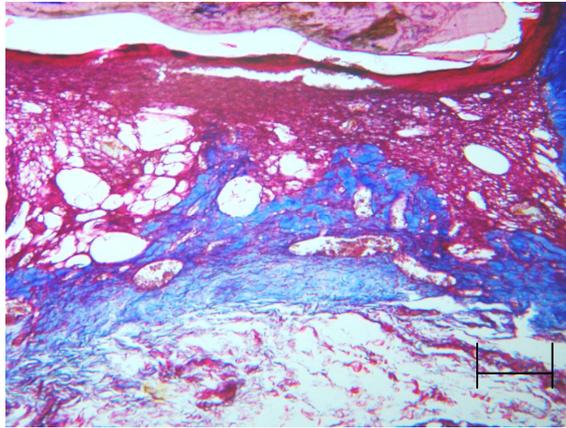


Fig. 34 – Colagenização discreta /moderada, em TM, Grupo Quitosana e Laser com 03 dias
(Escala de referência 100 μ m).

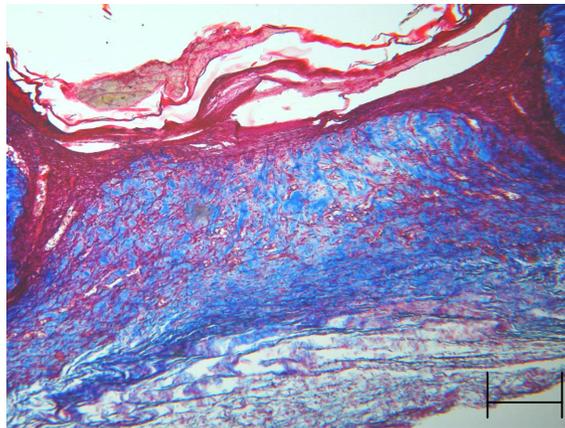


Fig. 35 – Colagenização discreta /moderada, em TM, Grupo Quitosana e Laser com 7 dias
(Escala de referência 100 μ m).

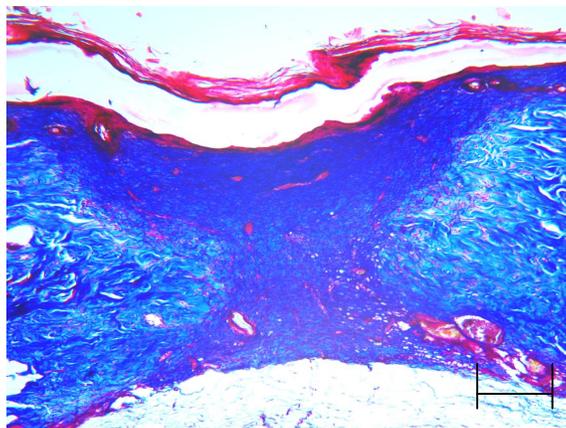


Fig. 36 – Colagenização intensa, em TM, Grupo Qitosana e Laser com 14 dias (Escala de referência 100 μ m).

No estudo da reepitelização destaca-se que: houve um aumento gradativo desta de acordo com o tempo, em cada grupo, sendo a diferença, entre os períodos observacionais, de forma significativa (Tabela 13 e Fig. 37).

Tabela 13 – Avaliação da reepitelização segundo o período por grupo.

Grupo ⁽¹⁾	Período	Reepitelização								TOTAL	Valor de p	
		Ausente		Leve		Moderado		Intenso				
		n	%	N	%	n	%	n	%			
• 1	3 dias	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	p ⁽²⁾ = 0,002*
	7 dias	4	100,0	-	-	-	-	-	-	4	100,0	
	14 dias	-	-	4	80,0	1	20,0	-	-	5	100,0	
	Grupo Total	9	64,3	4	28,6	1	7,1	-	-	14	100,0	
• 2	3 dias	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	p ⁽²⁾ = 0,001*
	7 dias	4	100,0	-	-	-	-	-	-	4	100,0	
	14 dias	-	-	3	60,0	2	40,0	-	-	5	100,0	
	Grupo Total	9	64,3	3	21,4	2	14,3	-	-	14	100,0	
• 3	3 dias	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	p ⁽²⁾ = 0,006*
	7 dias	4	80,0	-	-	-	-	1	20,0	5	100,0	
	14 dias	-	-	-	-	3	60,0	2	40,0	5	100,0	
	Grupo Total	9	60,0	-	-	3	20,0	3	20,0	15	100,0	

● 4	3 dias	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	$p^{(2)} = 0,001^*$
	7 dias	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	14 dias	-	-	1	20,0	4	80,0	-	-	5	100,0	
	Grupo Total		10	66,7	1	6,7	4	26,7	-	-	15	
● 5	3 dias	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	$p^{(2)} = 0,001^*$
	7 dias	4	100,0	-	-	-	-	-	-	4	100,0	
	14 dias	-	-	2	40,0	3	60,0	-	-	5	100,0	
	Grupo Total		9	64,3	2	14,3	3	21,4	-	-	14	

(*): Associação significativa a 5,0%.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3 Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; Grupo 5: Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

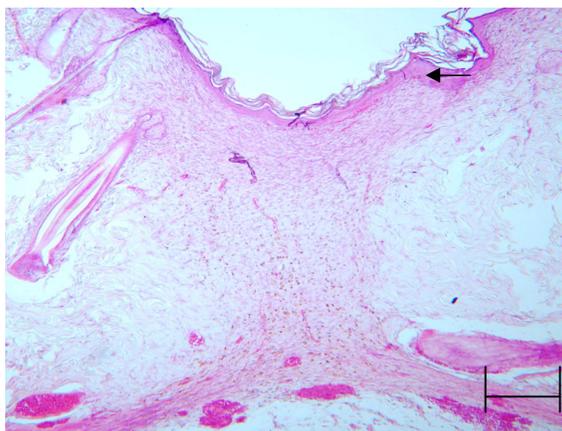


Fig. 37 – Reepitelização da Ferida, em HE, com 14 dias (Escala de referência 100 μ m).

Na avaliação baseada no período, com 03 dias, em 100% dos espécimes, em todos os grupos, não houve reepitelização. Na avaliação com 07 dias com exceção de um animal do grupo 3 com reepitelização no grau intenso, todos os demais apresentavam ausência desta característica (Tabela 14).

Com 14 dias todos os animais apresentavam reepitelização, sendo no grupo 1, 80% reepitelização leve e 20% moderado; no grupo 2, 60% com reepitelização leve e 40% moderado; no grupo 3, 60% moderado e 40% com reepitelização intensa; no grupo 4, 20% apresentaram reepitelização com grau leve e 80% moderado; no grupo 5, 40% apresentaram

grau leve e 60% moderado. Para as avaliações que foram possíveis ser aplicado o teste estatístico comparativo não foi comprovado diferença significativa entre os grupos em nenhuma delas. ($p > 0,05$).

Tabela 14 – Avaliação da reepitelização segundo o grupo por período

Tempo de Avaliação	Grupo ⁽¹⁾	Reepitelização								TOTAL		Valor de p
		Ausente		Leve		Moderado		Intenso				
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
• 3 dias	1	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	**
	2	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	3	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	4	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	5	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
Grupo Total		25	100,0	-	-	-	-	-	-	25	100,0	
• 7 dias	1	4	100,0	-	-	-	-	-	-	4	100,0	$p^{(2)} = 1,000$
	2	4	100,0	-	-	-	-	-	-	4	100,0	
	3	4	80,0	-	-	-	-	1	20,0	5	100,0	
	4	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5	100,0	
	5	4	100,0	-	-	-	-	-	-	4	100,0	
Grupo Total		21	95,5	-	-	-	-	1	4,5	22	100,0	
• 14 dias	1	-	-	4	80,0	1	20,0	-	-	5	100,0	$p^{(2)} = 0,110$
	2	-	-	3	60,0	2	40,0	-	-	5	100,0	
	3	-	-	-	-	3	60,0	2	40,0	5	100,0	
	4	-	-	1	20,0	4	80,0	-	-	5	100,0	
	5	-	-	2	40,0	3	60,0	-	-	5	100,0	
Grupo Total		-	-	10	40,0	13	52,0	2	8,0	25	100,0	

(**): Não foi possível determinar devido à ausência de uma das categorias.

(1): Grupo 1: Controle; Grupo 2: Orabase; Grupo 3 Quitosana em Orabase; Grupo 4: Laser 660 Nm; G Quitosana em Orabase + Laser 660 Nm.

(2): Através do teste Exato de Fisher.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A cicatrização de uma maneira geral é assunto relevante para a comunidade científica. O tema continua sendo alvo de novos estudos visto que, apesar do atual avanço da ciência, é ainda grande o número de complicações decorrentes de problemas inerentes a esse fenômeno biológico.

A cicatrização por segunda intenção, sem o uso de suturas e com maior quantidade de tecido de granulação, tem sido descrita com diferentes fases e características: inicia com a hemorragia e formação de coágulo e crosta, continua-se com a limpeza da ferida, decorrente da exsudação fibrinosa formadora de crosta por ressecamento e contendo leucócitos ativos para eliminação de microrganismos e corpos estranhos. Ocorre então a formação do tecido de granulação composto por fibroblastos, neovascularização e miofibroblastos, sendo estes últimos responsáveis pela retração da ferida. Apoiando-se no tecido de granulação e a partir de diversos pontos, há a epitelização da lesão e deposição colágena no tecido formador da cicatriz (ANDRADE, 1999; SWAIM e HENDERSON, 1997).

Paralelamente a isto é importante ressaltar que os aspectos locais como a localização das lesões e a proteção que as crostas exercem, devendo-se evitar qualquer fator que prolongue o processo inflamatório (ANDRADE, 1999).

A melhoria das opções terapêuticas para várias lesões da cavidade oral deve ser uma constante preocupação da Odontologia moderna, objetivando promover uma melhor reparação tecidual da área lesada em combinação com a minimização da sintomatologia dos processos inflamatórios agudos, com o mínimo de agressão e efeitos colaterais ao paciente (MARTORELLI, 2006).

O uso de determinados fármacos, mesmo de uso tópico, podem favorecer ou atrapalhar o processo de cicatrização e migração epitelial. Assim, é importante conhecer a

ação dos medicamentos e suas interações no processo de cura das feridas para escolha acertada do tratamento (FAZIO; ZIETLLI e GOLSLEN, 2000).

As dificuldades de tratamento e as complicações das feridas, como nos casos do diabetes, têm estimulado a ciência na busca de métodos alternativos e seguros, que auxiliem ou até mesmo acelerem os estágios da reparação tecidual, promovendo a precocidade na cura das feridas.

Seguindo este pensamento, encontra-se em ênfase a utilização de produtos naturais, como a quitosana, e o desenvolvimento da biomodulação tecidual através da Laserterapia. Ambos pelas suas propriedades estão sendo amplamente utilizados, não apenas para o tratamento de feridas, mas nas mais variadas áreas da terapêutica e da cosmética.

Todos esses fatos anteriormente discutidos motivaram o desenvolvimento da presente pesquisa.

Com relação a metodologia do presente estudo, nossa escolha pela execução de feridas em pele e não em mucosa, baseia-se no fato da necessidade de aplicação diária dos fármacos e da Laserterapia, o que obrigaria a aplicação de sedação cotidiana durante o período experimental. Tal fato inviabilizaria o andamento da pesquisa pelo aumento do custo e comprometimento da saúde dos animais. A aplicação diária na mucosa bucal implicaria trabalhar com animais de maior porte, onde a metodologia necessária ao desenvolvimento desta pesquisa, obrigaria a reduzir o número de amostras, podendo interferir na confiabilidade dos resultados. Além disso, a inflamação e cicatrização da pele ou da mucosa, qualquer que seja a etiologia de sua origem, ou seja, química, (LIMA et al., 2004) eletro-térmica (PAULO et al., 1998) ou térmica, (MEIRELES, 2005), sugerem seguir um processo bem semelhante de reparo, sendo métodos válidos neste tipo de experimento.

A escolha pela utilização de ratos da linhagem Wistar, foi definida por ter sido padronizada anteriormente em estudos recentes e mostrou-se eficiente, visto que todos os animais sobreviveram até o fim do experimento e não apresentaram complicações pós-operatórias. O sexo dos animais foi definido propositalmente, devido a variabilidade do ciclo hormonal das fêmeas, assim optamos por ratos machos (BRITO FILHO, et al, 2006).

Os estudos com ratos são amplamente utilizados para testar novas terapêuticas, as vantagens de sua utilização superam as inadequações dos resultados com aplicações diretas nos seres humanos (SHIELDS; O'KANE, 1994). As conclusões extraídas desses estudos não devem ser totalmente direcionadas aos seres humanos, mas sim, utilizadas como guias para novos estudos (WALKER, et al, 2000).

A escolha do método anestésico, sacrifício e seus agentes foram baseados na Resolução Nº 714, De 20 de Junho de 2002, do Conselho Federal De Medicina Veterinária, sendo escolhida uma técnica compatível com os fins desejados e seguro para quem o executa, causando o mínimo de estresse no animal, no operador e no observador.

A confecção das feridas no dorso do animal seguiu os parâmetros utilizados pelos estudos de MARTORELLI (2006). Entretanto não seguimos a técnica de eletrocauterização, por acreditarmos que ocorram variações na profundidade da lesão, devido a impossibilidade de padronização da pressão da mão do operador, durante a confecção das feridas através desta técnica. Com o auxílio de um "punch", medindo 05 mm de diâmetro, realizamos a confecção das feridas, removendo a derme em sua extensão total, padronizando desta forma todos os experimentos, obtendo assim feridas cicatrizadas por segunda intenção.

A determinação da dose terapêutica tanto da quitosana como do laser foi baseado na literatura pesquisada. Entretanto encontramos diferentes protocolos para ambas as formas de tratamento. A enorme variação quanto aos parâmetros utilizados em processos de cicatrização,

tem dificultado uma interpretação adequada de seus efeitos, bem como a diversidade de modelos usados. Isso porque a escolha dos parâmetros para a definição dos protocolos para a utilização tanto da quitosana como do laser é realizada segundo a experiência dos autores, uma vez que não existem parâmetros universalmente aceitos (PINHEIRO e GERBI, 2006).

Sendo assim, na composição da orabase de quitosana tomamos como base os estudos de **Alemdaroglu** (2006), onde se comprova a eficácia na cicatrização do gel de quitosana a 2%. A incorporação da quitosana nesta porcentagem permitiu a confecção de uma orabase com características de fluidez e adesividade, aparentemente, semelhantes às encontradas em outros tipos de orabase comercializadas atualmente.

Com relação à Laserterapia muitos pesquisadores que utilizam protocolos e unidades de laser similares têm relatado resultados conflitantes. Acredita-se que não há um determinado parâmetro que, por si só, produza os efeitos biomoduladores, mas a conjugação de diferentes parâmetros e suas variações de acordo com o modelo experimental (PINHEIRO e GERBI, 2006). Mesmo com todas as divergências entre os autores, optamos por seguir o que preconiza Baxter (1998), utilização do laser vermelho (660 Nm) e energia de 4J, para cicatrização tecidual.

A avaliação macroscópica empregada, embora de caráter subjetivo, é de fundamental importância no acompanhamento do processo de cura. Na prática corrente, é o meio disponível mais usual, já que em humanos, não se justificaria retirada de tecidos cirurgicamente, tão somente para acompanhamento da evolução de uma ferida no controle de eficácia dos tratamentos.

Na avaliação microscópica, a análise da colagenização, através de técnicas histológicas mais específicas, como o Tricrômico de Masson, apresenta-se como uma ferramenta fidedigna, na avaliação da cicatrização tecidual; sua aplicabilidade fica mais do que clara, já que o novo tecido é formado basicamente por uma matriz de colágeno (O' LEARY; et al, 2002). Com coloração de rotina em HE, sua diferenciação é muito difícil, as estruturas apresentam aspectos de forma e coloração muito semelhantes, o que pode confundir o

examinador, por este motivo discordamos de Brito Filho (2006), no que se refere a eficiência na quantificação e identificação das alterações celulares cicatriciais, com o uso do HE. Com a utilização da Técnica do Tricrômico de Masson, em nossa pesquisa, todas as estruturas em que continham fibras colágenas ficaram evidenciadas em azul, o que permitiu a fácil diferenciação do colágeno.

A ausência de infecção, comprova que todos os cuidados necessários com relação a anti-sepsia dos animais e a assepsia das gaiolas e dos instrumentos utilizados, foram rigorosamente obedecidas em todos os períodos do experimento, sendo o resultado padrão para todos os grupos do estudo.

A hiperemia ao redor da ferida é um fenômeno vascular, da inflamação no reparo tecidual, tendo início alguns minutos após a ação do agente flogístico, intervalo em que se processa a liberação de mediadores químicos, principalmente a histamina. Esta característica sofre modulações tanto pela intensidade do agente agressor como pelas respostas dos tecidos lesados (GUYTON, 1998). Nos resultados obtidos no estudo a hiperemia foi visualizada durante o terceiro dia de observação, principalmente no grupo 2 (100% dos animais) e 3 (60%). Já no grupo 4, em todos os animais, assim como 80% dos animais do grupo 5, nesse período, não apresentaram hiperemia peri-lesional. O que corrobora com os estudos de Cools, (1984) Veçoso (1993) e Medrado (2003), no que se refere à ação esperada da fotobiomodulação no controle da hiperemia resultante da reação inflamatória. O aparecimento de hiperemia em todos os animais do grupo 5 no sétimo dia, pode ser um sinal de uma reação não benéfica, resultante da associação das terapias com quitosana e laser.

A crosta formada logo nas fases iniciais da cicatrização é composta primariamente por concentração de fibrina, agregação plaquetária, embebidas em células sanguíneas (MARTIN, 1997). Este processo protege a ferida contra a ampla perda de eletrólitos e fluidos e contra a contaminação por agentes nocivos (MONACO e LAWRENCE, 2003). A presença da crosta pode ser observada tanto macroscopicamente como microscopicamente.

Macroscopicamente a presença da crosta foi comum para todos os grupos no terceiro dia, assim como sua ausência no décimo quarto dia. A sua ausência clínica com sete dias de observação, pode ser interpretada como um aspecto de melhor reparação da superfície epitelial (RIBEIRO, et al, 2003) sendo bem evidenciada em todos os animais do grupo 1 e 3 e em 40% dos animais do grupo 4. Microscopicamente sua intensidade no período inicial pode ser um diferencial da reparação, sendo os dados das análises micro e macroscópicas coincidentes nos períodos de três dias iniciais, quando se observa crosta com grau intenso nos grupos 1 e 3, e uma perda precoce com sete dias, também nos mesmos grupos.

A presença de bordas necróticas foi significativa apenas no período de sete dias. No grupo 1, todos os animais apresentaram bordas necróticas, neste período. O grupo 5 apresentou o melhor resultado, sendo percebida a ausência das bordas necróticas, seguido do grupos 3 e 4 com resultados idênticos (60% com ausência de bordas necróticas). De acordo com o aspecto clínico das feridas, com bordas mais regulares, evidencia-se, nesses últimos grupos, um padrão macroscópico de cicatrização melhorado (OLIVEIRA, 1992; RAMSEY, 1995; BLANES, 2004).

O aspecto sangrante no fundo das feridas pode ser considerado como um fator negativo, um eventual retardo no processo de coagulação, na fase inicial da cicatrização (BAXTER, 1994; RAMSEY, 1995; MONACO e LAWRENCE, 2003; MARTORELLI, 2006). Durante o experimento, apenas um animal no grupo 1, apresentou esta característica, apesar de não ser estatisticamente significativo.

A contração da ferida é mediada por citocinas e em particular pelo Fator de Crescimento Transformador (TGF). Através da contração, o tamanho da ferida diminui substancialmente, isto é primariamente causado pelos fibroblastos encontrados no tecido de granulação e muitos deles se diferenciam em um fenótipo, que são referidos como miofibroblastos (O' LEARY, 2002). A ocorrência da contração da ferida mais lenta no grupo

controle, deve ser considerada, isto comprova macroscopicamente a ação aceleradora da quitosana (HOWLING, et al., 2001; SENEL e McCLURE, 2004; ALEMDAROGLU, et al., 2006; DENG, et al., 2007; MUZARELLI, 2008) e da fotobiomodulação no processo cicatricial, principalmente nos períodos iniciais, possivelmente pela estimulação dos miofibroblastos (RESENDE; PEREIRA; CASTRO, 2005).

Após todo traumatismo tecidual desencadeia-se uma resposta inflamatória, que possibilita o início da cicatrização. Porém uma resposta inflamatória muito exacerbada acaba sendo nociva à cicatrização, pois compromete a microcirculação e a proliferação de fibroblastos (MAZZINI, 1999). Durante a avaliação morfológica do nosso estudo, foi verificado menor grau de inflamação, no primeiro período observacional, no grupo 4, isto está de acordo com Cools, (1984) Veçoso (1993), Ortiz (2001), Medrado (2003), Marcon e Sanfelice (2005), já que o laser atua na reação inflamatória nos primeiros dias da reparação. Da mesma forma no grupo 3 foi observada um bom controle inflamatório, pela ação da quitosana em orabase à 2%, o que corrobora com os estudos de Howling, et al. (2001); Ishihara, et al. (2002); Ueno, et al. (1999, 2001, 2007) e Muzzarelli (2008), nos quais todos eles são unânimes em relação a melhora no desempenho dos PMN, principalmente macrófagos, acelerando desta forma a cicatrização. A associação das duas formas de tratamento (Laserterapia e Quitosana) apresentou um resultado mais modesto em comparação com os grupos anteriores, mas percebe-se que há um controle mais acentuado da inflamação comparando-se com o grupo 1 (controle). No grupo 2, foi verificado que o uso apenas da orabase provocou o maior nível de reação inflamatória. Possivelmente algum dos componentes da orabase desencadeou tal reação. Com sete dias houve um aumento da inflamação em todos os grupos, com exceção do grupo 5, no qual ocorreu diminuição da resposta inflamatória, mas sem correlação estatística significativa. A tendência de diminuição da inflamação continuou no período de observação seguinte, o que corresponde a transição esperada das fases do reparo (GUYTON, 1998; BLANES, 2004).

Através da neovascularização ou angiogênese, ocorre o aporte de células, mediadores químicos e nutrição sanguínea para o local lesado. Em todos os grupos da

nossa pesquisa, a maioria dos espécimes apresentou grau de angiogênese entre moderado e intenso no terceiro dia, com exceção do grupo 3, que apresentou menor grau de angiogênese (40% leve). Já no sétimo dia os grupos 1, 4 e 5 apresentaram diminuição da angiogênese, mesmo assim, com persistência de graus mais intensos de angiogênese no grupo 4, característico da fotobiomodulação (BAXTER, 1994; GENOVESE, 2000; ORTIZ et al., 2001; MEDRADO, et al., 2003; ROCHA, 2004; CORAZZA, 2005; BOURGUIGNON-FILHO, et al., 2005). Nos grupos 2 e 3 houve uma tendência de aumento da angiogênese no mesmo período, demonstrando que a orabase e a quitosana estimularam a angiogênese de forma mais considerável nesse período de observação. Com 14 dias, todos os grupos seguem um padrão de diminuição, mas ainda foi observada angiogênese intensa e moderada nos grupos 2, 3 e 5, podendo ser interpretado como um efeito mantenedor da neovascularização nas feridas protegidas pelos fármacos (RAMSEY, et al, 1995).

A formação do tecido de granulação, de acordo com Guyton (1998) e Blanes (2004), percebe-se a partir do segundo ou terceiro dias, após o trauma. Na maioria dos espécimes estudados não foi observada a formação do tecido de granulação com 03 dias. Com sete dias de observação, já foi possível verificar a formação do tecido de granulação em todos os grupos, mais intensamente nos grupos 3 e 4, mas ainda sem diferença significativa entre os grupos. Já com quatorze dias a maioria dos espécimes, dos grupos dos grupos 1, 3 e 4, apresentaram significativa queda no nível de tecido de granulação, enquanto que os grupos 2 e 5 apresentaram tecido de granulação aumentado no mesmo período. O tecido de granulação é importantíssimo para reparação tecidual, mas a sua presença em intensidades variadas, em períodos intermediários ou tardios foi comum de acordo com nossos resultados, não sendo um parâmetro auxiliar para avaliação do grau de cicatrização, pois podem ser encontradas feridas em graus avançados de colagenização ou reepitelização, com diferentes intensidades de tecido de granulação.

Na avaliação da formação do colágeno, pode ser verificado que houve maior colagenização nos grupos 4 e 5, no terceiro dia, mas ainda de forma não significativa

estatisticamente. Na continuação das observações no sétimo dia, os grupos 3, 4 e 5 apresentaram maiores níveis de colagenização, principalmente no grupo 4. No último período observacional os grupos 3 e 4 apresentam resultados equivalentes, e o grupo 5 com resultados mais modestos que os grupos anteriores. Isto sugere que a terapêutica com quitosana e o laser, isoladamente, podem atuar de maneira favorável no processo de cicatrização tecidual (DENG, et al., 2007; MUZARELLI, 2008; MEDRADO, et al., 2003; ROCHA, 2004; CORAZZA, 2005; BOURGUIGNON-FILHO, et al., 2005). Mas a associação das terapêuticas não causou o efeito esperado, potencialização da cicatrização tecidual, não estando claro ainda o mecanismo desta interação.

No estudo da reepitelização tecidual, nos dois primeiros períodos observacionais os espécimes apresentaram características semelhantes. Já em uma observação mais tardia, houve reepitelização mais evidente nos grupos 3 e 4, seguido pelo grupo 5, o que comprova novamente que a associação da quitosana com a Laserterapia não apresenta potencialização na cicatrização, não justificando desta forma o seu uso em conjunto, para tratamento desse tipo de ferida.

De acordo com a literatura pesquisada e com os resultados desta pesquisa podemos afirmar que, o uso da Quitosana e da Laserterapia são formas de tratamento de feridas cutâneas, consagradas clínica e cientificamente. Na área Odontológica, a orabase apresenta-se como um bom veículo farmacológico, sendo possível, de acordo com nosso estudo, a associação com a quitosana, podendo ser utilizada como uma alternativa de tratamento, de baixo custo e satisfatório, para úlceras e estomatites.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais utilizadas, de acordo com os resultados obtidos durante este trabalho, podemos concluir que:

- No período inicial da cicatrização, o uso da quitosana em orabase associado à Laserterapia promoveu, macroscopicamente, maior contração da ferida e melhores padrões de cicatrização, quando comparado aos outros grupos.
- O grupo tratado com quitosana apresentou resultados semelhantes, ao grupo tratado com Laserterapia, sobre o controle da inflamação, formação de crosta e angiogênese.
- Com o uso da quitosana em orabase a 2%, foi observada maior precocidade na reepitelização.
- Com o Tricrômico de Masson, foi possível evidenciar que houve maior colagenização entre os grupos 3 e 4 de forma equivalente.
- A associação das terapias com Laser e Quitosana, apresentou melhores resultados em comparação com o grupo controle, mas sem causar potencialização da cicatrização, comparando-se com as duas formas de tratamento utilizadas isoladamente.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AKSUNGUR, P; et al. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. **J of Cont Rel**, n. 98, p. 269– 279, 2004.

ALEMDAROGLU, C. et al. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, n.32, p. 319–327, 2006.

AMORIM, J.C.F. **Reparação gengival após a técnica de gengivectomia e aplicação de laser em baixa intensidade. Avaliação clínica e biométrica em humanos.** 2001. Dissertação (Mestrado): Faculdade de Odontologia da USP; São Paulo.

ANDRADE, M.N.B; SEWARD, R; MELO, J.R.C. Curativos. **Rev Méd Minas Gerais**, v.2, n.4, p.228-236, 1992.

ANDRADE, Z.A. **Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização.** In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. Patologia processos gerais. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.135-151.

BALBINO C. A; PEREIRA L. M; CURI R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

BAXTER, G.D. **Therapeutic Lasers: Theory and Practice.** United States of America: Ed. Churchill Livingstone, 1994.

BLANES, L. **Tratamento de feridas.** Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo, 2004.

BORDINI, P. J.; GROSSO, S. F. B.; CARMO, C. Estomatologia na clínica infantil – Principais alterações bucais. **Rev. APCD**, n. 55, p.366-370, 2001.

BOURGUIGNON-FILHO, A.M; et al. Utilização do Laser de Baixa Intensidade no Processo de Cicatrização Tecidual. Revisão da Literatura. **Rev Port Estomatol Cir Maxilofac**, v.46, p.37-43, 2005.

BRITO FILHO, S.B. Análise Da Cicatrização Na Linha Alba com Uso de Extrato Aquoso de *Orbignya Phalerata* (Babaçu). Estudo Controlado em Ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.2, 2006.

CARVALHO, P.T.C.; et al. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas em ratos submetidos a irradiação de laser He-Ne. **Fitoterapia Brasil**. v. 4, n. 4, p. 253-258, jul./ago. 2003.

COLLS, J. **La Terapia Laser, Hoy**. Centro Documentación Laser de Meditec. Barcelona, 1984.

CORAZZA, A.V. **Fotobiomodulação comparativa entre o laser e o led na angiogênese de feridas cutâneas em ratos**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Quimica de São Carlos, USP, São Paulo.

DALLAN, L.A.O; OLIVEIRA, S.A.Cirurgia de revascularização transmiocárdica a laser de CO2. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v.15, p.89-104, 2000.

DENG, C. M; et al. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. **Carbohydr Polym**, 2007.

DRIESSEN, C.; et al. Estudo da reparação tecidual em ratos de feridas cutâneas tratadas com extrato de hera (*Hedera helix* L.), **Estudos de Biologia**, v.25, n.50, p.29-34, 2003.

FAZIO, M.J.; ZIETLLI, J.A.; GOLSLEN, J.B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN III W.P. et al. **Cirurgia cosmética: princípios e técnicas**. 2. ed, Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 18-23.

FREIER, T; KOH, H.S; KAZAZIAN, K; SHOICHET, M.S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. **Biomaterials**, n.26, p.5872, 2005.

GENOVESE, W.J. **Laser de baixa intensidade – aplicações terapêuticas em odontologia**. 2000. São Paulo: Lovise.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 864p.

HÉLIO S. R; et al. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. **Quim Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

HIRANO, S.; et al. Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administrations. **Progress in Biomedical Polymers**, 1990.

HOWLING, G.I.; et al. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Biomaterials**, v.22, p. 2959–2966, 2001.

IKINCI, G; et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Inter J of Pharmacol**, n. 235, p.121–127, 2002.

ISHIHARA, M; et al. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. **Biomaterials**, v.23, p.833–840, 2002.

ITO, M; BAN, A; ISHIHARA, M. Anti-ulcer effect of Chitin and Chitosan, health foods in rats. **Jpn J Pharmacol**, n. 82, p. 218-225, 2000.

JAYAKUMARA, R; et al. Graft copolymerized chitosan-present status and applications. **Carbohydr Polym**, n.62, p.142–158, 2005.

LIMEIRA JÚNIOR, F. A.; et al. Effect of Low Level Laser Therapy on the Repair of Bone Defects Grafted With Inorganic Bovine Bone. **Brasilian Dental Journal**, v. 14, n.3, 2003.

KAFETZOULOS, D.; MARTINOV, A.; BOURIOTIS, V. Em *Chitin Enzymology*; Muzzarelli, R. A. A., ed., **European Chitin Soc**: Ancona. p. 147, 1993.

KOIDE, S.S. Chitin-Chitosan: Properties, Benefits and Risks. **Nutri Res**, v.18, n.6, p.1091-1101, 1998.

LENHARO C. P; et al. Atuação dos lasers terapêuticos em periodontia. Revisão de literatura. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.18, n.3, p. 281-286, 2006.

LOW, J; REED, A. **Eletroterapia explicada: princípios e prática**. São Paulo: Manole, p. 472, 2001.

MARCON, K.; SANFELICE, E.A. Efeitos do Laser GaAlInP, no Processo de Cicatrização de Feridas Induzidas em Ratos. **Revista de Fisioterapia da FURB**, v. 1, n. 1, 2005.

MARTIN, P. Wound Healing – Aiming for Perfect Skin Regeneration, **Science**, v. 276, p. 78-80, 1997.

MARTORELLI, S. **Avaliação da orabase de aroeira à 30% na reparação tecidual**. 2006. Tese (Doutorado): Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.

MAZZINI, D. L; MANTOVANI, M. Fechamento da parede abdominal com afastamento parcial das bordas da aponeurose utilizando sobreposição com telas de vicryl ou marlex em ratos. **Acta Cir Bras**, v.14, n.1, p.28-34, 1999.

MEDRADO, A.R.A.P; et al. Influence of Low Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 32, p. 239-244, 2003.

MINAGAWA, T; et al. Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing. **Carbohydr Polym**, n.67, p. 640–644, 2007.

MONACO, J.L; LAWRENCE,W.T, Acute Wound healing – An overview. **Clin Plastic Surg.** v.3, 2003, p. 1-12.

MUZZARELLI, R.A.A., Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, **Carbohydrate Polymerj**, nov., 2008.

O' LEARY, R; WOOD, E.J; GUILLOU, P.J. Pathological Scarring: Strategic Interventions. **Eur J Surg.** v. 168,p. 523-534, 2002.

OKAMOTO, Y; et al. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydr. Polym.** n. 49, p. 249–252, 2002.

OLIVEIRA, H. P. Traumatismos nos animais domésticos. **Cad. Téc. Esc. Vet.**, v. 1, n. 7, p. 01-57, 1992.

ORTIZ, M.C.S; et al. Laser de baixa intensidade, princípios e generalidades: parte 1, **Fisioterapia Brasil**, v. 2, n. 4, p. 221-240, 2001.

PARIZOTTO, N.A; BARANAUSKAS, V. **Structural analysis of collagen fibrils after HeNe laser photostimulated regenerating rat tendon.** In: 2^o Congress World Association for Laser Therapy; 1998 Sep 2-5; Kansas City. Proceedings. Kansas City. p.66. 1998.

PARK, J.E; BARBUL, A.Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 187, p. 11-16, 2004.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 21, n. 2, p. 169-178, 2006.

PRATA, M.; et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1988.

QUEIROGA, A. S.; et al. Evaluation of the bone repair in femur of rats submitted to laser therapy in different wavelengths and images. **Laser Physics Letters**, v.9, p.71-79, 2008.

RAMSEY, D; et al. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 56, n. 7, p. 941-949, 1995.

RESENDE, M.A.; PEREIRA, L.S; CASTRO, M.S.A. Proposta de um modelo teórico de intervenção fitoterapêutica no controle da dor e inflamação. **Fitoterapia Brasil**. v. 6, n. 5, p. 368-371, set./out. 2005.

RIBEIRO, F.A.Q.; et al. O comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável de Mitomicina C. **RBO**, n.368, v. 69, 2003.

ROBBINS, S. L., et al. – **Patologia estrutural e funcional** 3ª ed. Rio de Janeiro, Editora ELSEVIER, 2005, 1422 p.

ROCHA, J.C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. **RBPS**, v.17, n.1, p. 44-48, 2004.

SANO, H. et al. Effect of chitosan rising on reduction of dental plaque formation. **Bull Tokyo Dent Coll**, v. 44, n. 1, p.9-16, 2003.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Rev**, n.56, p.1467–1480, 2004.

SHAHID, F.; ARACHCHI, J.K.V; JEVON, Y.J. Food applications of chitin and chitosan. **Trend in Food Science & Technology**, v. 10, p. 37-51, 1999.

SHIELDS, D.; O'KANE, S. Laser Photobiomodulation of Wound Healing. In: BAXTER, G.D. **Therapeutic Laser: Theory and Practice**. Ed. Churchill Livingstone, 1994.

SHIMOJOH, M; FUKUSHIMA, K; KURITAS, K. Bactericidal activity of chitosan from squid pen. Chitin Chitosan Research, Proceedings of the 10th Symposium, **Jpn Soc for Chitin and Chitosan**, n.2, p.90 – 91, 1996.

SIGINI, R. **Estudos de obtenção, purificação e caracterização da quitosana**. São Carlos, 1980. 110p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SILVA, E.B.; et al. Efeito da própolis na lâmina própria da mucosa bucal de ratos: estudo histológico. **ROBRAC**, v.9, n.28, p.4-8, 2000.

SILVA, S.; et al. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas e Avanços. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.

SIMUNOVIC, Z; IVANCOVICH, A. D; DEPOLO, A. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. **Jornal of clinical laser medicine and surgery**, v.18, n.2, p. 67-73, 2000.

STEENKAMP, et al., Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 353-357, 2004.

SWAIM, S.S.; HENDERSON, R.A. **Wound healing**. In: SWAIM, S.S.; HENDERSON, R.A. Small animal wound management. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p.101-12.

UENO, H; et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, n. 20, p. 1407-1414, 1999.

UENO, H. et al. Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. **Biomaterials**, n.22, p.1667-1673, 2001.

UENO, H. et al. Chitosan application to X-ray irradiated wound in dogs Journal of Plastic. **Reconstr and Aesthetic Surg**, n. 60, p. 304-310, 2007.

VINCK, E.M; et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v.18, p.95-99, 2003.

WALKER, M.D.; et al. Effect of Low Intensity Laser Irradiation (660 nm) on a Radiation Impaired Wound Healing Model in Murine Skin. **Laser in Surgery and Medicine**, v. 16, p. 41-47, 2000.

WITTE, M.B, BARBUL, A. **Princípios gerais da cicatrização das feridas**. In: Barbul A, editor. *Clínicas Cirúrgicas da América do Norte*. Rio de Janeiro: Interlivros; 1997.

APÊNDICE

APÊNDICE – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DAS GAIOLAS**PESQUISA:**

AVALIAÇÃO DA ORABASE DE QUITOSANA ASSOCIADA OU NÃO AO LASER VISÍVEL DE λ 660 NM NA REPARAÇÃO TECIDUAL

RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA:

Orientadores – Tânia Lemos Coelho Rodrigues/ Francisco Limeira Júnior

Doutorando – Ricardo A. S. Gurgel

GRUPO:

Animais	Nascimento	Massa corporal	Sacrifício
01			
02			
03			
04			
05			

ÓBITOS:

ANEXOS