

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM SAÚDE

ESTUDO HISTOLÓGICO COMPARATIVO
ENTRE LASER DE BAIXA POTÊNCIA,
PRÓPOLIS E ASSOCIAÇÃO DE AMBOS SOBRE
LESÕES DE PELE DE *Rattus norvegicus albinus*

MARIA CRISTINA GOMES SOUZA FREIRE

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM SAÚDE

ESTUDO HISTOLÓGICO COMPARATIVO
ENTRE LASER DE BAIXA POTÊNCIA,
PRÓPOLIS E ASSOCIAÇÃO DE AMBOS SOBRE
LESÕES DE PELE DE *Rattus norvegicus albinus*

MARIA CRISTINA GOMES SOUZA FREIRE

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Saúde da Universidade José do
Rosário Vellano, como parte das
exigências para a obtenção do grau
de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Rodrigo Tavares

Freire, Maria Cristina Gomes Souza

Estudo histológico comparativo entre laser de baixa potência.../--Maria Cristina Gomes Souza Freire. -- Alfenas: UNIFENAS, 2010.

105 f.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts

1. Laser 2. Própolis. 3. Pele. 4. Fibroblastos. 5. Vasos Sanguíneos I. Título.

CDU: 611.018(043)

MARIA CRISTINA GOMES SOUZA FREIRE

ESTUDO HISTOLÓGICO COMPARATIVO ENTRE LASER
DE BAIXA POTÊNCIA, PRÓPOLIS E ASSOCIAÇÃO DE
AMBOS SOBRE LESÕES DE PELE DE *Rattus norvegicus*
albinus

A banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação de Mestrado, elaborada por Maria Cristina Gomes Souza Freire e sob a orientação do Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Profa. Dra. Alessandra Esteves

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL

Profa. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa

Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS

Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts

Orientador

“É importante você acreditar que vencerá

Aquilo que você deseja fortemente na
mente acaba acontecendo

Um desenho disforme impede a realização
do objetivo

Creia firmemente que tudo lhe sairá bem

Alimente a esperança

A Lei Universal do amor responde
positivamente aos nossos anseios desde
que não lesem os outros

Quem luta e serve, confiante na vitória,
constrói embarcação segura em que
navegará amanhã.”

Lorival Lopes - 1996

Dedico este trabalho:

A minha família, em especial, ao meu esposo, Erik, pelo incentivo, companheirismo, dedicação e paciência ao longo dessa jornada.

Aos meus filhos, Carolina, Enzo e João Herman, que mesmo privados de alguns momentos de carinho, estiveram sempre ao meu lado.

A minha mãe, Maria das Graças, através de seu exemplo, me ensinou a superar dificuldades e ter fé sempre, independente das circunstâncias.

A minha irmã, Ana Paula, pelo grande apoio e dedicação aos meus filhos.

A minha sogra, Leninha, pela simplicidade e sapiência em conduzir os fatos da vida, sempre apoiando novos projetos da família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração em minha vida, com Ele, sei que “Tudo posso naquele que me fortalece” (Fil 4:13).

À UNIFENAS, em especial, a Dra. Maria do Rosário Araújo Velano, por propiciar condições favoráveis à conclusão do mestrado.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts, pela orientação deste trabalho, confiança depositada e grande experiência na área pesquisada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rodrigo Tavares, pela co-orientação, confiança, vasto conhecimento na área e amizade ao longo desses anos.

À Prof.^a Marlene Leite Godoy Vieira de Souza, pelo incentivo constante, pela confiança depositada e por ser um grande exemplo profissional e mulher, com certeza, um referencial para muitos.

Aos alunos Cassiano Henrique Geovanini Vanzelli (Curso de Fisioterapia), Carlos Henrique Gomes (Curso de Educação Física) e Phillipe Vidal (Curso de Educação Física), pelo companheirismo e enorme colaboração durante a fase experimental deste trabalho.

Ao colega de profissão, Renan Botega, que se disponibilizou em levar o equipamento de laser para aferição no Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, responsável pelo Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, pela colaboração em aferir o equipamento de laser.

As docentes Msc. Walkíria Vieira Alves, Msc. Evelise Aline Soares, Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira (UNIFENAS) e Dra. Alessandra Esteves (UNIFAL), pela acolhida, prontidão e desprendimento nos momentos em que necessitei de auxílio.

Aos funcionários João (Biotério), José Claudinei e Cida (Patologia), Lílian Karla (Clínica de Fisioterapia), Luciana (Laboratório de Fisiologia), pela disposição em colaborar para o desfecho da fase experimental do trabalho.

Aos vários professores que nos acompanharam ao longo desse período, cada um proporcionou momentos ímpares, porque doaram muito além do conhecimento científico, estiveram ali de corpo e alma, de fato querendo e fazendo a diferença.

Aos colegas de mestrado e amigos, em especial, Gerusa e Ana Paula, por dividir inquietações, preocupações, responsabilidades, momentos de alegria e descontração.

Guardarei cada um de vocês em meu coração!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Pele humana	26
FIGURA 2 – Instrumentais cirúrgicos	63
FIGURA 3 – Ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus albinus</i>)	64
FIGURA 4 – Pesagem dos ratos	64
FIGURA 5 – Anestesia dos ratos	65
FIGURA 6 – Aspecto da lesão induzida	65
FIGURA 7 – Tratamento da lesão – Própolis	66
FIGURA 8 – Tricotomia dorsal dos ratos.....	66
FIGURA 9 – Indução da lesão – Punch metálico	67
FIGURA 10 – Laser baixa intensidade	67
FIGURA 11 - Tratamento da lesão.....	68
FIGURA 12 – Animais pós procedimento cirúrgico	68
FIGURA 13 – Contenção de animais	69
FIGURA 14 - Tela do programa ImageLab 2000 durante o procedimento de captura das imagens para quantificação de fibroblastos e vasos sanguíneos. Em detalhe, captura histológica do grupo tratado com Própolis a 5% - 3 dias	69

FIGURA 15 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser – 3 dias.....	70
FIGURA 16 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser – 7 dias.....	70
FIGURA 17. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser – 14 dias.....	71
FIGURA 18 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser e própolis a 10% – 3 dias	71
FIGURA 19 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com grupo controle laser – 7 dias	72
FIGURA 20. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser e própolis a 5% – 3 dias	72
FIGURA 21 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser e própolis a 5% – 7 dias	73
FIGURA 22. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento do grupo controle própolis – 3 dias	73
FIGURA 23. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com própolis a 10% – 7 dias.....	74
FIGURA 24. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com própolis 5% – 3 dias.....	74
FIGURA 25. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com própolis 5% – 7 dias.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - Cromatograma de íons totais do extrato etanólico a 80% da própolis coletada no município de Santa Luzia, Minas Gerais _Brasil 59
- GRÁFICO 02 - Comparação entre as médias de fibroblastos dos tecidos conjuntivos dos ratos submetidos aos tratamentos nos quatro períodos 91
- GRÁFICO 03 - Comparação entre as médias de vasos sanguíneos dos tecidos conjuntivos dos ratos submetidos aos tratamentos nos quatro períodos 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Relação de algumas propriedades “biológicas” da própolis em ordem cronológica	54
Tabela 02 - Avaliação dos compostos polares do extrato etanólico de própolis por CGAR-AT-EM, esboçados no cromatograma.....	59
Tabela 03 - Efeito do laser sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	80
Tabela 04 - Efeito da própolis a 5% sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	84
Tabela 05 - Efeito da própolis a 10% sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	86
Tabela 06 - Efeito do grupo controle laser sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados	88
Tabela 07 - Efeito do grupo controle própolis sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados	88
Tabela 08 - Efeito da associação de laser e própolis a 5% sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	89
Tabela 09 - Efeito da associação de laser e própolis a 10% sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	90

Tabela 10 - Efeito do laser sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	92
Tabela 11 - Efeito da própolis a 5% sobre a contagem vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	93
Tabela 12 - Efeito da própolis a 10% sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados	94
Tabela 13 - Efeito do grupo controle laser sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados	97
Tabela 14 - Efeito do grupo controle própolis sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados	98
Tabela 15 - Efeito da associação de laser e própolis a 5% sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	98
Tabela 16 - Efeito da associação de laser e própolis a 10% sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

LASER - Light Amplification by stimulated Emission of Radiation – Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação

LBP - Laser de Baixa Potência

J/cm² - Joules por centímetro quadrado

ANSI - American National Standards Institute

W/cm² - Watts por centímetro quadrado

HeNe - Hélio-neônio

AsGa - Arseniato de gálio

mm² - Milímetros quadrados

mW - Miliwatts

nm - Nanômetro

Hz - Hertz

HE - Hematoxilina eosina

AsGaAl - Arseniato de Gálio e Alumínio

TLBI - Terapia a Laser de Baixa Intensidade

LLLT - Low Level Light Therapy – Terapia de Baixa Intensidade de Luz

FDA - Food and Drug Administration

N² - Nitrogênio

LED - Emissão de Luz Diodo

Ip - Intraperitoneal

CCDAE - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CG-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

NO - Óxido Nítrico

CAPE - Ácido fenil éster cafeico

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

GL - Gradação alcoólica

CONAP - Cooperativa Nacional de Apicultura Belo Horizonte/MG

μL - Microlitro

CGAR-AT - Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura

CGAR-AT-EM - Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura acoplada
a espectrometria de massas

RESUMO

FREIRE, Maria Cristina Gomes Souza. Estudo histológico comparativo entre laser de baixa potência, própolis e associação de ambos sobre lesões de pele de *Rattus norvegicus albinus*. Orientador: Mário Sérgio Oliveira Swerts; Co-orientador: Marcelo Rodrigo Tavares. Alfenas: UNIFENAS, 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde)

O tratamento de feridas envolve aspectos sistêmicos e locais desenvolvidos por profissionais de diferentes áreas, destacando-se o laser de baixa potência e a própolis. Objetivou-se identificar e comparar histologicamente os efeitos da aplicação do laser de baixa potência (LBP) 658 nanômetros (nm), da própolis e associação de ambas sobre lesões de pele de *Rattus norvegicus albinus*, induzidas cirurgicamente, por meio de estudo histológico. Utilizaram-se 140 ratos albinos, machos da linhagem WISTAR (*Rattus norvegicus albinus*), com 16 semanas, peso 350 a 500g, provenientes do Biotério Central da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS. Após a anestesia geral com uso de ketamina® (cloridrato de cetamina)/ Rompun® (cloridrato de xilazina) (0,2 mL para cada 100g de peso por animal, sendo 50% de ketamina e 50% de Rompun), os ratos foram submetidos à tricotomia no dorso (região entre as escápulas) e, posteriormente, à excisão cirúrgica circular da epiderme, com uso do *punch* devidamente milimetrado (0,5 cm de diâmetro). Os animais foram distribuídos em 7 grupos: GL: aplicando-se o *laser* de baixa potência 658 nm, 15 mW de potência, com densidade de energia radiante de 3 J/cm², com aplicação do tipo pontual, no centro da excisão, durante 03 (três), 07 (sete), 14 (catorze) e 21 (vinte e um) dias consecutivos; GP5%: os ratos foram submetidos à aplicação da própolis a 5%; GP10%: os ratos foram submetidos à aplicação da própolis a 10%; GCL (Controle Laser): os ratos controle foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém com o aparelho de *laser* desligado; GCP: os ratos controle foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém com o uso de solução composta por água deionizada estéril e álcool a 15%; GLP5%: os ratos foram submetidos à aplicação de laser de baixa potência associado a própolis 5%; GLP10%: os ratos foram submetidos à aplicação de laser de baixa potência associado a própolis 10%. Após o sacrifício dos animais, procedeu-se à análise histológica para análise quantitativa do número de fibroblastos e vasos sanguíneos, por meio de microscopia de luz. Processaram-se os resultados e, por meio da média e desvio padrão em cada grupo, foram aplicados os testes estatísticos, alicerçados pelo programa SPSS 15.0, versão 2007. Os resultados evidenciaram que aos 3 dias com tratamento laser; aos 7 dias com tratamento própolis a 5%; aos 14 e 21 dias com tratamento associado de laser e própolis a 10% diferiram estatisticamente (Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,05$) quando comparados aos demais grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa aos 3, 7, 14 e 21 dias com tratamento associado de laser e própolis a 5%, porém, ao comparar os grupos associados com demais grupos, seus resultados foram significativos. Diante dos resultados, principalmente aos 3 e 7 dias, observou-se que tanto o laser quanto a própolis contribuíram para um reparo mais rápido da lesão.

Palavras chaves: 1) Laser 2) Própolis 3) Pele 4) Fibroblastos 5) Vasos sanguíneos

ABSTRACT

FREIRE, Maria Cristina Gomes Souza. Comparative histological study between low power laser, propolis, and the association of both in the treatment of skin lesions in *Rattus norvegicus albinus*. Advisor: Mário Sérgio Oliveira Swerts. Co-advisor: Marcelo Rodrigo Tavares. Alfenas: UNIFENAS, 2010. Dissertation (Master's degree in Health Care)

Wound treatment involves local and systemic aspects developed by professionals from different fields, such as low power laser and propolis. The purpose of this study was to identify and histologically compare the effects of the application of 3 treatments on surgically induced skin wounds in rats: 658 nm low power laser (LPL); propolis; and LPL laser + propolis. One hundred and forty-four male Wistar albino rats (*Rattus norvegicus albinus*), aged 16 weeks, weighing 350-500g, from the Unifenas Central Biotherium, were used. After general anesthesia with ketamine® (ketamine hydrochloride) / Rompun® (xylazine) (0.2 mL per 100g of animal weight: 50% ketamine and 50% Rompun), the rats were shaved on the back between the shoulder blades, and then submitted to the punch excision of the skin. The animals were divided into seven groups: GL: treated with 15 mW 658 nm LPL, with radiant energy density of 3 J/cm², with spot-type application in the center of the excision, during 3 (three), 7 (seven), 14 (fourteen) and 21 (twenty-one) consecutive days; GP5%: treated with 5% propolis; GP10%: treated with 10% propolis; GCL (Control Laser): control rats underwent the same procedures, but with the laser device off; GCP: control rats underwent the same procedures, but treated with a solution of sterile deionized water and 15% alcohol; GLP5%: treated with LPL associated with 5% propolis; GLP10%: treated with LPL associated with 10% propolis. The animals were sacrificed and histologically processed for the quantitative analysis of fibroblasts and blood vessels by means of light microscopy. Statistical tests were applied by the mean and the standard deviation in each group, based on the program SPSS 15.0, version 2007. The results showed statistical differences (Kruskal-Wallis, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$) in LPL treatment on day 3; 5% propolis treatment on day 7; LPL + 10% propolis on days 14 and 21, when compared with the other groups. No significant statistical difference was found on days 3, 7, 14 and 21 with the LPL and 5% propolis, but, when compared with the other groups, the results were significant. In face of the results, especially on days 3 and 7, both laser and propolis contributed to a faster wound healing.

Keywords: 1) Laser 2) Propolis 3) Skin 4) Fibroblasts 5) Blood vessels.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	JUSTIFICATIVA	24
4	REVISÃO DE LITERATURA	25
4.1	HISTOLOGIA DA PELE	25
4.2	CICATRIZAÇÃO	26
4.2.1	Fase Inflamatória ou Exsudativa	27
4.2.2	Fase Proliferativa	28
4.2.3	Fase de Maturação e Remodelação	28
4.3	LASER E LASERTERAPIA	30
4.4	DEFINIÇÃO DE PRÓPOLIS	40
4.5	CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS	41
4.6	PROPRIEDADES DA PRÓPOLIS	43
4.6.1	Biológicas	43
4.6.2	Antimicrobiana	44
4.6.3	Anti-inflamatória	45
4.6.4	Antioxidante	46
4.6.5	Antiviral	47
4.6.6	Cicatrizante	47
4.6.7	Imunomodulatória	50
4.6.8	Outras Propriedades	50
5	MATERIAL E MÉTODOS	55
5.1	SOLUÇÃO DE PRÓPOLIS	56

5.1.1	Derivatização das amostras de própolis.....	56
5.1.2	Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (CGAR-AT) do extrato etanólico de própolis.....	57
5.1.3	Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura acoplada à espectrometria de massas (CGAR-AT-EM) do extrato etanólico de própolis.....	57
5.1.4	Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (CGAR-AT) e cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura acoplada à espectrometria de massas (CGAT-AT-EM) do extrato etanólico de própolis.....	58
5.1.5	Preparo da solução de própolis para os grupos experimentais.....	60
5.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	60
5.2.1	O sacrifício dos animais e preparação do material.....	62
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	62
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
7	CONCLUSÕES.....	103
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXOS.....	125

1 INTRODUÇÃO

Ferida pode ser definida como qualquer alteração da integridade anatômica da pele, resultante de qualquer tipo de trauma (DECLAIR, 2002).

Essa alteração com conseqüente perda tecidual pode ser caracterizada como uma ferida de espessura parcial (derme incompleta), que ocorre após muitos procedimentos dermatológicos, como a dermoabrasão, o *resurfacing* por *laser* ou *peelings* químicos; pode também ser causada por traumatismos. A reparação faz-se pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida. Como resultado final tem-se uma cicatriz praticamente imperceptível. Já as feridas de espessura total (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo) necessitam da formação de um novo tecido, o tecido de granulação; a epitelização, base da cicatrização nas feridas de espessura parcial, acontece apenas nas margens da ferida (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

O processo de cicatrização por segunda intenção caracteriza-se por indução do reparo em feridas com perda maior de células e tecidos. A reação de granulação cresce a partir da margem para completar a reparação. Como em feridas extensas não há união das bordas, existe formação do coágulo de fibrina que preenche o defeito e mais detritos necróticos e exsudatos devem ser removidos. O fator que diferencia a cicatrização primária da secundária refere-se ao fenômeno da contração da ferida. As etapas iniciais da contração da ferida envolvem a formação de rede de fibroblastos contendo actina na margem da ferida (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

A reparação tecidual comum a todos os tipos de tecidos do organismo pode ser dividida em três fases caracterizadas por inflamação, proliferação e remodelagem. A exata duração de cada fase não é distinta, devido às fases se sobreporem e também pela variabilidade de um caso para outro. Entretanto, existem efeitos temporais prefixando a duração de cada fase (REED, 1996).

O tratamento de feridas envolve aspectos sistêmicos e locais, que são desenvolvidos por profissionais de diferentes áreas. O tratamento é denominado curativo e constitui do procedimento de limpeza e cobertura de uma lesão, com o objetivo de auxiliar o restabelecimento da integridade do tecido (DECLAIR, 2002).

Segundo Hess (2002), existem mais de 2000 produtos no mercado para tratar feridas, o que torna a escolha do curativo correto uma tarefa difícil e desafiadora.

Dentre os vários tratamentos existentes no mercado, destaca-se o laser de baixa potência. A laserterapia de baixa potência tem sido investigada e utilizada na prática clínica há aproximadamente 20 anos, sendo que os trabalhos iniciais foram realizados na Europa por *Mester* (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991; GAM; THORSEN e LONNBERG, 1993) no início da década de 1970. O crescente interesse pelos efeitos do laser tem sido demonstrado pela significativa quantidade de publicações científicas, por meio de experimentos controlados em animais e humanos (KARU, 1998; MATERA; DAGLI e PEREIRA, 1994).

A maioria dos trabalhos sobre a aplicação de laser para cicatrização de feridas cutâneas mostra efeitos positivos observados por meio da proliferação de fibroblastos, células endoteliais e aumento na deposição de colágeno e queratina (MATERA; MATERA; DAGLI e PEREIRA, 1994; LUCAS; GEMERT e HAAN, 2003; HOPKINS *et al.*, 2004; TATARUNAS; MATERA e DAGLI, 1998; NORONHA *et al.*, 2004).

Segundo Kitchen (2003), o laser de baixa potência apresenta bons resultados em feridas de qualquer natureza. Possui os seguintes efeitos terapêuticos: é anti-inflamatório, analgésico, antiedematoso e cicatrizante. O efeito anti-inflamatório justifica-se por dois fatores: a interferência na síntese de prostaglandinas, cuja redução decresce as alterações proporcionadas pela inflamação, e o estímulo à microcirculação, garantindo um aporte eficiente de elementos nutricionais e defensivos para região lesada, favorecendo sua regeneração.

O efeito analgésico é explicado pela diminuição da inflamação, elevação do limiar doloroso nas terminações nervosas livres e interferência da mensagem elétrica, por

meio da manutenção do potencial de membrana. O efeito antiedematoso pode ser justificado pelo estímulo à microcirculação, favorecendo melhores condições de drenagem do plasma, e à ação fibrinolítica, proporcionando a resolução efetiva do isolamento causado pela coagulação do plasma (VIEIRA, 2006).

Já o efeito cicatrizante do laser é o que mais se destaca. É caracterizado pelo incremento à produção de ATP e aumento da síntese protéica, tendo como consequência, o incremento da regeneração tecidual em um processo de reparação. O estímulo à microcirculação, aumentando o aporte de elementos nutricionais, associado ao aumento da velocidade mitótica, facilita a multiplicação das células, assim como a neovascularização, o que também contribui para a cicatrização (ROCHA *et al.*, 2003; ROCHA-JUNIOR *et al.*, 2006; VIEIRA, 2006; MILLIS; FRANCIS e ADAMSON, 2008).

Outra modalidade terapêutica para a cicatrização de feridas cutâneas é o uso da própolis. Ela é uma substância resinosa natural, coletada pelas abelhas para assepsia e proteção da colméia contra insetos e microorganismos, sendo responsável pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento antisséptico (GERALDINI; SALGADO e RODE, 2000).

É um dos muitos produtos naturais que vêm sendo utilizado durante séculos pela humanidade (VARGAS *et al.*, 2004). Seu uso na medicina popular data de 300 a.C. (SILVA *et al.*, 2006).

Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes, e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas (PEREIRA; SEIXAS e AQUINO NETO, 2002).

A própolis tem sido objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos nos últimos 30 anos. Em várias partes do mundo é indicada para melhorar a saúde de maneira geral e prevenir doenças, como inflamação, doenças do coração, diabetes e câncer (KADOTA *et al.*, 2002). Problemas tratados com própolis incluem mau hálito (halitose), eczema, infecções na garganta, úlceras e infecções urinárias (PEREIRA; SEIXAS e AQUINO NETO, 2002). Especificamente nas feridas cutâneas, a própolis

apresenta um fator anti-inflamatório e antibacteriano, o que conseqüentemente melhora a cicatrização das feridas (RAMOS e MIRANDA, 2007).

No Brasil, o interesse pela própolis aconteceu somente na década de 1980 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, demonstrando em seu livro “Abelhas e saúde”, as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (LIMA, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e comparar histologicamente os efeitos da aplicação do laser de baixa potência (LBP), de 658 nanômetros (nm) e da própolis, bem como a associação de ambas sobre lesões de pele de ratos, induzidas cirurgicamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e comparar os efeitos do LBP 658nm, própolis a 5%, 10%, e associação de LBP 658nm com própolis a 5% e a 10% na indução de fibroblastos nas lesões epiteliais induzidas cirurgicamente;
- Comparar os efeitos do LBP 658nm, própolis a 5%, 10%, e associação de LBP 658nm com própolis a 5% e a 10% sobre o número de vasos sanguíneos nas lesões epiteliais induzidas cirurgicamente.

3 JUSTIFICATIVA

Os recursos, tecnologias e procedimentos para o tratamento de feridas são fragmentados, consistindo em relatos isolados, frequentemente descontinuados, sobre um ou outro tipo de agente tópico ou cobertura em alguns tipos de ferida, e os resultados não trazem evidências precisas quanto o custo/benefício de cada um deles, como refere Dantas Filho (2003).

O impacto social e econômico da cronificação de feridas e suas consequências devido à infecção local ou sistêmica, tem sido alvo de grande preocupação por parte dos profissionais, fazendo com que, na década de 1990, a utilização de antissépticos e dos mais variados tipos de agentes antimicrobianos se tornasse uma panacéia com repercussões extremamente danosas (RIBEIRO, 2003).

Embora não haja dados precisos no Brasil, os impactos psíquicos, sociais e econômicos da cronificação de lesões na pele representam a segunda causa de afastamentos do trabalho (ERENO, 2004).

Segundo Tavares, Mazer e Pastorello (2005), os estudos em animais, embora avancem e diminuam a lacuna existente entre a pesquisa e a prática clínica, ainda restam alguns questionamentos a serem respondidos com relação ao laser de baixa potência, tais como: dose ideal para um determinado tratamento, tipo de laser a ser utilizado, fase da inflamação ideal para a intervenção laserterápica e outros fatores não citados pelos autores.

Segundo Barbosa *et al.* (2009), o uso terapêutico da própolis no tratamento de lesões tem resultados promissores, porém, os estudos sobre o seu uso em feridas ainda são escassos, embora se perceba intensificação da realização destes a partir de 2002.

Além destes fatores acima citados, há uma carência, na literatura específica, de estudos comparando os efeitos do laser de baixa potência e os efeitos da própolis na cicatrização de feridas cutâneas, o que aumenta ainda mais a pertinência deste tipo de trabalho.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 HISTOLOGIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano. Representa 16% do peso corporal e desempenha múltiplas funções como: proteção do corpo contra efeitos ambientais, contenção das estruturas do corpo, perda de líquido e escoriações, regulação de calor, barreira física contra a invasão do nosso organismo por patógenos. Oferece sensibilidade e ainda realiza a síntese e armazenamento de vitamina D (MOORE e DALLEY, 2007).

A pele consiste em duas camadas principais, o epitélio de superfície ou epiderme e a camada de tecido subjacente, o cório ou derme. Abaixo da derme encontra-se a fáscia superficial ou hipoderme. A hipoderme está intimamente ligada à fáscia profunda subjacente, aponeurose ou periósteo (COTRAN; KUMAR e ROBBINS, 2000).

A epiderme é um tecido queratinizado e não possui vasos sanguíneos ou linfáticos; presume-se que seja nutrida por capilares da derme subjacente, por difusão através do líquido tissular, que forma um plexo cutâneo de artérias anastomosadas (MOORE e DALLEY, 2007).

Embora os limites entre as porções de tecido epitelial e conjuntivo da pele sejam nítidos, os elementos fibrosos da derme misturam-se com os da hipoderme de modo que não há uma delimitação entre tais camadas (COTRAN; KUMAR e ROBBINS, 2000).

Em geral, a superfície externa da derme em contato com a epiderme é irregular e está elevada em papilas que se projetam nas concavidades entre as cristas da superfície profunda da epiderme. É a camada papilar e a camada mais profunda da derme, camada reticular, sendo que as duas não podem ser separadas (COTRAN; KUMAR e ROBBINS, 2000).

Quando analisadas as fibras elásticas da derme, de acordo com Cotran, Kumar e Robbins (2000), elas formam redes abundantes e espessas entre os feixes colágenos e estão condensadas ao redor dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas e sudoríparas. Na camada papilar elas são muito mais delgadas e formam uma rede contínua e fina nas papilas abaixo do epitélio. As células da derme são mais abundantes na camada papilar do que na reticular e são semelhantes às da camada subcutânea, a não ser pela exiguidade relativa de células adiposas.

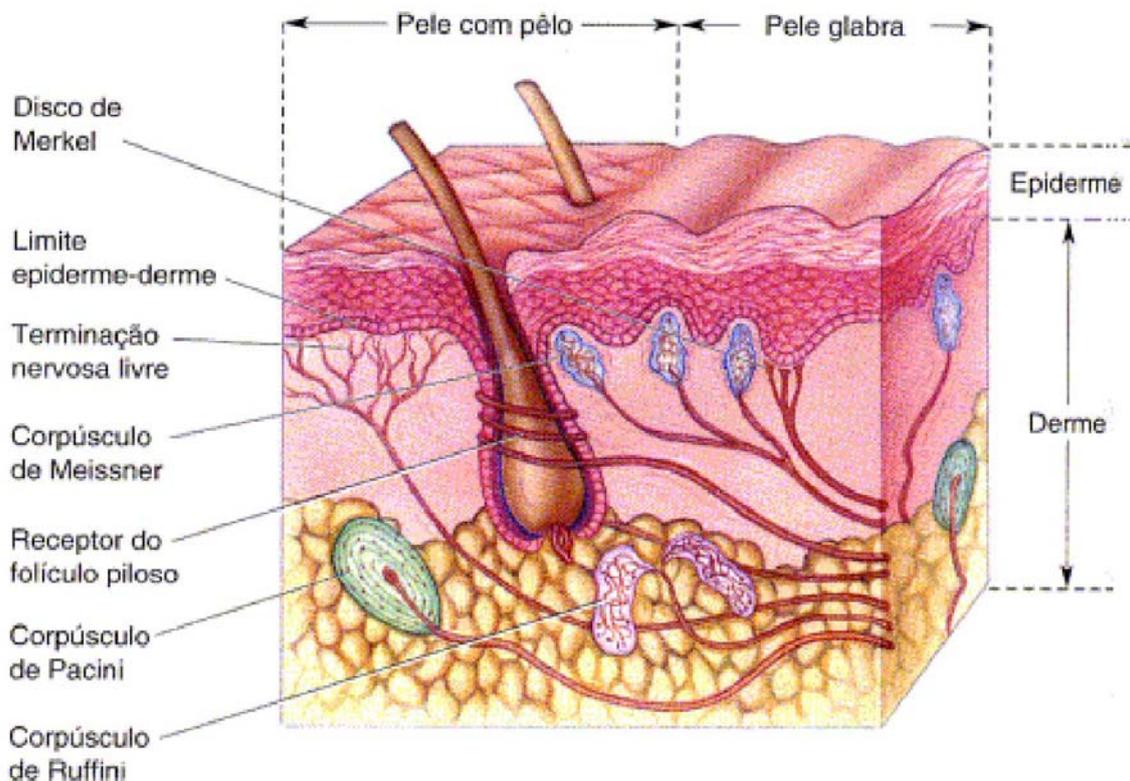


FIGURA 1 - Pele humana. Disponível em www.afh.bio.br/tegumentar/tegumentar.asp.

4.2 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é um processo fisiológico iniciado com uma resposta inflamatória, caracterizando um aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade capilar e migração de leucócitos (MODOLIN e BEVILACQUA, 1985).

A literatura demonstra que, nos primeiros dias, os eventos de reparo estão direcionados para prevenção de perda subsequente de sangue, ou seja, a hemostasia e formação de trombo, que fornece matriz preliminar para processos seguintes, nas quais as plaquetas aderem ao colágeno no espaço perivascular (CANDIDO, 2001).

Logo que ocorre a lesão, inicia-se uma resposta vascular. Primeiramente, com uma vasoconstrição (por ação da noradrenalina e contração do endotélio), e minutos depois, com uma vasodilatação. Consequentemente, células inflamatórias são atraídas para o local, tais como: neutrófilos, leucócitos, plaquetas e eritrócitos, sendo esses dois últimos responsáveis pela diminuição do extravasamento de sangue no local. Com a ação da histamina alterando a permeabilidade vascular, ocorre a formação do edema local. Este estágio está dentro da inflamação aguda, que perdura por cerca de 1 a 3 dias e caminha para a cura, com o tecido de granulação ou uma inflamação crônica (BAXTER, 1994).

Segundo Candido (2001), a reparação tecidual ocorre em três fases distintas descritas a seguir:

4.2.1 Fase Inflamatória ou Exsudativa

Sua duração é de aproximadamente 48 a 72 horas. Caracteriza-se pelo aparecimento dos sinais prodrômicos da inflamação: dor, calor, rubor e edema. Mediadores químicos provocam vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorecem a quimiotaxia dos leucócitos. Neutrófilos combatem os agentes invasores, e macrófagos realizam a fagocitose (CANDIDO, 2001).

4.2.2 Fase Proliferativa

Tem duração de 12 a 14 dias. Ocorre neoangiogênese, produção de colágeno pelos fibroblastos e intensa migração celular, principalmente queratinócitos, promovendo a epitelização. A cicatriz possui aspecto avermelhado (CANDIDO, 2001).

4.2.3 Fase de Maturação e Remodelação

A terceira etapa pode durar de meses a anos. Ocorre reorganização do colágeno, que adquire maior força tênsil e empalidece. A cicatriz assume a coloração semelhante à pele adjacente (CANDIDO, 2001).

O tecido de granulação ao se contrair, retrai as bordas da ferida de pele para o centro da ferida, permitindo que a área a ser reepitelizada seja menor (OLIVEIRA, 1992).

Oliveira (1992) relata ainda que, quando há granulação excessiva, ocorre um retardamento na cicatrização. A prevenção pode ser obtida pelo fornecimento de uma cicatrização subcristal, sendo que a formação da crosta em feridas não exsudativas favorece o processo de cicatrização, e isto pode ser conseguido através de diversas substâncias e recursos.

A cicatrização depende de vários fatores, tais como: localidade, tipo de pele, raça, técnica cirúrgica utilizada. Pode variar se a ferida ocorre no feto, no recém-nascido ou no indivíduo adulto (JULIA *et al.*, 1992), estados de saúde e nutricional do paciente, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, uso de fármacos sistêmicos e ressecamento do leito da ferida durante a cicatrização (MANDELBAUN *et al.*, 2003).

Os principais fatores que podem favorecer a cicatrização são: programas de controle de infecções; combate ao estresse, devido a sua interferência malévolamente no equilíbrio

hormonal orgânico; uso de substâncias farmacológicas que comprovadamente apresentem favorecimento do processo cicatricial (MARTINS *et al.*, 2006).

A resposta à cicatrização não existe de forma absoluta, pois, feridas diferentes, em diferentes tipos de pacientes, requerem diferentes formas de tratamento. Como refere Dealey (2001), “não se pode fazer esse tipo de comparação de forma absoluta”, pois o tratamento de lesões com o objetivo de favorecer sua cicatrização não se restringe ao estabelecimento de rotinas para trocas de curativos ou ao estabelecimento de protocolos sobre o uso de produtos.

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A migração e proliferação dos fibroblastos são desencadeadas por fatores de crescimento e citocinas fibrogênicas, parcialmente derivadas dos macrófagos inflamatórios (COTRAN; KUMAR e ROBBINS, 2000).

Os fibroblastos são estimulados a produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização (AMADEU *et al.*, 2003). Eles estão sujeitos a mudanças devido às forças mecânicas às quais são submetidos durante situações patológicas ou fisiológicas e, assim, organizam as fibras colágenas e estão diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico da célula (HILDEBRAND *et al.*, 2005).

Durante a formação do tecido de granulação, fibroblastos e células endoteliais proliferam e se movem para o interior da ferida, produzindo matriz extracelular e angiogênese (SINGER e CLARK, 1999). Muitos fibroblastos adquirem alguns aspectos morfológicos e bioquímicos de células musculares lisas, onde essas modificações darão origem aos miofibroblastos (DESMOULIÈRE e GABBIANI, 1996).

Os miofibroblastos participam na síntese da matriz extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida (TOMASEK *et al.*, 2002) e, segundo Gabbiani (2003), sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões, processo conhecido como contração da ferida.

Os fibrócitos são fibroblastos inativos cuja atividade celular é a fibrose (BANKS, 1992). Eles são considerados importantes no processo cicatricial por contribuírem no mecanismo de formação do granuloma, na atividade antigênica, na produção de colágeno e na matriz protéica, participação na remodelagem e na inflamação, como fonte rica de citocinas (ABE *et al.*, 2001; QUAN *et al.*, 2004), na produção de fatores de crescimento, na produção de fatores angiogênicos, na contribuição para a formação de novos vasos sanguíneos e em algumas desordens fibróticas (METZ, 2002; QUAN *et al.*, 2004).

Durante a cicatrização, os fibrócitos podem ser recrutados do tecido adjacente não lesado, revertendo-se para o estado de fibroblasto e reativando sua capacidade de síntese (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Os fibrócitos podem ser encontrados em vários tecidos, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (BUCALA *et al.*, 1994). Eles são derivados de precursores da medula óssea e contribuem para a presença de miofibroblastos no tecido cicatricial (MORI *et al.*, 2005).

4.3 LASER E LASERTERAPIA

O *laser* foi idealizado por Albert Einstein em 1917, que expôs os princípios físicos da emissão estimulada (fenômeno laser) em seu artigo “Zur Quantum Theories der Strahlung”, sendo o laser classificado como de “alta potência” (com potencial destrutivo) e em “baixa potência” (sem potencial destrutivo) (VINCK *et al.*, 2003). A sigla *LASER* (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) quer dizer: “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação” (VEÇOSO, 1993). Essa

terapia foi utilizada primeiramente por Mester e colaboradores, que usaram o laser de argônio de 488 e 515nm.

Subsequentemente foi introduzido o hélio-neon (HeNe), laser que emite luz vermelha com comprimento de onda de 632.8nm, substituído por um aparelho de preço mais reduzido, mais potente, o laser de diodo, com comprimento de onda de 660-950nm (LUCAS *et al.*, 2000). Os tratamentos experimentais em pacientes iniciaram-se na década de 1970, após relatos de resultados positivos da irradiação com a terapia a laser de baixa intensidade (TLBI) em culturas de células e em experimentos animais.

A *Low Level Light Therapy* (LLLT) ou terapia de baixa intensidade de luz é uma forma de fototerapia que envolve o uso de *laser* de baixa potência, monocromático e de coerente feixe de luz, com efeitos de fotobioestimulação e não-termiais, utilizado para terapêutica na analgesia e como estimulante do biotrofismo (MESTER *et al.*, 1985).

De acordo com Miserendino (1995) e Zezell (2001), os lasers são compostos, na maioria por: ressonador – tubo ou cavidade óptica com um arranjo de espelhos que amplificam seus efeitos, sendo um espelho de reflexão total e outro parcial; meio ativo – determina o comprimento de onda da luz emitida; mecanismo de excitação ou bombeamento – consiste em uma fonte de energia externa que excita os elétrons do meio ativo. Pode ser uma descarga elétrica, o disparo de um *flash* e até uma ativação por outro laser.

Miserendino (1995) e Zezell (2001) determinaram que a luz emitida possui propriedades únicas que a diferenciam da luz comum, tais como: monocromaticidade – cada onda de luz possui a mesma cor, ou seja, o mesmo comprimento de onda; há uma coerência, onde o feixe se propaga na mesma direção no tempo, no espaço e frequência. A luz é unidirecional, não havendo divergência de seus feixes.

A interação do laser, quando atinge os tecidos biológicos seria: absorção – a luz é absorvida pelos tecidos, como água, hemoglobina, melanina; sofre reflexão, onde parte da luz é refletida e perdida; parte da luz se espalha pelo tecido, perdendo sua

potência, e a luz atravessa toda a espessura do tecido (transmissão) (MISERENDINO, 1995; ZECELL, 2001).

De acordo com a ANSI (*American National Standards Institute*) os *lasers* são classificados tendo em vista sua periculosidade. Essa classificação é baseada na potência de saída e comprimento de onda do laser, sendo quatro classes distintas: Classe 1 – laser sem perigo, cuja potência não é percebida pelos olhos (leitor de CD); Classe 2 – perigosos, se alguém olhar diretamente para eles (leitor de código de barras); Classe 3a – média potência e perigosos, se a luz for focalizada pelos olhos através de lentes ópticas (ponteiras laser) (DAMANTE *et al.*, 2004).

Ainda de acordo com o mesmo Instituto, Damante *et al.* (2004) dizem que os *lasers* da Classe 3b – média potência, são perigosos se forem vistos diretamente e os da classe 4 – alta potência, podem causar dano ocular não apenas por contato direto, mas também quando refletidos. São danosos à pele e inflamáveis. Para que se obtenha a resposta biológica adequada é necessário atingir a dose ótima de radiação, o comprimento de onda correto e aplicações suficientes para produzir o efeito. O comprimento de onda, densidade de energia (dose), densidade de potência (intensidade), tipo de regime de operação do laser e número de sessões devem ser observados antes do tratamento (RIBEIRO, 2001).

A potência do laser é o valor dado pelo fabricante em watts (W). A densidade de potência é a potência de saída de luz por unidade de área medida em watts por centímetro quadrado (W/cm^2). A densidade de energia (dose) é a grandeza que avalia a possibilidade de estímulo ou inibição dos efeitos do laser; é a quantidade de energia por unidade de área transferida ao tecido. Geralmente é expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm^2) (RIBEIRO, 2001; DALLAN e OLIVEIRA, 2000). O conhecimento desses parâmetros é essencial para indicação e utilização adequada terapêutica desse método (NUSSBAUM *et al.*, 1999).

Baseado no entendimento do mecanismo de origem de luz laser, Rocha-Junior *et al.* (2007) observaram que, quando a luz utilizada é de baixa intensidade, não há efeito térmico, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não é transformada em calor, mas em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos.

No início de 1990, a laserterapia foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) como um importante método para o tratamento de cura de lesão (SUGRUE *et al.*, 1990; NUSSBAUM *et al.*, 1999).

A laserterapia, a partir de sua introdução no arsenal fisioterápico, proporcionou e continua proporcionando, inúmeros benefícios associados ou não a outros recursos fisioterapêuticos (BAXTER, 1994).

Segundo Kitchen (2003), o laser de baixa potência apresenta bons resultados em feridas de qualquer natureza. Possui os seguintes efeitos terapêuticos: é anti-inflamatório, analgésico, antiedematoso e cicatrizante. O efeito anti-inflamatório justifica-se por dois fatores: a interferência na síntese de prostaglandinas, cuja redução decresce as alterações proporcionadas pela inflamação, e o estímulo à microcirculação, garantindo um aporte eficiente de elementos nutricionais e defensivos para região lesada, favorecendo sua regeneração.

O efeito analgésico é explicado pela diminuição da inflamação, elevação do limiar doloroso nas terminações nervosas livres e interferência da mensagem elétrica, por meio da manutenção do potencial de membrana. O efeito antiedematoso pode ser justificado pelo estímulo à microcirculação, favorecendo melhores condições de drenagem do plasma e à ação fibrinolítica, proporcionando a resolução efetiva do isolamento causado pela coagulação do plasma (VIEIRA, 2006).

Os *lasers* mais utilizados nos últimos anos, para cicatrização tecidual, são os *lasers* de hélio-neônio, arsênio-gálio e arsênio-gálio-alumínio (BOURGUIGNON FILHO *et al.*, 2005). O laser de hélio-neônio tem sido utilizado com doses de 0,03; 0,3 e 0,9 J/cm²; 0,59 J/cm²; 4, 10 e 20 J/cm² (KANA *et al.*, 1981). Segundo Garavello-Freitas *et al.* em 2003, doses de 0,3 e 0,9 J/cm² são mais eficientes do que doses de 0,03 J/cm². No estudo de Kana *et al.* em 1981, doses de 4 J/cm² mostraram-se mais eficazes do que doses de 10 e 20 J/cm². O laser de arsênio-gálio também tem sido usado com diferentes doses: 0,36 J/cm²; 1 J/cm²; 2 e 4 J/cm² (GARCIA, 2000); 3 J/cm² (GARCIA; KINA e MILANEZI, 1995; GARCIA; OKAMOTO e KINA, 1996); e; 3, 4 e 5 J/cm² (PEREIRA *et al.*, 2002). Melhores resultados foram observados com

aplicação deste laser com doses de 2 J/cm² (TATARUNAS; MATERA e DAGLI, 1998).

Os *lasers* de baixa intensidade, como os de rubi, hélio-neônio (HeNe) arsênio gálio e de arsênio-gálio-alumínio, possuem um efeito fotobiológico que promove aceleração dos eventos do processo de cicatrização tecidual. Atuam em nível celular, através da interação fotoquímica, podendo promover aumento do metabolismo celular e, conseqüentemente, induzir diferentes efeitos, como analgésico, anti-inflamatório e reparador (THEODORO, 2002).

Diversos estudos têm sido realizados para compreender o processo de cicatrização de feridas, objetivando esclarecer os diferentes aspectos do tecido de granulação, da epitelização e da neoformação tecidual, bem como os possíveis efeitos da TLBI no processo de reparo tecidual (ROCHA-JUNIOR *et al.*, 2006).

Com o intuito de definir parâmetros para utilização do *laser*, Moore *et al.* (2005) estudaram os efeitos do comprimento de onda na proliferação de culturas primárias de células endoteliais de ratos e fibroblastos. Observaram um aumento na proliferação de fibroblastos com todos os comprimentos de onda do espectro vermelho, porém mais evidentes com 665 e 675nm. As células endoteliais mostraram proliferação em todos os comprimentos de onda estudados, tendo seu pico com 655 nm. O *laser* infravermelho foi inibitório para os fibroblastos e gerou a menor taxa de proliferação celular para as células endoteliais.

Os comprimentos mais utilizados em terapia são os compreendidos entre as faixas de 632.8nm a 904nm do espectro da luz. A profundidade de penetração varia de 2mm para *laser* na faixa visível de comprimento de onda a 5mm para o *laser* infravermelho (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Como a penetração nos tecidos se processa de forma exponencial, para se conseguir efeitos fisiológicos significativos e efeitos terapêuticos, a potência e dosagem correta são alvos de discussão constante (SCHINDL *et al.*, 2000).

Nascimento *et al.* (2006) elaboraram um estudo com a finalidade de avaliar se a variação na intensidade e comprimento de onda poderia interferir no processo de

reparo em feridas cirúrgicas, e avaliaram dois comprimentos de onda, um de 670nm e outro de 685nm. O modelo experimental utilizou 30 ratos, sendo 18 animais irradiados e divididos em dois subgrupos, com cada grupo subdividido em 3 grupos diferenciando as densidades de potência utilizadas, que foram 2, 15 e 25mW. Doze animais foram utilizados como controle. Após o período experimental de 8 dias, os animais foram sacrificados. Os resultados apresentaram um efeito positivo do laser no processo de cicatrização, com o melhor efeito com o uso do laser de 670nm com 25mw de densidade de potência. Resultados positivos foram encontrados com ambos os comprimentos de onda quando comparados com o grupo controle.

Já o efeito cicatrizante é o que mais se destaca. É caracterizado pelo incremento à produção de ATP e aumento da síntese proteica, tendo como consequência, o incremento da regeneração tecidual em um processo de reparação. O estímulo à microcirculação, aumentando o aporte de elementos nutricionais, associado ao aumento da velocidade mitótica, facilita a multiplicação das células, assim como a neovascularização, o que também contribui para a cicatrização (ROCHA *et al.*, 2003; ROCHA-JÚNIOR *et al.*, 2006; VIEIRA, 2006; MILLIS *et al.*, 2008).

Na cicatrização dos tecidos, as evidências que relacionam o comprimento de onda da radiação com os efeitos biológicos específicos são extensas, envolvendo experimentos teciduais e celulares em laboratório. O *laser* visível de 632.8nm de comprimento parece ser o mais efetivo para a cicatrização de feridas, provavelmente por promover uma maior diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos na área irradiada, acelerando o processo cicatricial (NASCIMENTO *et al.*, 2006), e o de 780nm é o favorito para regeneração, enquanto os de 830nm e 904nm são usados para dores musculares (MESTER *et al.*, 1985).

Diferentes efeitos biológicos foram observados após irradiação com LLLT, entre eles a estimulação da proliferação celular, especialmente em fibroblastos e na síntese do colágeno (ABERGEL; LYONS; CASTEL, 1987), que se destaca como um dos principais efeitos da LLLT (SILVA *et al.*, 1998; TAVARES, MAZZER e PASTORELLO, 2005), sendo caracterizado por três principais fatores. Primeiro, há um incremento da produção de ATP (KARU; PYATIBRAT e KALENDO, 1995), levando a um aumento da atividade mitótica e ao aumento na síntese de proteínas

pela mitocôndria, resultando em maior regeneração tecidual (SILVA *et al.*, 1998; HERRERO, 1988). Em segundo lugar, há um estímulo à microcirculação, que aumenta o fornecimento de elementos nutricionais associados ao aumento da velocidade da mitose, facilitando a multiplicação celular (SILVA *et al.*, 1998; TAVARES; MAZZER e PASTORELLO, 2005). Finalmente, novos vasos são formados a partir de preexistentes (SILVA *et al.*, 1998; TAVARES; MAZZER e PASTORELLO, 2005; BIBIKOVA; BELKIN e ORON, 1994).

Os mecanismos que envolvem o processo de bioestimulação ocorrem em nível molecular (KARU, 1998). A ação da luz no processo cicatricial ocorre devido ao incremento dos fatores humorais de defesa e aumento da reação leucocitária. Além disso, a luz atua sobre os fibroblastos, estimulando a produção de fibras colágenas e elásticas, de forma mais ordenada (CARVALHO *et al.*, 2006). Acredita-se que existam fotorreceptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, que, ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas. Como resultado, há aumento do metabolismo celular, através do aumento da síntese de ATP pelas mitocôndrias (MESTER *et al.*, 1985), além de estimular a secreção do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e da replicação dessas células (ROCHA-JUNIOR *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2004). Pesquisas recentes demonstraram que a aplicação do laser de baixa potência possui a capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos, além de reduzir o edema local, favorecendo a neovascularização na pele (RENDELL *et al.*, 1997; GUPTA *et al.*, 2001).

Supõe-se que a energia laser excita as porfirinas e os citocromos, que são cromóforos intracelulares, promovendo um aumento da atividade celular, aumentando a concentração de adenosina trifosfato (ATP), fosfatase alcalina, liberando cálcio (LUBART *et al.*, 1992). O laser de baixa intensidade pode promover maior velocidade nos processos de cicatrização e reparo, aceleração da neovascularização, maior formação do tecido de granulação, aumento do número de fibroblastos, maior número de fibras colágenas, liberação de histamina pré-formada, redução do pH intracelular e alterações na proliferação e motilidade celular, fagocitose e reposta imune (KITCHEN *et al.*, 1991).

Bourguignon-Filho *et al.* (2005) relataram que um dos primeiros trabalhos para avaliar o efeito do *laser* na cicatrização de feridas de tecido mole foi realizado por Mester *et al.* em 1971. Este utilizou o laser de rubi com comprimento de onda de 694,3 nm e doses de 0,5, 1, 4, 5 e 10 J/cm² para irradiar feridas em dorso de ratos. Observaram que 1 J/cm² proporcionou melhor cicatrização em comparação com outras dosagens.

Verificam-se estudos da aplicação *laser* no processo cicatricial em úlceras, úlceras varicosas, fraturas, tendões, músculos, sendo que há significância estatística em alguns deles, ou seja, há um aumento da cicatrização tecidual promovendo a reconstituição da área lesada por determinado tempo (STADLER *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 1998; VARGAS *et al.*, 1999; WALKER *et al.*, 2000).

Amaral, Parizotto e Salvini (2001) afirmam em seu estudo que a regeneração musculoesquelética, a partir do uso do *laser* de baixa potência, se torna mais eficiente quando este é usado em uma dosagem adequada. No trabalho proposto foram utilizados 15 ratos, separados em 03 grupos diferentes, sendo que foram usadas dosagens diferentes do *laser* HeNe (632,8nm), com 2.6 mW, para cada grupo (2.6; 8.4 e 25 joules).

O *laser* HeNe foi utilizado por Kana *et al.*, em 1981, conforme afirmam Bourguignon-Filho *et al.* (2005), com uma potência de 25 mW e comprimento de onda de 632,8nm, utilizado em feridas no dorso de ratos. As doses utilizadas foram 4, 10 e 20 J/cm² diariamente, durante 17 dias. A melhor cicatrização foi encontrada quando da aplicação de 4 J/cm² e redução da velocidade de cicatrização com doses de 20 J/cm².

Ribeiro *et al.* (2003) em estudos realizados na cicatrização de pele em queimaduras de animais produzidas com N², obtiveram bons resultados com a terapia *laser* de baixa intensidade (HeNe – 632,8nm) com dose de 1,0 J/cm² comparados com os não irradiados. Os autores salientaram que a direção da luz polarizada perpendicularmente à ferida, bem como a dosimetria são de fundamental importância na eficiência da terapia *laser*.

Segundo Mester *et al.* (1985) alguns estudos têm demonstrado a aceleração do processo de cicatrização pelo tratamento com laser HeNe 632.8nm, porém o mecanismo de ação do *laser* ainda não está esclarecido. O comprimento de onda do *laser* HeNe de 632,8 nm é muito utilizado na reparação tecidual. Em baixa intensidade, este *laser* não é cirúrgico, tampouco apresenta potencial destrutivo; apresenta características fotoestimulantes seletivas, atingindo somente as estruturas superficiais, sendo melhor absorvido pelos tecidos vermelhos.

O efeito do *laser* de 650nm foi estudado por Lomeli *et al.* (2003), que utilizaram fibroblastos humanos cultivados. No estudo foi instituída uma irradiação contínua de 650 nm com doses de 0,5, 1, 3, 5 e 7 J/cm², densidade de potência de 30 mW/cm². A proliferação de fibroblastos foi mensurada através do método de incorporação de timina. Os resultados foram obtidos entre 24, 48, 72 e 96 horas após o início e mostraram diferenças de proliferação entre os grupos.

O efeito do laser diodo 830nm também foi testado por Rezende (2001) no processo de cicatrização de tecido cutâneo em ratos. O autor separou 64 animais divididos aleatoriamente em 4 grupos de 16 animais. A comparação biométrica e histológica foi feita nos períodos de 3, 7 e 14 dias após a cirurgia e a aplicação do laser. O autor utilizou o grupo G1 como controle e os grupos G2 e G4, com doses de 3 J/cm², e grupo G3 com 1,3 J/cm². Para o grupo G2 utilizou-se uma intensidade de 428mW/cm² e nos grupos G3 e G4, de 53mW/cm². Através da análise histológica e biométrica, observou-se contração da lesão, neoformação epitelial e tecido conjuntivo com mais fibras colágenas na combinação de valores de intensidade de 53mW/cm² e dose de 1,3 J/cm².

Ferreira (2006) comparou os efeitos do laser de baixa potência 660nm com a densidade de energia de 3 J/cm², entre ratos jovens e idosos durante 7 dias, e observou que houve melhora considerável das condições da cicatriz, bem como da reepitelização da pele, mas ainda considerou que são necessários mais estudos que comprovem a eficácia do laser frente as feridas cutâneas induzidas cirurgicamente.

As ondas de 660, 820 e 870nm estimulam os macrófagos a produzir fatores que levam à liberação de fibroblastos acima dos níveis de controle, enquanto a de

880nm causa inibição. Pelo importante papel dos fibroblastos no processo cicatricial, pesquisas têm sido realizadas para avaliar os efeitos do *laser* de baixa intensidade sobre estas células, principalmente sobre processos de crescimento celular, locomoção e produção de colágeno, que envolvem a cicatrização de feridas (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Ao avaliar o crescimento celular e a síntese de colágeno em cultura de fibroblastos, Pereira *et al.* (2002) concluíram que a densidade de energia de 3 ou 4J/cm² produzem melhores resultados que 5J/cm². Bjordal *et al.* (2003) citam que doses acima de 4J por ponto podem inibir a atividade dos fibroblastos. Estes estudos mostram que doses energéticas muito altas parecem não proporcionar os melhores efeitos de reparo tissular (FUKUDA, 2008).

Ainda sobre os efeitos da dose com fins terapêuticos específicos, Matera *et al.* (1994) relatam que a densidade de energia recomendada em laserterapia para promover aumento no número de fibroblastos, fibras colágenas, incremento vascular e reepitelização deve se situar entre 1 e 5J/cm². Neste trabalho, os autores concluíram que 2J/cm² apresentou melhores resultados que 4J/cm² (FUKUDA, 2008).

Da mesma forma, Pugliese *et al.* (2003) observaram a influência do laser AsGaAl na biomodulação de fibras elásticas e colágeno em feridas cutâneas de ratos, concluindo que 4J/cm² foi superior a 8J/cm² (FUKUDA, 2008).

Contrariando os achados que apontavam para uma provável janela terapêutica do laser com densidade de energia abaixo de 5J/cm², Hopkins *et al.* (2004) avaliaram alterações em feridas experimentais de humanos com laser de 820nm utilizando 8J/cm². Os resultados recentes de um estudo demonstraram que a laserterapia é um método eficaz de modulação da reparação tecidual, portanto, contribuindo para um processo de cura mais rápido e organizado (ROCHA-JUNIOR, 2006).

Estudos realizados por Nussbaum *et al.* (1994) e Lusim *et al.* (1992) foram insuficientes para confirmar os efeitos benéficos da TLBI, porém, segundo Bihari e

Mester (1989), efeitos positivos surgiram, mas falharam devido ao grande número de intervenções e à insatisfatória qualidade da metodologia.

Posten *et al.* (2005) demonstraram diversos aspectos da utilização clínica e experimental do *laser* de baixa intensidade. Entretanto, os benefícios da terapia com *laser* na cicatrização de feridas ainda são controversos, já que metodologicamente, são utilizados diferentes tipos de *laser*, com diferentes comprimentos de onda, potência do *laser* e dosagens, o que pode explicar achados contraditórios. Por outro lado, o tratamento com *laser* tem sido recomendado para feridas indolores e úlceras tróficas, para promover uma cicatrização mais rápida, sendo que a radiação visível de baixa intensidade tem efeito na aceleração ou estimulação da proliferação celular (LOWE; WALKER; O'BYRNE, 1998).

Para alguns autores, a terapia Laser só teria efeitos em tecidos que apresentassem algum déficit, como é o caso dos tecidos lesados (KARU, 1987; SCHINDL *et al.*, 2002 e GAVISH *et al.*, 2004). Baseados nesta afirmação, úlceras ou gangrenas foram irradiadas (SCHINDL *et al.*, 2002), enquanto foram realizadas pesquisas em cultura celular sob déficit nutricional (GAVISH *et al.*, 2004). Enquanto isso, utilizaram-se culturas de fibroblastos humanos de tecidos íntegros e de tecidos feridos foram utilizados (HAWKINS e ABRAHAMSE, 2005). Os autores verificaram que nas células dos tecidos íntegros ocorreu uma menor proliferação celular, quando comparada com as do tecido lesado. Tal constatação deve-se ao fato de que células em déficit ou lesadas precisam de uma maior energia para realizar as suas funções, e principalmente estariam em uma maior atividade para reparar os tecidos lesados, ao contrário das células de tecidos íntegros, que estariam sob condições normais (POZZA *et al.*, 2009).

4.4 DEFINIÇÃO DE PRÓPOLIS

A palavra própolis é derivada do grego *pro-*, em defesa, e *polis-*, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade (PEREIRA *et al.*, 2002).

É uma substância resinosa natural, coletada pelas abelhas para assepsia e proteção da colméia contra insetos e microrganismos, sendo responsável pela impermeabilização, isolamento térmico, que no interior da colméia é em média 30°C, vedação e tratamento antisséptico (GERALDINI *et al.*, 2000).

Para produção de própolis, abelhas da espécie *Apis mellifera* (PARK *et al.*, 1998) usam materiais resultantes de uma variedade de processos botânicos em diferentes partes das plantas. São substâncias ativamente secretadas por plantas bem como exsudatos de feridas nas plantas: materiais lipofílicos nas folhas e gemas, látex, resinas (BANKOVA, 2005b; CAPASSO e CASTALDO, 2002).

Durante a coleta da própolis, as abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 13-glicosidase presente na sua saliva, acarretando a hidrólise dos flavonoides glicosilados em flavonoides agliconas (BONHEVI *et al.*, 1994; GREENWAY *et al.*, 1990).

A cor da própolis depende da sua origem. Ela varia de marrom-escuro a marrom-avermelhado, com um tom esverdeado. Tem um odor típico, que pode variar de amostra para amostra, algumas sendo inodoras. Geralmente, o etanol é o melhor solvente para preparação de própolis. Outros solventes, como o éter etílico, água, metanol e clorofórmio, também podem ser usados para a extração e identificação de compostos própolis. Além disso, a glicerina, propilenoglicol e outras soluções têm sido utilizadas durante a preparação de própolis para a indústria farmacêutica e de cosméticos. É sabido que as abelhas são seletivas quanto à resina retirada de uma fonte específica vegetal, porém os fatores relacionados a essa seleção não são compreendidos (RAMOS e MIRANDA, 2007).

4.5 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS

A constituição química da própolis depende da espécie da abelha, da região geográfica de origem e dos métodos de extração, além do controle de qualidade de cada fabricante (SANTOS, 1999).

Deblock-Bostyn (1982) e Debuysen (1983) identificaram e observaram em diversas amostras da própolis as seguintes substâncias: Vitaminas B1, B2, B6, C, E; elementos minerais tais como: prata, céσιο, mercúrio, lantânio, antimônio, cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício.

Hoje são conhecidas na própolis, diversas substâncias de estruturas químicas distintas pertencentes às seguintes classes: álcoois, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos cafeico e clorogênico), esteróides, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (HU *et al.*, 2005; HAYACIBARA *et al.*, 2005; OZKUL *et al.*, 2004; MATSUDA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2003; MARCUCCI, 1995; SWERTS, 2007).

De todos esses grupos de compostos, certamente o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos flavonoides (LIMA, 2006). A eles, bem como aos ácidos fenólicos, são atribuídas as propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (VOLPI e BERGONZINI, 2006).

Pelo menos 200 compostos foram identificados em diferentes amostras de própolis, com mais de 100 em cada uma (MARCUCCI *et al.*, 2001).

As amostras tropicais de própolis, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significantes nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas (TRUSHEVA *et al.*, 2006). A própolis verde brasileira, produzida em São Paulo e Minas Gerais é constituída principalmente de derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e possui grande quantidade de flavonoides, muitos dos quais não estão presentes em própolis da Europa, América do Norte e Ásia (SIMÕES *et al.*, 2004).

Recentemente a própolis brasileira foi classificada em 12 tipos, segundo o perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-

visível, CCDAE e CLAE, além da avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante (PARK *et al.*, 2000). Os autores verificaram diferenças qualitativas e quantitativas na composição química e atividades biológicas desses tipos de própolis. Os tipos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram os tipos 3 (região sul), 6 (região nordeste) e 12 (região sudeste) (KOO *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2000). Existe também outra classificação essencialmente quantitativa, onde é calculada a concentração de determinados marcadores químicos e a própolis é classificada em 3 tipos principais (MARCUCCI, 2000). A composição química variável da própolis é dependente da biodiversidade de cada região visitada pelas abelhas (PARK *et al.*, 2000; KUJUMGIEV *et al.*, 1999; MARCUCCI, 2000), e entre os compostos ativos da própolis os fenólicos, como os flavonoides, têm sido considerados como substâncias biologicamente ativas (BANKOVA *et al.*, 1995) embora outros compostos também estejam envolvidos, como os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres (BANKOVA *et al.*, 1995; MARCUCCI, 1995; IKENO *et al.*, 1991) e os diterpenos (BANKOVA *et al.*, 1996; BANSKOTA *et al.*, 1998).

As técnicas mais frequentemente utilizadas para a análise e determinação dos constituintes químicos da própolis são a cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG-MS) e a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (BANKOVA, 2005b; SOUSA *et al.*, 2007).

4.6 PROPRIEDADES DA PRÓPOLIS

4.6.1 Biológicas

A própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória (BANKOVA, 2005a; KOSALEC *et al.*, 2005; ALENCAR *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2008).

4.6.2 Antimicrobiana

As atividades antibacteriana e antifúngica da própolis têm sido as propriedades biológicas mais estudadas (SWERTS *et al.*, 2002). São atribuídas principalmente à flavonona pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletil do ácido cafeico, um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição da RNA-polimerase bacteriana (UZEL *et al.*, 2005). Outros componentes como os flavonoides, o ácido cafeico, ácido benzóico, ácido cinâmico, provavelmente agem na membrana ou parede celular do microrganismo, causando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO *et al.*, 2005).

A própolis possui atividade antibacteriana maior contra bactérias Gram-positivas e limitada contra Gram-negativas, pois um estudo realizado com extratos de própolis comercializados no Brasil mostrou atividade antimicrobiana pronunciada contra bactérias Gram-positivas e atividade menos evidente contra Gram-negativos (REZENDE *et al.*, 2006; PACKER e LUZ, 2007). Até o momento, não se tem dados que responda o porquê desta menor atividade dos extratos de própolis contra bactérias Gram-negativas. Estas bactérias possuem uma parede celular quimicamente mais complexa e um teor lipídico maior, o que pode explicar essa maior resistência (VARGAS *et al.*, 2004).

Própolis também tem demonstrado excelentes atividades fungistática e fungicida, em testes *in vitro* contra leveduras identificadas como causadoras de onicomicoses (OLIVEIRA *et al.*, 2006; LONGHINI *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos têm relatado ao longo de vários anos de pesquisa a atividade sinérgica da própolis associada a diversos antibióticos, inclusive contra cepas resistentes à benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina (SHUB *et al.*, 1981). Estes e outros autores concluem que a própolis possui ação sinérgica relevante, podendo se constituir como alternativa terapêutica para a resistência microbiana, porém dependente de sua composição (STEPANOVIC *et al.*, 2003; FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2005; ONLEN *et al.*, 2007).

4.6.3 Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória observada na própolis parece ser devida à presença de flavonoides, especialmente galangina. Este flavonóide apresenta atividade inibitória contra a ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase. Tem sido relatado também que o ácido fenil éster cafeico (CAPE), possui atividade anti-inflamatória por inibir a liberação de ácido aracdônico da membrana celular, suprimindo as atividades das enzimas COX-1 e COX-2 (BORRELLI *et al.*, 2002).

A própolis tem demonstrado ação anti-inflamatória também por inibir a síntese das prostaglandinas, ativar a glândula timo, auxiliando o sistema imune pela promoção da atividade fagocítica e estimulando a imunidade celular (KOSALEC *et al.*, 2005).

Estudos em ratos e coelhos têm mostrado que as soluções hidroalcoólicas de própolis possuem atividade anti-inflamatória após a administração tópica, injetável ou mesmo oral (MARCUCCI, 1995). Os efeitos anti-inflamatórios da própolis dependem essencialmente do modo de administração e a dosagem (MIRZOEVA e CALDER, 1996).

Algumas substâncias anti-inflamatórias encontradas na própolis têm sido isoladas. De acordo com Mirzoeva e Calder (1996), estas substâncias são o ácido cafeico, quercetina, naringenina e éster fenetil do ácido cafeico (CAPE). Estes compostos contribuem para a supressão da síntese de prostaglandinas e leucotrienos pelos macrófagos e têm efeitos inibitórios sobre a atividade da mieloperoxidase, NADPH-oxidase descarboxilase, ornitina e tirosina-proteína-quinase (MIYATAKA *et al.*, 1997). Krol *et al.* (1996) atribuíram à própolis atividade anti-inflamatória para outros compostos, incluindo o ácido salicílico, apigenina, ácido ferúlico e galangina.

A inibição da produção de NO por macrófagos também pode ser responsável pela atividade anti-inflamatória da própolis (NAGAOKA *et al.*, 2003).

4.6.4 Antioxidante

A atividade antioxidante merece especial interesse, pois a própolis poderia ser aplicada topicamente com sucesso para prevenir e tratar a pele danificada (MARQUELE *et al.*, 2006).

Flavonoides são relatados como os mais abundantes e efetivos antioxidantes na própolis. Existe uma correlação entre o alto conteúdo de flavonoides totais e a atividade antirradicais livres em extratos de própolis da Argentina (AHN *et al.*, 2007).

Da Silva *et al.* (2006) sugerem que os flavonoides desempenham importante papel na atividade antioxidante de extratos de própolis brasileira, mas outros fatores poderiam estar envolvidos (CHOI *et al.*, 2006). Embora estudos com extratos etanólicos de própolis sejam mais comuns, é relatado que o extrato aquoso possui uma boa atividade antioxidante, associada ao alto teor de compostos fenólicos (MANI *et al.*, 2006; VICENTINO e MENEZES, 2007).

Sabe-se que os macrófagos estão envolvidos em processos diversos na fisiologia do corpo, tais como fagocitose, liberação de enzimas, produção de radicais livres e inflamação. Scheller *et al.* (1989) sugeriram que a atividade imunoestimulante da própolis pode ser associada com a ativação dos macrófagos e melhoria da capacidade fagocítica de macrófagos. Os resultados do estudo de Orsi *et al.* (2000) corroboraram as conclusões da Scheller, o que indica que os macrófagos produzem grandes quantidades de H₂O₂.

De acordo com Marcucci (1995), a remoção de radicais livres pelos flavonoides de própolis permitiria a regeneração de um órgão ou tecido doente.

4.6.5 Antiviral

Não existem muitos relatos sobre a atividade antiviral da própolis. Marcucci (1995) cita uma ação virucida da própolis nos vírus do herpes simplex (HSV) e da estomatite vesicular (VSV). Em estudo realizado na Ucrânia, foi comparada a eficácia de pomada de própolis canadense com pomadas de aciclovir e placebo (veículo) no tratamento de pacientes com herpes genital tipo 2 recorrente. A preparação de própolis contendo flavonoides apresentou-se mais efetiva que as outras duas na cicatrização das lesões e redução dos sintomas locais (VYNOGRAD *et al.*, 2000).

4.6.6 Cicatrizante

A propriedade cicatrizante da própolis está relacionada com flavonoides e ácidos fenólicos (ARVOUET-GRAND *et al.*, 1994). Em estudo comparado da propriedade cicatrizante de um creme de própolis com um de sulfadiazina de prata, foi demonstrado que os ferimentos tratados com própolis apresentaram menos inflamação e mais rápida cicatrização do que aqueles tratados com sulfadiazina de prata (GREGORY *et al.*, 2002).

Sutta *et al.* (1974) utilizaram solução alcoólica de própolis no tratamento de feridas em animais domésticos, tanto em casos clínicos como experimentais. Esses pesquisadores observaram seu bom efeito epitelizante, considerando-a adequada para o tratamento de feridas após a eliminação da infecção.

Damyanliev *et al.* (1982) aplicaram solução tópica de própolis (20 e 30%) em pacientes com feridas supuradas. Foi observado que a cicatrização ocorria dentro de um período de tempo menor do que as tratadas com pomada de Vishnevsky e 20% de clorato de sódio. A solução exerceu efeito antimicrobiano “in vivo” sobre *Bacterium coli*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*

Histologicamente, os tratamentos com mel e própolis induziram melhor cicatrização pela redução da resposta inflamatória, havendo reepitelização mais rápida com a própolis (RAHAL *et al.*, 2003).

Magro Filho *et al.* (1990) realizaram estudos com 45 ratos para examinar o efeito da própolis em feridas cirúrgicas pós-extrações dentárias e feridas de pele. Foram utilizadas para este experimento solução hidroalcoólica a 10% de própolis e solução hidroalcoólica pura; aplicados nos alvéolos imediatamente após as extrações e sobre as feridas. Foi concluído que a aplicação da solução hidroalcoólica, acelerou a epitelização de feridas de pele, mas não acelerou a cicatrização após extrações dentárias.

De acordo com Silva *et al.* (2000) a própolis tem efeito antisséptico, cicatrizante e anestésico, e devido a estas particularidades vem sendo utilizada amplamente pela população para o tratamento de aftas bucais. Assim, os autores analisaram histologicamente a ação da solução de extrato alcoólico de própolis em feridas da mucosa bucal de ratos, após a indução de lesão, expondo o tecido conjuntivo subjacente. Três grupos diferentes foram utilizados no experimento, sendo que o 1º grupo utilizou álcool 96º GL, o 2º grupo, uma solução alcoólica de própolis a 10% e o 3º grupo, solução alcoólica de própolis a 30%. Foi constatado que o uso da própolis não provoca reação inflamatória. Na concentração de 30%, retardou o reparo tecidual, promovendo alteração na velocidade de cicatrização da ferida. Já com álcool a 96º GL, houve desidratação e ressecamento das células da mucosa bucal, impedindo a cicatrização por segunda intenção.

Miyataka *et al.* (1997) compararam a cicatrização de lesões subcutâneas induzidas em ratos a partir do uso de solução alcoólica de própolis a 10% e de solução alcoólica a 30%, tendo constatado que ambas estimularam a reparação tecidual, ocorrendo uma acentuada neoformação vascular, seguida de rápida regeneração do tecido, embora o resultado das lesões tratadas com solução a 30% fosse mais lento. Verificaram que os extratos etanólicos de própolis entre 60 a 80% inibiram satisfatoriamente o crescimento microbiano, e os extratos etanólicos a 70 e 80% apresentaram grande atividade antioxidante e, ainda, o extrato etanólico a 80% foi o que melhor resultado apresentou sobre a inibição da atividade da enzima

hialuronidase. Alguns autores descreveram que a atividade da hialuronidase está relacionada com o processo inflamatório nos tecidos animais. Dessa forma, a inibição dessa enzima caracteriza uma atividade anti-inflamatória dos extratos de própolis (PARK *et al.*, 1998).

Atualmente, questiona-se a ação da própolis na regeneração e na granulação dos tecidos (BARBOSA *et al.*, 2009). Nesta perspectiva, a própolis é sugerida como produto que favorece a cicatrização, além de sua propriedade antibiótica natural desprovida de efeitos colaterais, o que não acontece com os antibióticos sintéticos, apresentando também baixo custo em relação às coberturas utilizadas atualmente, tornando-se acessível à população (BERNARDO *et al.*, 1990; PERUCHI *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 1986; SFORCIN *et al.*, 2001).

Segundo Barbosa *et al.* (2009), os estudos sobre o uso terapêutico da própolis em feridas ainda são escassos, embora se perceba intensificação da realização destes a partir de 2002. Em relação à atuação terapêutica da própolis na cicatrização das lesões, os estudos mostraram resultados positivos, com ação antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica e de neoangiogênese, embora a consistência metodológica destes estudos não tenha sido alvo de análise da pesquisa.

O uso terapêutico da própolis no tratamento de lesões cutâneas tem resultados promissores, devido a sua eficácia. Entretanto, acredita-se que uma padronização sobre locais de coleta e as formas e solventes utilizados em sua extração possam contribuir positivamente para assegurar melhores resultados (BARBOSA *et al.*, 2009).

Segundo Sehn *et al.* (2009) a pomada de própolis influenciou no processo de cura estimulando a proliferação de queratinócitos em relação ao grupo controle. Foi demonstrado que a propagação da própolis foi dependente da fase de cicatrização.

4.6.7 Imunomodulatória

Sy *et al.* (2006) demonstraram que o tratamento com extrato de própolis atenua as inflamações das vias aéreas em ratos, provavelmente por sua habilidade em modular a produção de citocina. Sendo assim, seria um novo agente no tratamento da asma. Orsolich *et al.* (2004) demonstraram que derivados hidrossolúveis de própolis, ácido cafeico, éster feniletil do ácido cafeico e quercetina poderiam ser extremamente úteis no controle do crescimento tumoral em modelos experimentais.

Nos últimos anos muitos estudos têm demonstrado a atividade da própolis no sistema imunológico (ativando macrófagos, aumentando a atividade lítica contra células tumorais, estimulando anticorpos), como apresentado numa extensa revisão realizada por Sforcin (2000), todavia, citando que os mecanismos envolvidos na quimioprevenção ainda não são completamente conhecidos.

4.6.8 Outras Propriedades

Há relatos de que a própolis baixa a pressão arterial e os níveis de colesterol no sangue (CAPASSO e CASTALDO, 2002). Em muitos países, a própolis e o mel são usados para o tratamento de infecções das vias aéreas (TAVARES *et al.*, 2006).

Como antiprotozoário, a própolis mostrou-se ativa contra *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas* spp. e *Giardia lamblia* (DANTAS *et al.*, 2006). Testes *in vitro* com extratos de própolis foram realizados contra *Trypanosoma cruzi* e mostraram atividade contra as formas epimastigotas desse parasita, sendo uma possível alternativa para o tratamento da Doença de Chagas (PRYTZYK *et al.*, 2003). Giorgio *et al.* (2006) estudaram a atividade da própolis brasileira no tratamento da leishmaniose, observando ser eficaz em culturas de macrófagos infectados. Baseados nesse e em outros estudos requisitaram patente para um método de tratamento para leishmania com própolis brasileira. Outros estudos, realizados com

própolis vermelha, oriunda do nordeste do Brasil, mostraram-na ativa contra leishmania sem ser tóxica para os macrófagos (AYRES *et al.*, 2007).

Própolis também tem sido bastante utilizada em odontologia, estando presente em enxaguatórios bucais e cremes dentais para prevenir cáries, tratar gengivites, estomatites (PIETTA *et al.*, 2002; SWERTS e GROISMAN, 2008), em curativos pré e pós-cirúrgicos, aftas, cândida, herpes labial e higiene oral (GRÉGIO *et al.*, 2005).

A própolis pode ser usada no tratamento de doenças humanas e veterinárias com grande sucesso (TOTH, 1985). Verificou-se ainda, a sua capacidade antisséptica e cicatrizante em vários hospitais, sendo que os resultados foram extremamente positivos (GRÉGIO *et al.*, 2005). Na medicina tem sido usada em diversas áreas como: dermatologia, otorrinolaringologia, ginecologia, gastroenterologia e outras. Tem sido encontradas em várias preparações farmacêuticas e cosméticas tais como: pastilhas, pastas de dente, comprimidos, pós, gomas de mascar, loções, cremes faciais, tinturas, pomadas, soluções (HAY e GREIG, 1990), soluções para bochecho, *spray* bucal e para garganta (GLIENKE e HEHL, 1995), cápsulas, unguento (GOETZ, 1990), desodorantes e *xampus* (CORTANI, 1991).

Os produtos que contêm própolis e que apresentam indicações terapêuticas podem ser registrados como medicamentos específicos, segundo a Resolução-RDC nº 132, de 29 de maio de 2003, D.O.U. de 02/10/2003, sendo classificados como opoterápicos (BRASIL, 2003). A comprovação de segurança e eficácia segue a nota técnica da Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos (CATEF, 2005).

O maior problema com a própolis é que sua composição varia com a flora da região, sendo influenciada pela forma como é coletada e pelos métodos de extração. Há problemas com o controle de qualidade, podendo estar contaminada por fungos e sujeira. Apesar de ser possível uma padronização, ainda não foram realizados testes químicos precisos para este fim. Muitas das afirmações feitas sobre a ação farmacológica da própolis não foram confirmadas ainda, assim como estudos para elucidar a sua composição química, apesar de estar ocorrendo um aumento em seu uso comercial, de forma empírica (MANARA *et al.*, 1999).

A simples comparação cromatográfica entre própolis e sua suposta fonte botânica poderia ser incorporada em rotinas de controle de qualidade deste produto, adicionalmente aos recomendados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), pois uma indicação de sua provável fonte poderia trazer consigo informações sobre os seus aspectos químicos e as suas prováveis atividades biológicas (FUNARI e FERRO, 2006).

Santos (1999) revisou a literatura e relatou que a aplicação da própolis tem sido designada para diversas finalidades na medicina alternativa e homeopatia, porém, seu uso deve ser orientado com prudência, pois sua resina atua como um antibiótico e como tal deve-se ter condutas na sua indicação e administração a fim de se evitar resistência microbiana.

De acordo com Ramos e Miranda (2007), a própolis não é um medicamento para todas as doenças. O desafio no momento é determinar quais tipos de própolis são indicadas para uso médico e qual a dosagem adequada, já que a própolis tem efeitos sobre os seres humanos e animais, uma vez que a qualidade do produto varia muito. Vários pesquisadores têm proposto ensaios biológicos, bem como análises quantitativas de compostos químicos a partir de amostras diferentes de própolis.

Segundo Pereira *et al.* (2002), o interesse global de pesquisas em própolis tem duas justificativas: a primeira, devido a suas características de panacéia (Tabela 1). De certa maneira essas características também atrapalham sua aceitação, já que os médicos e outros profissionais tendem a desconfiar de sua eficácia devido a lhe serem atribuídas dezenas de atividades biológicas simultaneamente. A segunda é devido a seu alto valor agregado, pelo qual um frasco do extrato alcoólico é vendido no Brasil por cerca de 5 a 10 reais, mas chegando a custar 150 dólares em Tóquio (CIZMARIK *et al.*, 1998). Este alto valor agregado em Tóquio pode justificar em parte o interesse dos japoneses na própolis, principalmente a brasileira. Embora produza de 10 a 15% da produção mundial, o Brasil atende a cerca de 80% da demanda japonesa (PEREIRA, 2002).

Segundo Teraki e Shiohara (2001), a própolis contém potentes componentes sensibilizantes, podendo levar à dermatite de contato ou formação de granuloma em seres humanos. Problemas de controle de qualidade foram confirmados em países onde a própolis é comercializada. Respostas de hipersensibilidade induzidas por própolis, especialmente os derivados do ácido cinâmico, têm sido relatadas (RAMOS e MIRANDA, 2007).

O consumo de própolis no mundo é estimado em cerca de 700-800 toneladas / ano (DA SILVA *et al.*, 2006). Faltam estatísticas oficiais sobre o volume de própolis produzido anualmente no Brasil, o que é exportado e o que é consumido pelo mercado interno. O consenso é que o Brasil é o segundo maior produtor mundial, logo atrás da China (LIMA, 2006).

Dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis produzida no Estado é considerada a melhor do mundo no mercado japonês, onde o quilograma do produto saltou de US\$ 5 para US\$ 200 nos últimos anos (PEREIRA *et al.*, 2002). Dois pontos se destacam na preferência japonesa pela própolis brasileira além das propriedades farmacológicas: o primeiro, em relação às suas características organolépticas, e, em segundo, devido ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais (MIZUMO; IINUMA e KATO, 1987).

Tabela 1

Relação de algumas propriedades “biológicas” da própolis em ordem cronológica

Data	País	Propriedade farmacológica estudada na própolis
1957	URSS	Uso como anestésico
1967	Romênia	Uso no tratamento dermatológico, com ação antifúngica
1968	URSS	Uso no tratamento de úlceras (em ratos)
1981	Polônia	Estudo das propriedades bactericidas (gênero <i>Candida</i>)
1976	Alemanha	Antifúngicas (ex.: <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>)
1976	Polônia	Antiprotozoários (ex: <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>)
1977		
1981	URSS	Antibióticos (<i>Staphylococcus aureus</i>)
1983	Iugoslávia	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> de EEP (de células HeLa, carcinoma cervical humano)
1984	Brasil	Antibióticos (<i>Staphylococcus aureus</i>)
1985	Iugoslávia	Inibidor de <i>Bacillus subtilis</i> (IP-5832)
1986	Tchecoslováquia	Inibidor de RNA polimerase de <i>Escherichia coli</i> e <i>Streptomyces aureofaciens</i>
1989	Polônia	Antitumoral (carcinoma de Ehrlich)
1990	Itália	Inibição de vários vírus (ex.: herpes)
1992	Bulgária	Inibição do vírus Influenza A
1993	EUA	Antitumoral (testado em ratos e bovinos)
1995		
1996	Japão	Citotoxicidade da própolis brasileira
1998		
1994	Brasil	Atividade contra <i>Trypanosoma cruzi</i>
1995		
1998	Eslováquia	Antimutagênico
1999	Brasil	Várias contribuições apresentadas no I Simpósio Brasileiro sobre Própolis e Apiterápicos (realizado na Universidade de Franca, 18 a 21 de agosto de 1999)

5 MATERIAI E MÉTODOS

Tipo de estudo: Estudo experimental envolvendo animais de laboratório.

Após ter sido aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFENAS, parecer 02A/2009 (23/3/2009), iniciou-se o experimento conforme a literatura consultada.

Foram utilizados 140 ratos albinos, machos da linhagem WISTAR (*Rattus norvegicus albinus*), com 16 semanas, peso de 350 a 500 g, provenientes do Biotério Central da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS.

Durante o experimento, nos meses de julho a dezembro de 2009, os animais permaneceram em caixas de polietileno medindo 41 cm x 34 cm x 17 cm, com fundo preenchido por maravalha. Durante as etapas experimentais, os animais foram mantidos no Biotério, anexo ao Laboratório de Patologia, em caixas de polietileno, contendo 02 animais por caixa, com condições de temperatura (variando de 24°C a 28°C), iluminação e ventilação adequadas, com fácil acesso à água e alimentação sem restrição.

Tipo de estudo: estudo experimental envolvendo animais de laboratório.

Foram utilizados para este estudo os seguintes materiais: um aparelho de laser de baixa potência, comprimento de onda de 658nm (visível, que tem menor poder de penetração no tecido em relação ao infravermelho, sendo mais adequado ao tratamento de feridas superficiais e abertas, segundo Young *et al.* (1990); Hall *et al.* (1994); Simunovic *et al.* (2000); Amorim (2001); Pugliese (2003), 15 mW de potência (Aferição da potência óptica – Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo), da marca Laser Plus, da empresa KW - Indústria Nacional de Tecnologia Eletrônica (Brasil), regime de emissão: contínuo, modo de aplicação: pontual (com base em alguns estudos, como de IN de BRAEKT, 1991 e CARRILLO, 1990), irradiação no centro da lesão, em única aplicação diária de acordo com Kana *et al.* (1981); Rochkind *et al.* (1989); Hall *et al.* (1994); Yu *et al.* (1997) e Anders *et al.* (2002), ângulo de incidência: 90° com a região a ser tratada, segundo Ribeiro *et al.* (2003), sendo aplicado à distância de 1mm para evitar contato direto com a ferida; densidade de energia utilizada neste trabalho foi de 3J/cm², baseado no estudo de Ferreira (2006), (GARCIA, KINA e MILANEZI, 1995;

GARCIA, OKAMTO e KINA, 1996; PEREIRA *et al.*, 2002); um óculos protetor para os olhos; ratos Wistar; ração padrão *ad libitum*; algodão; gaze; seringas; ketamina® (cloridrato de cetamina)/Rompun® (cloridrato de xilazina) sendo a dosagem de 0,2 ml para cada 100g de peso por animal (50% de ketamina® e 50% de Rompun®); bisturi; solução de paraformaldeído; microscópio digital Nikon Eclipse E 200 com câmera capturadora de imagens; lâminas e lamínulas; micrótomo Olympus América INC CUT 4055; navalhas; entellam, xilol, álcool absoluto, becker; parafina; paquímetro; câmera fotográfica digital; coloração para o material hematoxilina e eosina (HE); microcomputador; *Punch* metálico (0,5 cm de diâmetro); Programa de análise de imagem Image Lab 2000; solução de própolis a 5% e a 10%.

5.1 SOLUÇÃO DE PRÓPOLIS

A própolis bruta foi fornecida pela CONAP (Cooperativa Nacional de Apicultura Belo Horizonte/MG), retirada do mesmo lote e coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* no município de Santa Luzia, Minas Gerais _Brasil. O preparo do extrato etanólico de própolis seguiu o descrito por PARK *et al.* (1998b). A própolis (200g) foi triturada, homogeneizada e transferida para um becker estéril, contendo 1.000 mL de álcool etílico a 80%. Foi realizada a extração a 70° C em banho de água termostaticada por 30 minutos, sob agitação constante. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 8.000x por 10 minutos a 20° C. O sobrenadante foi armazenado em tubos de ensaio (15x160 mm) com tampa de rosca, em refrigerador, formulando um extrato etanólico de própolis a 20%. Todas as soluções à base de própolis foram diluídas a partir dessa amostra e concentração.

5.1.1 Derivatização das amostras de própolis

Diretamente no frasco contendo 1 mg de amostra foram adicionados 100 μ L de Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida _BSTFA ⁷. Após adição do BSTFA, o frasco foi aquecido (devidamente fechado), em um forno de cromatógrafo a 60°C por 30 minutos e seguido de 100°C por mais 5 minutos. Após a derivatização, as amostras foram diluídas com 400 μ l de diclorometano.

5.1.2 Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (CGAR-AT) do extrato etanólico de própolis

As amostras foram analisadas por CGAR-AT utilizando um cromatógrafo HP 5890-II ⁸ acoplado com uma coluna capilar de borosilicato de 20 m x 0,25 mm de diâmetro interno _Duran-50 ⁹, com um filme de fase estacionária de 0,2 μ m (15%-fenil-85%-metilpolisiloxana)¹⁰.

Um injetor tipo coluna a frio _“cold on-column”¹¹ foi montado no cromatógrafo, sendo a temperatura da coluna mantida a 40°C durante a injeção, programada inicialmente a 40°C/min até 250°C, sendo em seguida aquecida a 10°C/min até 390°C, mantendo-se por 20 min nessa temperatura. O detector por ionização de chama e o injetor foram operados a 400°C e à temperatura ambiente, respectivamente. O gás hidrogênio foi utilizado como carreador, na velocidade linear de 50 cm/s e o volume de amostra injetado foi de 0,2 μ l. Os dados foram obtidos e processados através de um integrador HP-3396-II¹².

⁷ Aldrich, St. Louis _EUA.

⁸ Hewlett-Packard, Palo Alto _EUA.

⁹ Vidrolex, São Paulo, SP _Brasil.

¹⁰ PS-086, Petrarch Systems Inc. _EUA.

¹¹ Carlo Erba, Milão _Itália.

¹² Hewlett-Packard, Palo Alto _EUA.

5.1.3 Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura acoplada à espectrometria de massas (CGAR-AT-EM) do extrato etanólico de própolis

As análises por CGAR-AT-EM foram realizadas em um instrumento HP-5972-MSD¹², com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e varredura linear na faixa de 40 a 700 Daltons. As análises foram realizadas nas mesmas condições cromatográficas utilizadas nas análises por CGAR-AT, mas com gás hélio como carreador, na velocidade linear de 38 cm/s.

No processamento dos espectros de massas foram utilizadas as bibliotecas de espectros de massas Wiley138.l e wiley275.l e o programa AMDIS versão 1.6d¹³

5.1.4 Cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (CGAR-AT) e cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura acoplada à espectrometria de massas (CGAT-AT-EM) do extrato etanólico de própolis

Analisou-se o extrato de própolis a 20% por cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura (CGAR-AT) acoplada à espectrometria de massas (CGAR-AT-EM).

Pela CGAR-AT-EM observou-se, em concentração relativa, o percentual dos 62 compostos polares encontrados no extrato de própolis (TABELA 02).

Na avaliação do cromatograma de íons totais do extrato etanólico a 80% da própolis (GRÁFICO 1 e TABELA 02), o composto ácido 3,5-diprenil-4-hidroxi-cinâmico apresentou-se com 17% de concentração relativa, seguido do ácido p-coumárico (9%), ácido 3-prenil-4-hidroxi-cinâmico (7,7%), ácido benzenopropanóico (5,1%), trimetoxi-hidroxi-flavona (3,5%), frutose (3,4%), triidroximetoxi-flavona (3,3%) e benzenopropanóico etil éster e ácido cafeico (1,6% para cada composto). Os demais compostos polares figuram em menores percentuais.

¹³ Varian, Walnut Creek _EUA.

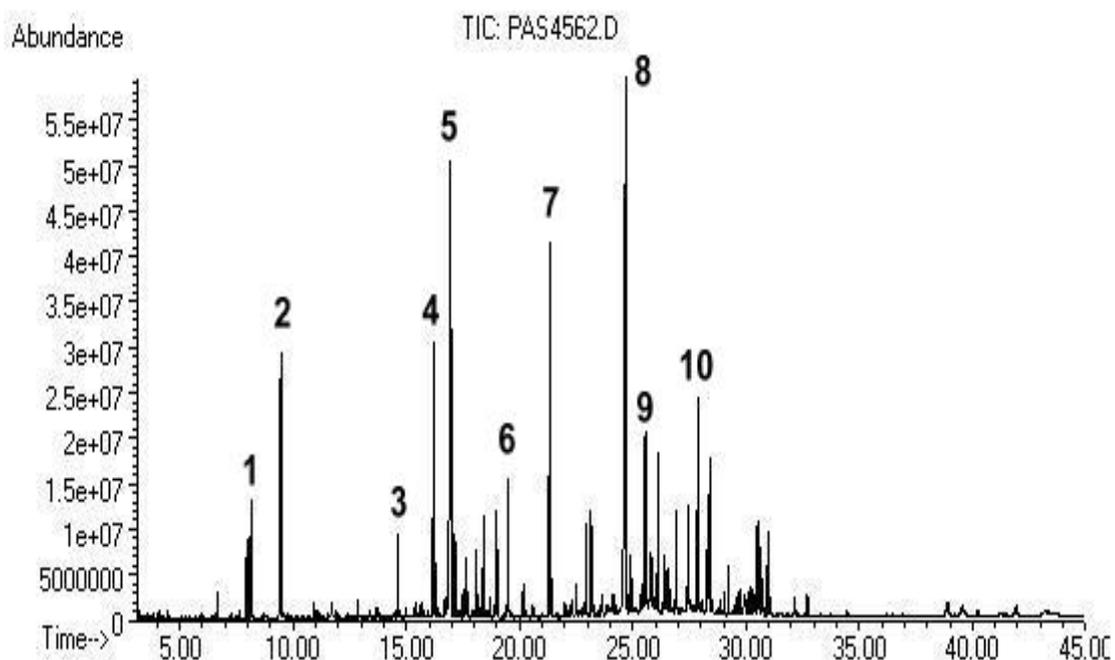


Gráfico 1 - Cromatograma de íons totais do extrato etanólico a 80% da própolis coletada no município de Santa Luzia, Minas Gerais _Brasil.

Tabela 02

Avaliação dos compostos polares do extrato etanólico de própolis por CGAR-AT-EM, esboçados no cromatograma (GRÁFICO 1).

Número Pico no Cromatograma	Tempo de Retenção (min)	Composto	Concentração Relativa (%)
1	8,1	Benzenopropanóico etil Ester	1,6
2	9,5	Ácido benzenopropanóico	5,1
3	14,6	Ácido 4-hidroxi-benzenopropanóico	1,0
4	16,2	Frutose	3,4
5	16,9	Ácido p-coumárico	9,0
6	19,5	Ácido cafeico	1,6
7	21,4	Ácido 3-prenil-4-hidroxi-cinâmico	7,7
8	24,7	Ác. 3,5-diprenil-4-hidroxi-cinâmico	17,0
9	25,6	Trimetoxi-hidroxi-flavona	3,5
10	27,9	Trihidroxi-metoxi-flavona	3,3

Fonte: Instituto de Química – Laboratório de Cromatografia Gasosa – UFRJ, 2007.

O tempo de retenção, observado nos Gráfico 1 e Tabela 2, fornecido pela CGAR-AT-EM, é o tempo que um determinado composto leva para eluir da coluna cromatográfica, ou seja, é o tempo entre a introdução da amostra no cromatógrafo e a saída desse composto. A cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura consiste de uma avaliação preliminar para o ajuste das condições de análise, e com essas condições otimizadas, realiza-se a análise por cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura acoplada à espectrometria de massas.

5.1.5 Preparo da solução de própolis para os grupos experimentais

Da tintura de própolis previamente preparada a 20% retirou-se o volume desejado, o qual foi diluído no veículo controle (água deionizada estéril e álcool etílico a 15%) obtendo-se a concentração final de 5% ou 10%.

5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram formados 7 grupos de 20 ratos aleatoriamente para laser (GL), para a própolis 5% (GP5%), para a própolis 10% (GP10%), para o controle laser (GCL), para o controle própolis (GCP), para o grupo laser associado a própolis 5% (GLP5%), para o grupo laser associado a própolis 10% (GLP10%).

Todos os animais foram pesados antes e ao término do tratamento proposto. Os mesmos permaneceram em jejum por 12 horas antes do procedimento cirúrgico que se deu na sala de cirurgia existente no bloco da Patologia da UNIFENAS, estabelecido o período da manhã para tal prática. Foram utilizados durante o procedimento cirúrgico campos e instrumentais estéreis e luvas para a execução da técnica. Após a anestesia geral intraperitoneal (ip) com uso de ketamina® (cloridrato de cetamina) /Rompun® (cloridrato de xilazina), sendo a dosagem de 0,2 ml para cada 100g de peso por animal (50% de ketamina® e 50% de Rompun®), os ratos foram submetidos à tricotomia por meio de depilação manual no dorso (região entre

as escápulas), mantida uma área delimitada de aproximadamente 5 cm e posteriormente a excisão cirúrgica circular da epiderme, com uso do *punch*, devidamente milimetrado (0,5 cm de diâmetro). Os animais foram tratados com laser, solução de própolis a 5% e 10% e água deionizada logo após o término do procedimento cirúrgico e separados em caixas de polietileno conforme a divisão de grupos estabelecida.

Foram formados 7 grupos de animais,:

Grupo GL: foi aplicado o *laser* de baixa potência, 658nm, 15 mW de potência, com densidade de energia radiante de 3 J/cm^2 , com aplicação do tipo pontual, no centro da excisão, durante 03 (três), 07 (sete) (FERREIRA, 2006), 14 (catorze) e 21 (vinte e um) (LIMA *et al.*, 2004) dias consecutivos;

Grupo GP5%: o grupo foi submetido à aplicação da própolis a 5% durante 03 (três), 07 (sete) (FERREIRA, 2006), 14 (catorze) e 21 (vinte e um) (LIMA *et al.*, 2004) dias consecutivos;

Grupo GP10%: foi aplicada a própolis a 10% durante 03 (três), 07 (sete) (FERREIRA, 2006), 14 (catorze) e 21 (vinte e um) (LIMA *et al.*, 2004) dias consecutivos;

Grupo GCL (Controle Laser): o grupo foi submetido aos mesmos procedimentos, porém com o aparelho de *laser* desligado;

Grupo GCP (Controle Própolis): o grupo foi submetido aos mesmos procedimentos, porém com o uso de solução composta por água deionizada estéril e álcool a 15%;

Grupo GLP5%: foi aplicado o laser de baixa potência, 658nm, seguido da aplicação de própolis a 5% durante 03 (três), 07 (sete), 14 (catorze) e 21 (vinte e um) (LIMA *et al.*, 2004) dias consecutivos;

Grupo GLP10%: foi aplicado o laser de baixa potência, 658nm, seguido da aplicação de própolis a 10% durante 03 (três), 07 (sete), 14 (catorze) e 21 (vinte e um) (LIMA *et al.*, 2004) dias consecutivos.

5.2.1 A eutanasia dos animais e preparação do material

Os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico no 3º, 7º, 14º e 21º dias após a intervenção cirúrgica. A epiderme dorsal foi dissecada e colocada em um cassete e mantida em formaldeído a 10%, com volume dez vezes superior ao volume da peça. O material foi manufaturado no serviço de Patologia da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS em Alfenas, onde foram preparadas as lâminas.

As peças foram desidratadas com álcool etílico de maneira lenta, gradual e crescente, diafanizados em xilol e incluído em parafina.

Após a obtenção do bloco de parafina, o mesmo foi cortado (cortes transversais) em micrótomo (4 micrômetros) e corados por Hematoxilina-Eosina.

As lâminas histológicas foram analisadas por microscopia de luz, procedendo-se a uma análise quantitativa de fibroblastos e vasos sanguíneos.

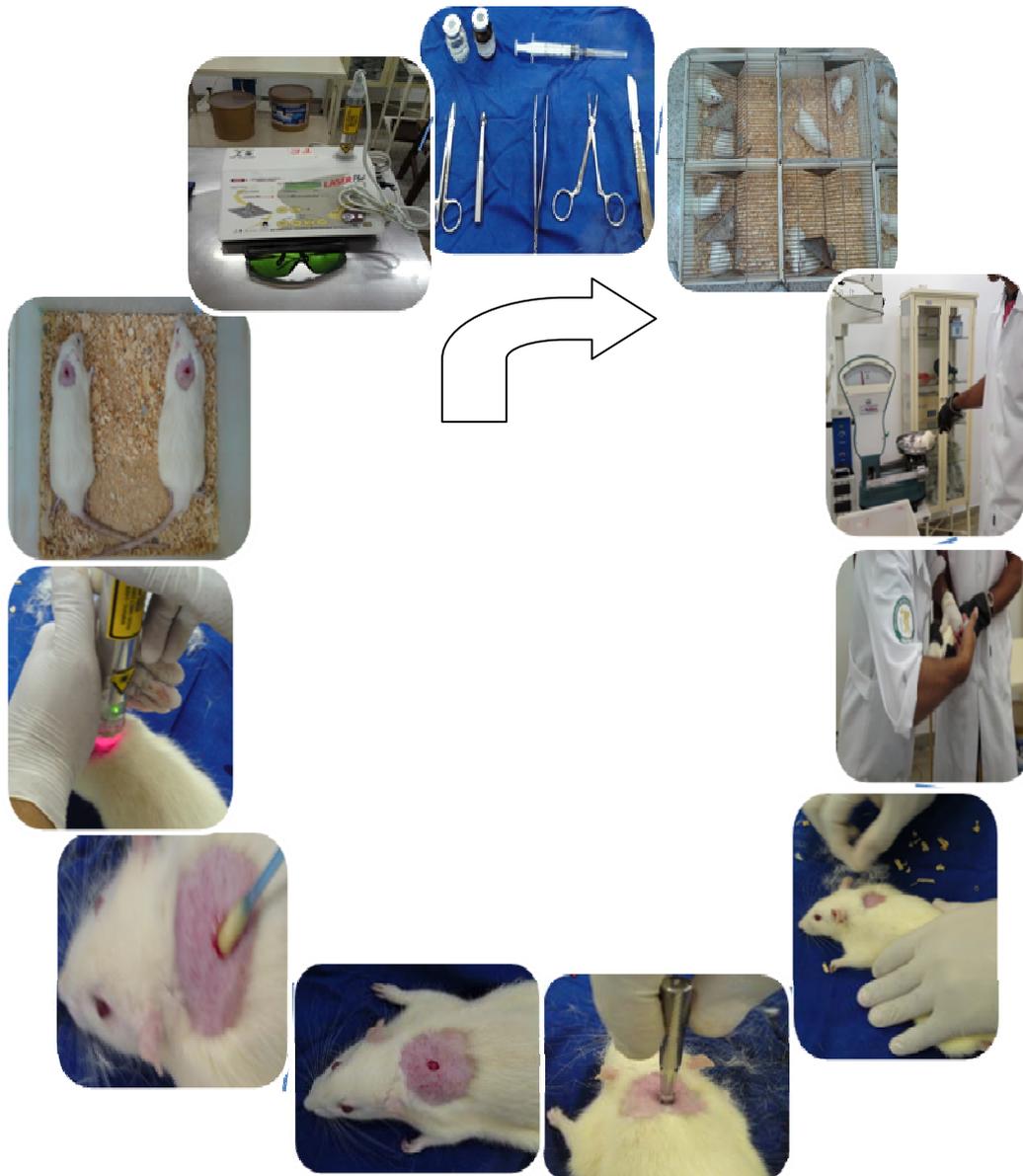
Determinou-se a porcentagem de reepitelização das feridas por meio de um microscópio óptico acoplado a um computador com objetiva de 40X.

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica foi realizada com o auxílio do software Image Lab[®] após a digitalização das imagens obtidas por câmera interligada ao microscópio Nikon Eclipse E 200 (CHIBEBE *et al.*,2006).

O avaliador foi previamente calibrado sem saber do diagnóstico clínico de cada lâmina (estudo do tipo simples cego), que quantificou as estruturas presentes no tecido conjuntivo (fibroblastos) e vasos sanguíneos existentes em área quadrada delimitada em 5.76 cm de altura e 5.76 cm de largura, valor equivalente a 6mm da régua do microscópio. Para a contagem de fibroblastos e vasos sanguíneos foram utilizadas duas áreas com a respectiva medida nos cortes existentes nas lâminas estudadas.

Os fibroblastos foram definidos como as células que mostravam morfologia fusiforme alongada incluindo tanto as células com características ativas (citoplasma abundante e núcleos ovais largos) e inativas (pequenos núcleos e citoplasma escasso).



LEGENDA:

FIGURA 1 – Instrumentais cirúrgicos

FIGURA 2 – Ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*)

FIGURA 3– Pesagem dos ratos

FIGURA 4 – Anestesia dos ratos

FIGURA 5 – Tricotomia dorsal dos ratos

FIGURA 6 – Indução da lesão – punch metálico

FIGURA 7 – Aspecto da lesão induzida

FIGURA 8 – Tratamento da lesão - própolis

FIGURA 9 – Tratamento da lesão – laser de baixa intensidade

FIGURA 10 - Animais pós- procedimento cirúrgico - contenção de animais

FIGURA 11 – Aparelho laser de baixa intensidade

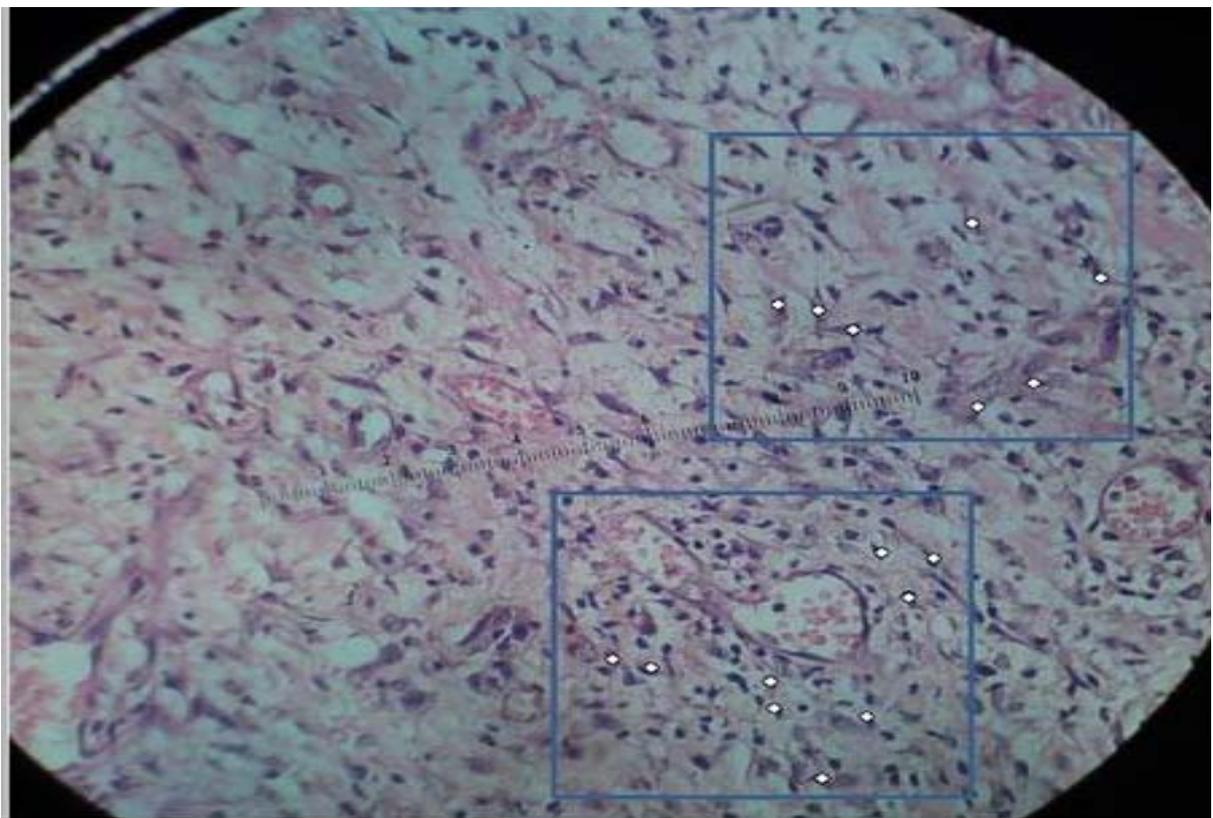


FIGURA 14 - Tela do programa ImageLab 2000 durante o procedimento de captura das imagens para quantificação de fibroblastos e vasos sanguíneos. Em detalhe captura histológica do grupo tratado com própolis a 5% - 3 dias.

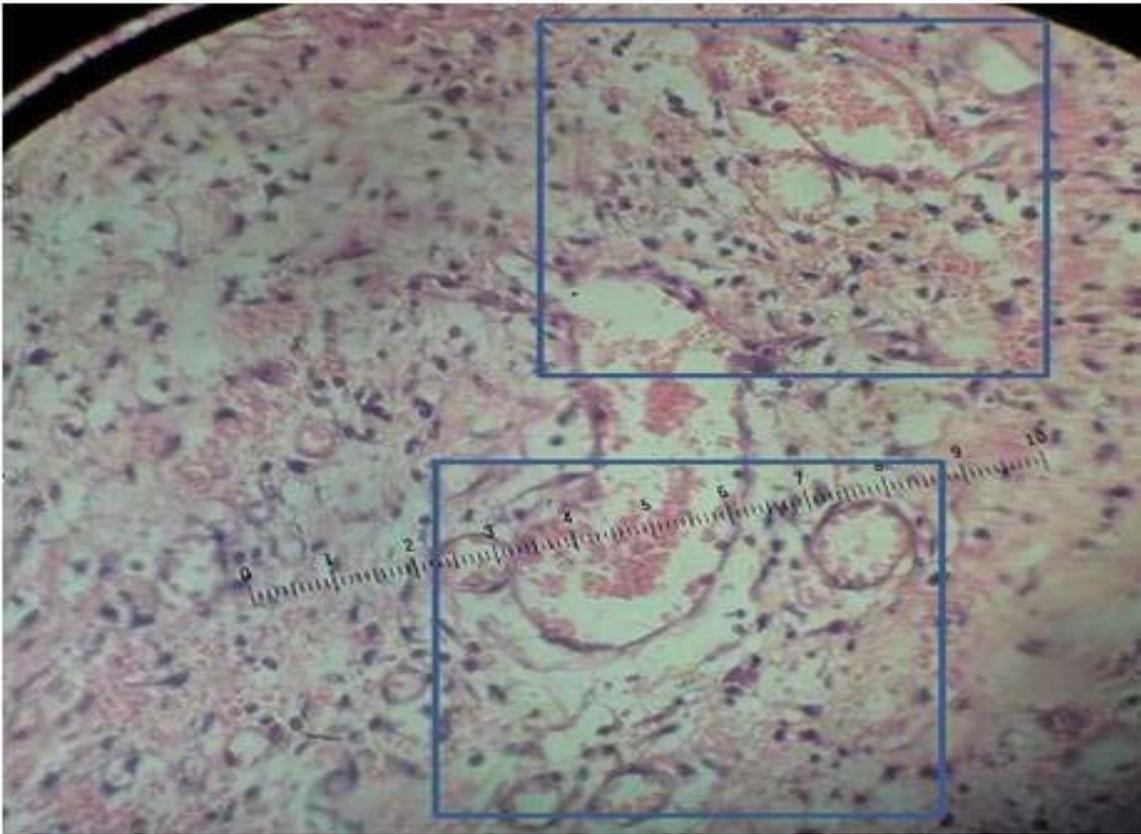


FIGURA 15 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser – 3 dias.

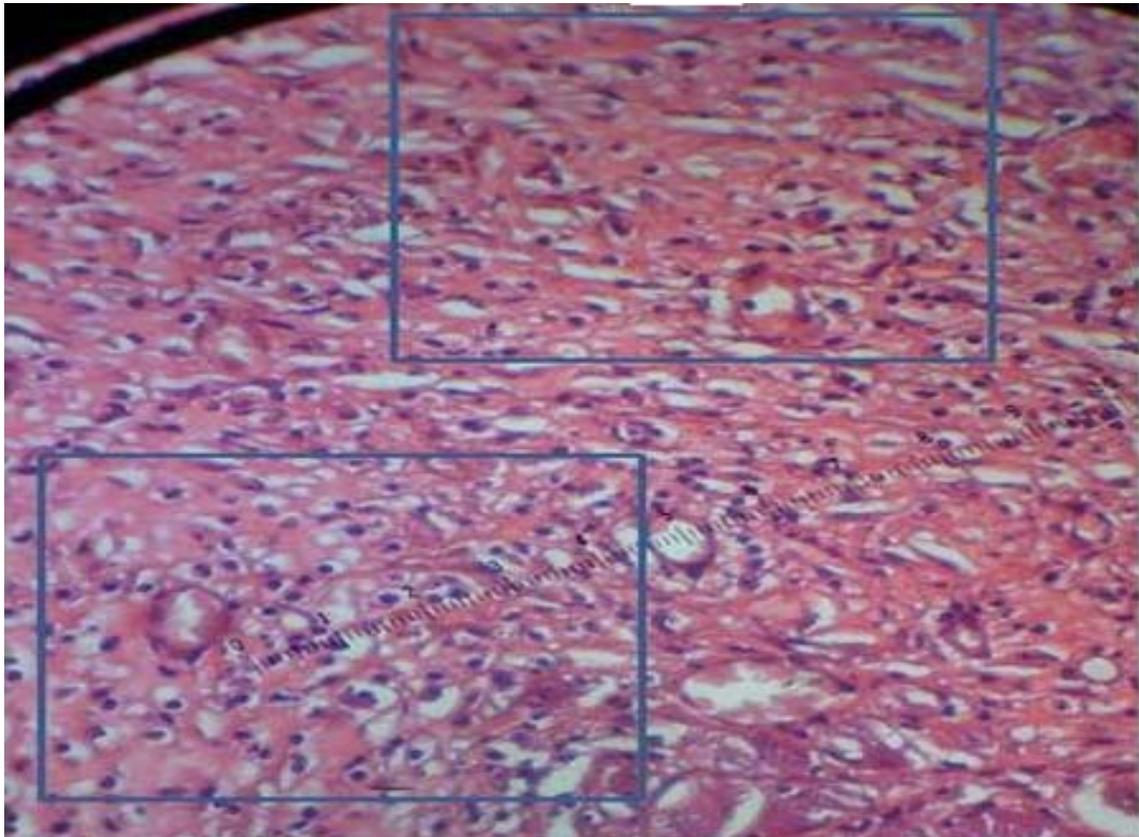


FIGURA 16 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser – 7 dias.

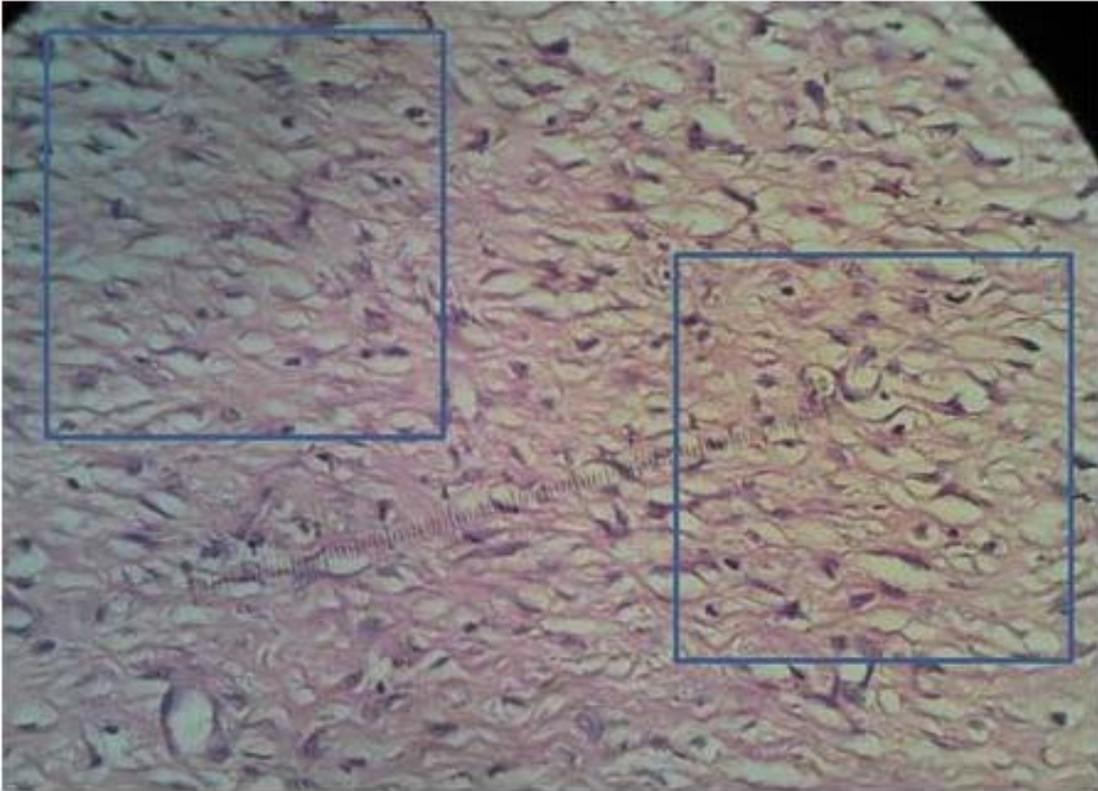


FIGURA 17 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser – 14 dias.

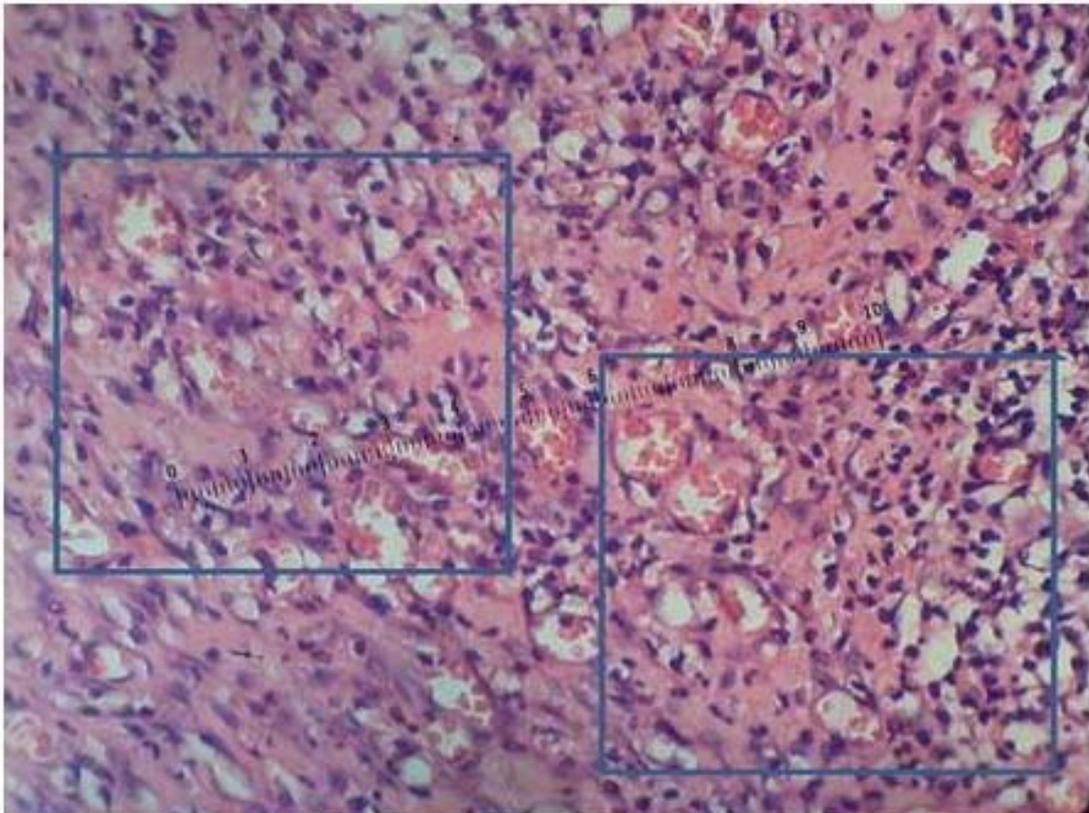


FIGURA 18 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser e própolis a 10% – 3 dias.

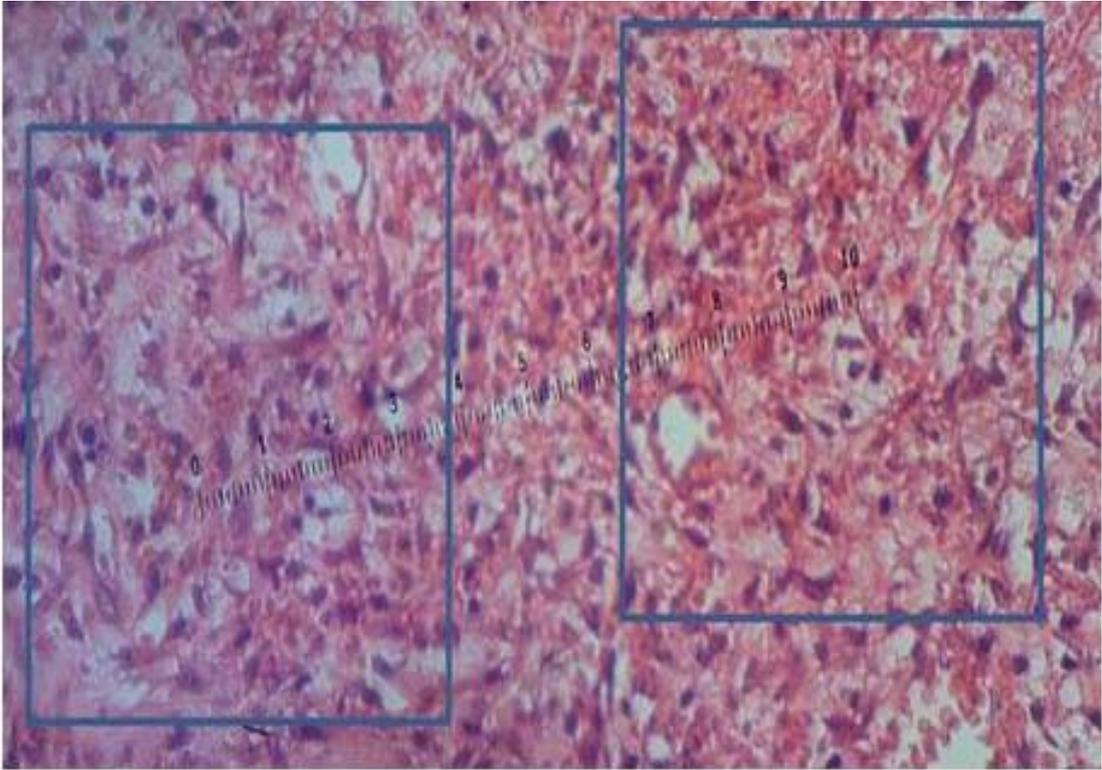


FIGURA 19 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com grupo controle laser – 7 dias.

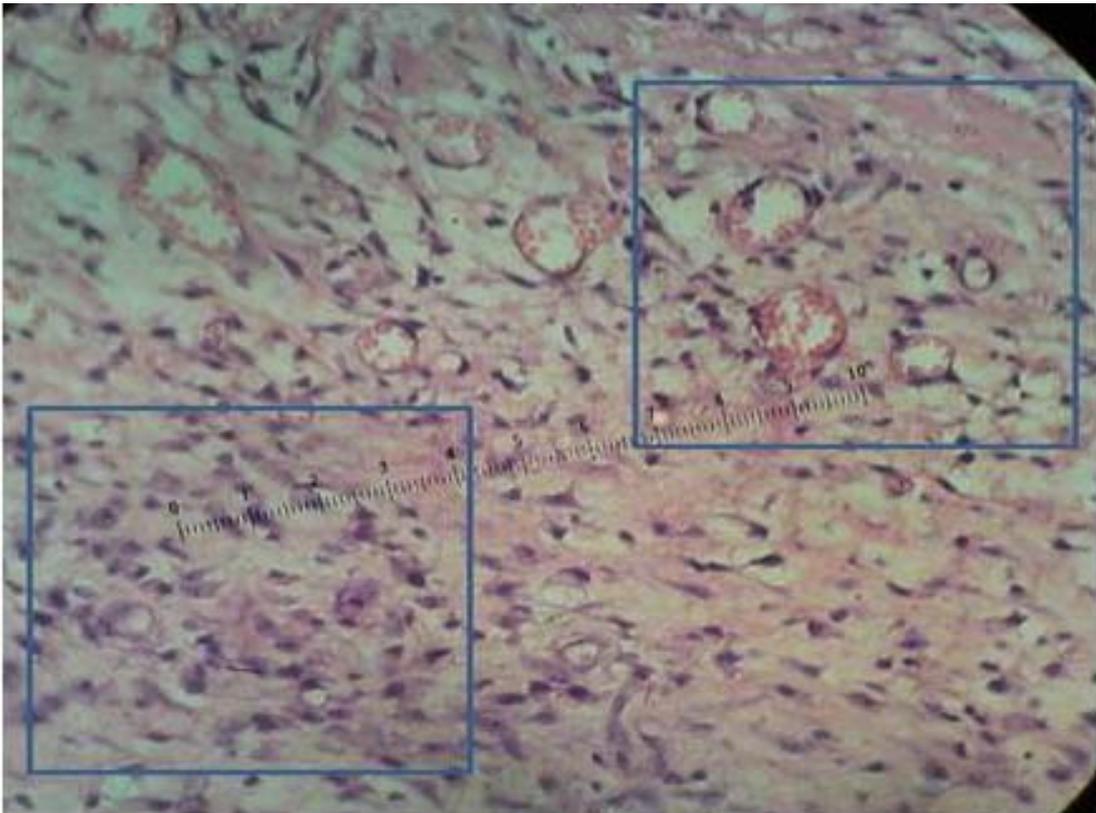


FIGURA 20 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser e própolis a 5% – 3 dias.

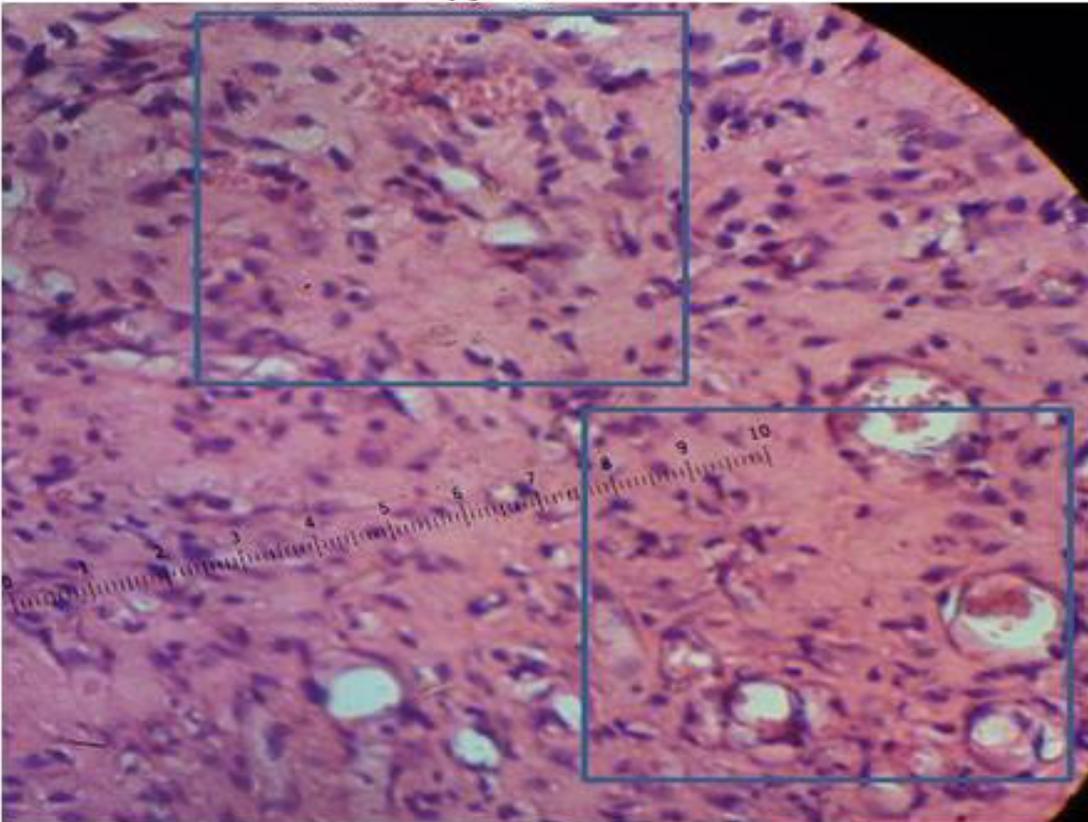


FIGURA 21 - Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com laser e própolis a 5% – 7 dias.

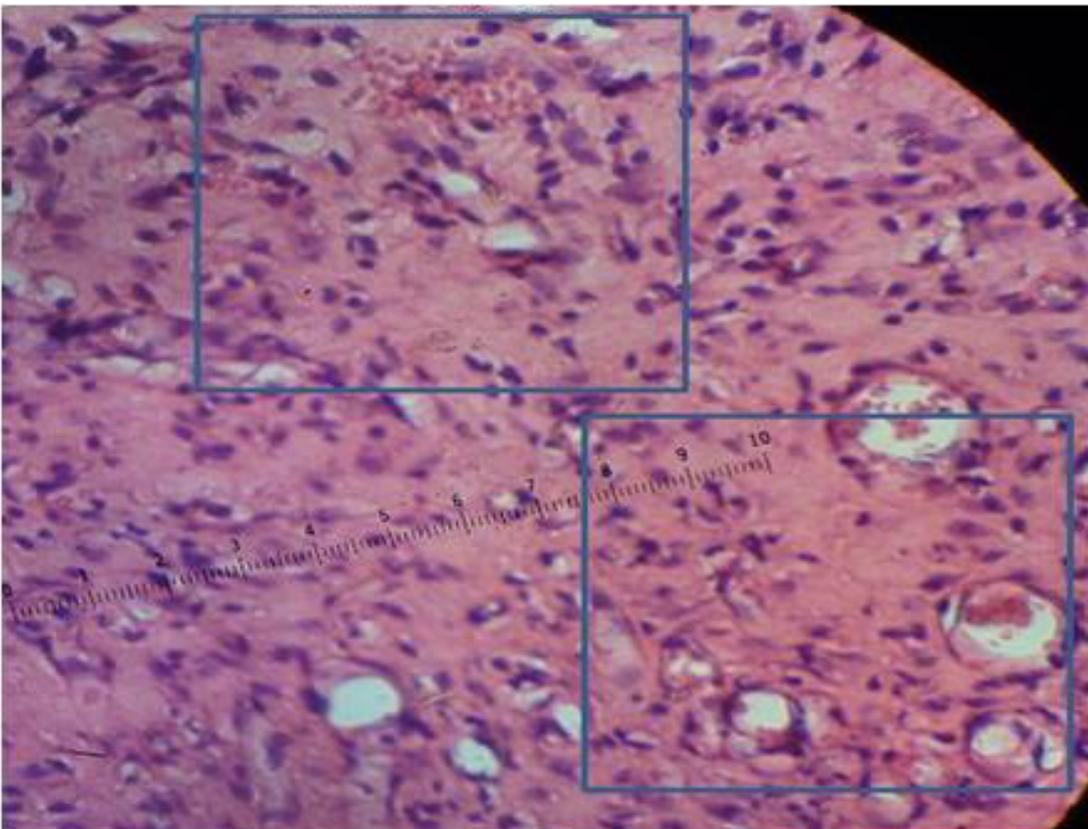


FIGURA 22. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento do grupo controle própolis – 3 dias.

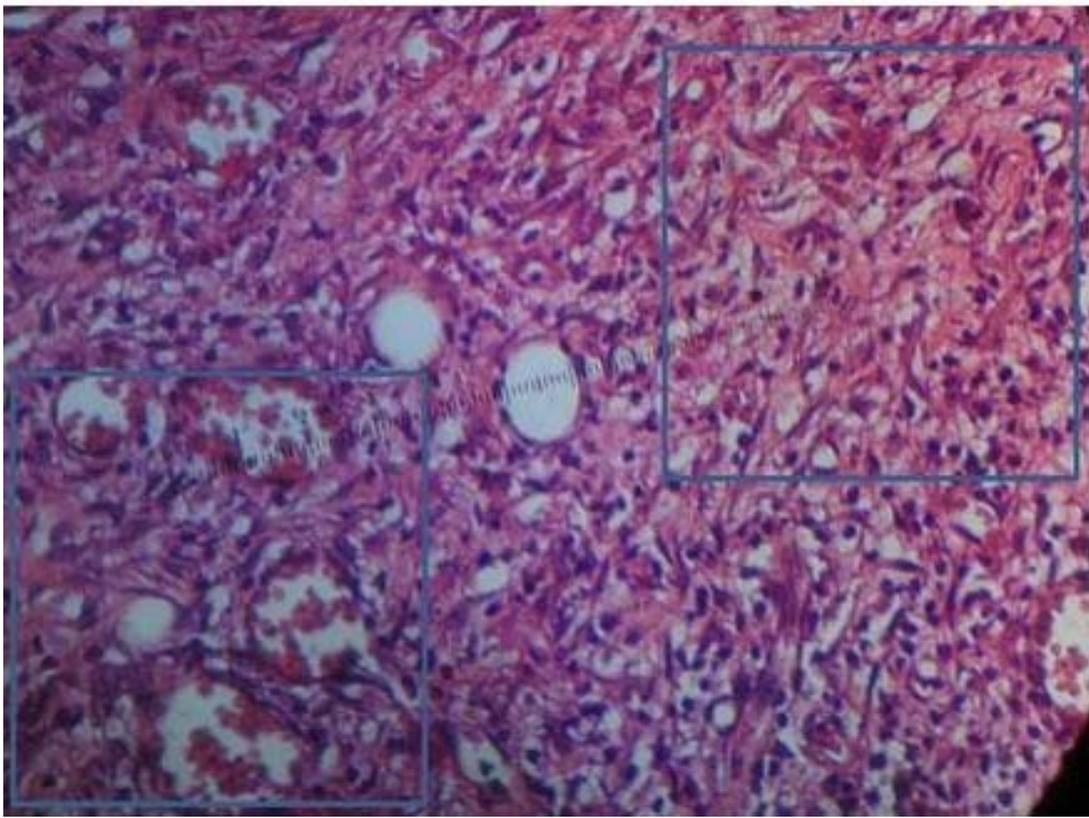


FIGURA 23. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com própolis a 10% – 7 dias.

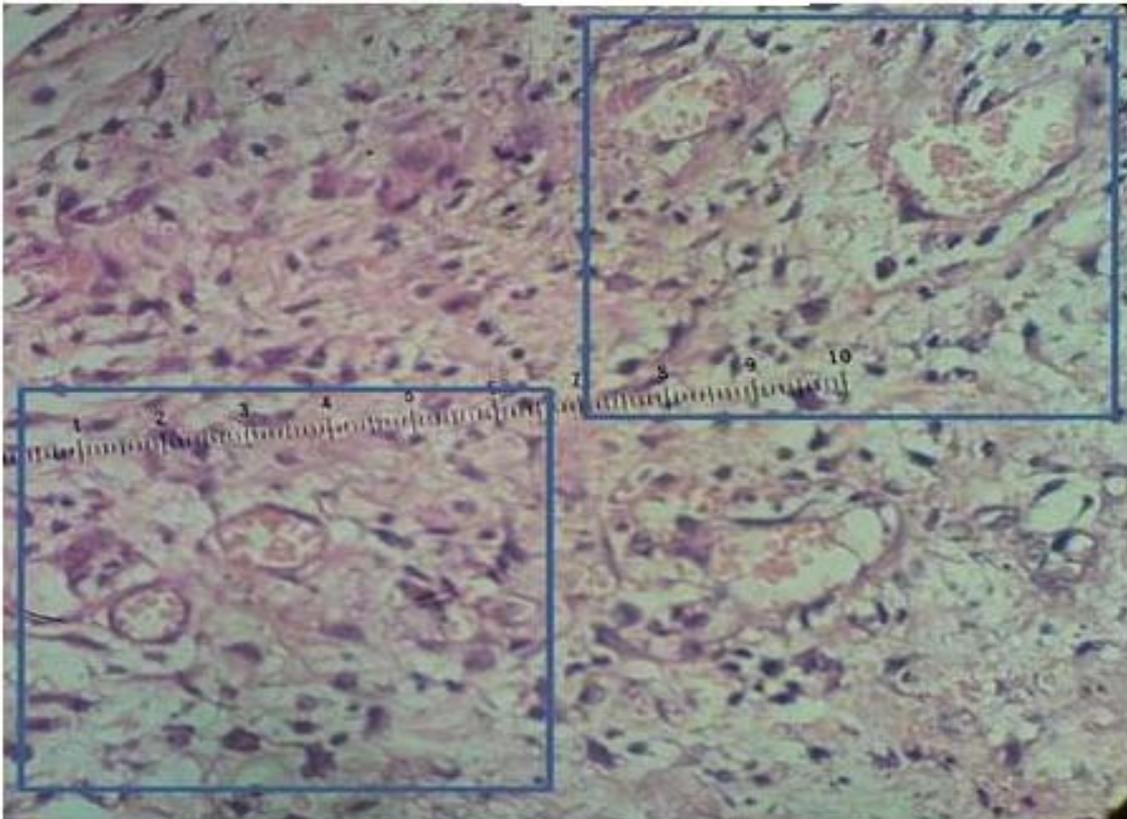


FIGURA 24. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com própolis 5% – 3 dias.

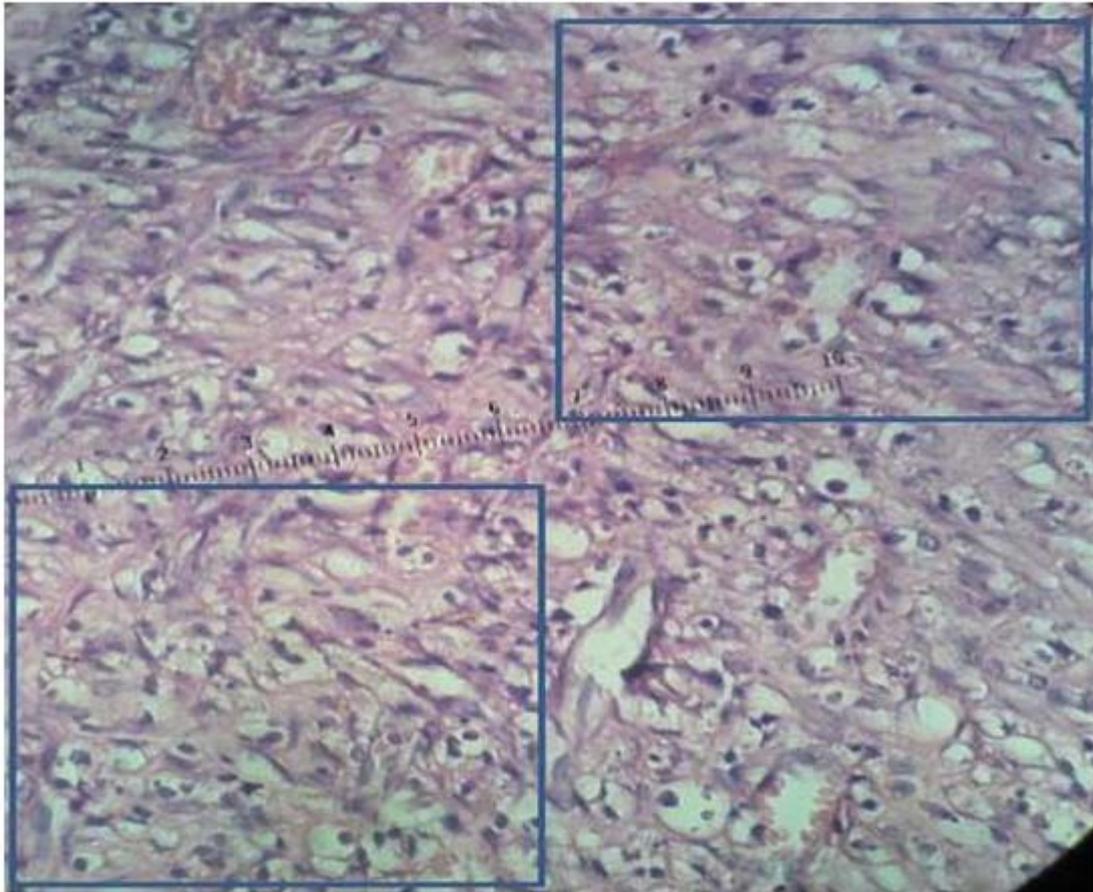


FIGURA 25. Corte histológico da pele (aumento de 40x) submetida ao tratamento com própolis 5% – 7 dias.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação dos grupos, os dados amostrais foram não normais, sugerindo a utilização do teste não paramétrico para dados independentes (Kruskal-Wallis) para efetuar independentemente a comparação entre os sete grupos experimentais, considerando-se o nível de 1% e 5% de significância (BERQUO, 1980 e ZAR, 1984). Processaram-se os resultados e por meio da média e desvio padrão em cada grupo foram aplicados os testes estatísticos, alicerçados pelos programas, GMC 8.1, versão 2002 e SPSS 15.0, versão 2007.

Os resultados foram expressos em gráficos nos quais preferencialmente adotaram-se letras minúsculas para indicar significância ou não significância, nas quais letras iguais indicam não significância e letras diferentes, significância (CAMPOS, 2000).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Ereno (2004), o impacto da cronificação de feridas representa a segunda causa de afastamento do trabalho. Embora o cuidado com as mesmas seja realizado principalmente por enfermeiros, não é uma prática exclusiva desta área profissional. O tratamento de feridas constitui-se em um campo e práxis que é multiprofissional (PEREIRA; BACHION, 2005).

A laserterapia de baixa potência, introduzida no arsenal fisioterápico (BAXTER, 1994) tem sido utilizada na prática clínica há aproximadamente 20 anos, conforme descrito por Kitchen (1991) e Gam (1993), sendo recomendada no tratamento de feridas de qualquer natureza (KITCHEN, 2003) por promover uma cicatrização mais rápida, através da aceleração ou estimulação da proliferação celular (LOWE; WALKER; O'BYRNE, 1998) com a proliferação de fibroblastos, células endoteliais e aumento na deposição de colágeno e queratina (HOPKINS, 2004; NORONHA, 2004; LUCAS, 2003; TATARUNAS, 1998; MATERA, 1994), ou seja, aumenta a cicatrização tecidual promovendo a reconstituição da área lesada por determinado tempo (STADLER *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 1998; VARGAS *et al.*, 1999; WALKER *et al.*, 2000).

Segundo Rocha-Júnior *et al.* (2006; 2007), ainda há muitas dúvidas a esclarecer de como este método atua em nível celular nos processos cicatriciais, os diferentes aspectos do tecido de granulação, da epitelização e da neoformação tecidual, os possíveis efeitos da TLBI no processo de reparo tecidual, o mecanismo de ação e os parâmetros utilizados do laser de baixa intensidade nas diferentes fases do reparo das lesões.

A discussão sobre estudos de terapia com *laser* em baixa intensidade torna-se complexa, pois é difícil comparar trabalhos tão diferentes entre si quanto à metodologia e aos resultados (DAMANTE, MARQUES, MICHELI, 2008). A controvérsia inicia-se a partir de sua denominação na literatura, como pode ser observado na estratégia de busca da revisão sistemática de Chow e Barnsley (2005). Estes autores utilizaram cerca de 19 palavras-chave para conseguir o

levantamento detalhado dos artigos disponíveis sobre o assunto. Entre elas, o termo “terapia com *laser* em baixa intensidade (LILT)” é o mais adequado e o que melhor exprime o tipo de tratamento. A denominação “*laser* de baixa potência”, encontrada em muitos artigos, foi excluída pelo fato de ser possível fazer a fotobiomodulação com *lasers* de alta potência no modo desfocado e afastado dos tecidos, conforme mostrado no estudo de Pourzarandian *et al.* (2005).

Os estudos de Damante *et al.* (2004) mostraram que a clínica e a histomorfometria não foram capazes de detectar efeitos da LILT na cicatrização de gengivoplastias em humanos, se realmente existirem.

O controle da proliferação e secreção, no caso do organismo como um todo, é um processo muito mais dinâmico se comparado a uma cultura de células, porque no organismo há uma hierarquia de estruturas. Já os estudos *in vitro* têm mostrado efeitos positivos do *laser* nos diversos mecanismos envolvidos na cicatrização de feridas. Porém, esses resultados devem ser vistos com cautela (DAMANTE; MARQUES e MICHELI, 2008). Muitas vezes, nos diversos estudos com culturas de células, os passos para o subcultivo, tais como tripsinização, troca do meio, troca dos componentes do soro e variações de temperatura, também podem influenciar na sensibilidade celular à irradiação em baixa intensidade (KARU, 1989).

Apesar de a literatura ser controversa a respeito do assunto, e muitas vezes não demonstrar efeitos positivos do *laser*, as pesquisas básicas *in vitro* destacam-se pelos seus resultados promissores. É com base nesses estudos que será possível esclarecer os mecanismos de ação do *laser* na cicatrização de feridas e determinar protocolos-padrão de aplicação *in vivo* (DAMANTE; MARQUES e MICHELI, 2008).

Outra dificuldade encontrada ao tentar comparar estudos com *laser* em baixa intensidade é a falta de informação sobre todos os parâmetros utilizados (DAMANTE; MARQUES e MICHELI, 2008). Os autores Van Breugel e Bar (1992) comentaram ser a causa dos resultados conflitantes desses estudos o grande número de variáveis utilizadas e sua pobre descrição, já que são utilizados diferentes tipos de *laser*, com diferentes comprimentos de onda, potência do *laser* e dosagens, o que pode explicar achados contraditórios.

O presente estudo utilizou o laser de baixa intensidade, 658nm, por seu comprimento de onda estar compreendido entre as faixas de 632.8nm a 904nm do espectro da luz, sendo muito utilizado em laserterapia (NASCIMENTO *et al.*, 2006), uma densidade de potência de 15mW, pois Azevedo *et al.* (2006) concluíram que quanto menor a densidade de potência, maior o crescimento celular, uma densidade de energia (dose) de 3J/cm² (FERREIRA, 2006; PEREIRA *et al.* 2002; GARCIA; OKAMTO e KINA, 1996; GARCIA; KINA e MILANEZI, 1995) com o intuito de confirmar a afirmativa de Matera *et al.* (1994) de que há aumento no número de fibroblastos e incremento vascular, se a dose se situar entre 1 e 5 J/cm² e os achados de Lima *et al.* (2009) ao demonstrarem que a irradiação de 3J/cm² induz um processo de proliferação celular.

Outra modalidade terapêutica para a cicatrização de feridas cutâneas é o uso da própolis (GERALDINI *et al.*, 2000). De acordo com Barbosa *et al.* (2009), os estudos sobre o uso terapêutico da própolis em feridas ainda são escassos, embora se perceba intensificação da realização destes a partir de 2002, como produto que favorece a cicatrização, além de apresentar também baixo custo em relação às coberturas utilizadas atualmente, tornando-se acessível à população (BERNARDO *et al.*, 1990; PERUCHI *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 1986; SFORCIN *et al.*, 2001).

O uso terapêutico da própolis no tratamento de lesões cutâneas tem resultados promissores, devido a sua eficácia. Acredita-se que uma padronização sobre locais de coleta e as formas e solventes utilizados em sua extração possam contribuir positivamente para assegurar melhores resultados (BARBOSA *et al.*, 2009) .

As amostras tropicais de própolis, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significantes nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

A própolis utilizada neste estudo possui maiores concentrações das seguintes substâncias: ácido p-coumárico (9,0), ácido cinâmico (24,7), flavonoides (6,8), ácido benzenopropanóico (6,1), conforme a descrição detalhada na tabela 02, sendo atribuídas atividades antibacteriana, antifúngica (SWERTS *et al.*, 2002), anti-

inflamatória (BORRELLI *et al.*, 2002), antioxidante (AHN *et al.*, 2007), cicatrizante (GREGORY *et al.*, 2002; ARVOUET-GRAND *et al.*, 1994). A própolis a 5% e 10% foi proposta, segundo alguns estudos (PEREIRA *et al.*, 2006; PERUCHI *et al.*, 2001; DIAZ *et al.*, 1997), para tratar a lesão induzida cirurgicamente em *Rattus norvegicus albinus*. Analisaram-se os grupos tratados com laser de baixa intensidade, própolis a 5% e 10%, associação de ambos e controles, nos períodos de 3 (PEREIRA *et al.*, 2010; PUGLIESE *et al.*, 2003; LOMELI *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2006), 7 (FERREIRA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2007; LIMA, 2009), 14 (TASSINARI, 2005; CARVALHO *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007; LIMA, 2009) e 21 dias da reparação tecidual, a fim de contar fibroblastos, considerados como principais células envolvidas na cicatrização (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) e vasos sanguíneos, observáveis na neoangiogênese durante a resposta inflamatória (CANDIDO, 2001).

Dentre as diversas formas de feridas, como perfurações, escoriações, queimaduras, este trabalho propôs experimentar a terapia de aplicação de laser de baixa intensidade e própolis a 5% e 10% em feridas de segunda intenção induzidas cirurgicamente. A metodologia aplicada no trabalho baseou-se na prática experimental com animais. Embora a morfologia da pele do rato não imite em um nível perfeito a anatomia humana, este modelo é amplamente utilizado por outros autores (PEREIRA *et al.* 2006; FERREIRA, 2006; TAVARES *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2003; NASCIMENTO, 2001; SCHLAGER *et al.*, 2000).

Ao comparar os efeitos do laser de baixa potência sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo em ratos durante os períodos, concluiu-se que os tratados por 3 dias diferiram estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (Tabela 03) quando comparados a 7, 14 e 21 dias, onde apresentaram diminuição do número de fibroblastos.

Tabela 03

Efeito do laser sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra Máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	49,00	53,00	57,00	52,98	1,65 a
7 dias	59,00	61,00	65,00	61,15	1,37 b
14 dias	58,00	60,00	65,00	60,86	1,76 b
21 dias	56,00	59,00	63,00	59,13	1,73 b

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

De forma interessante, Honmura *et al.* (1992) afirmaram que o laser AsGa inibe a quimiotaxia no momento inicial da lesão, e Barbosa (2008), ao utilizar o laser GaAlInP, observou, do terceiro ao sétimo dia, uma tendência de queda desses elementos celulares, declínio este característico da gênese do fenômeno inflamatório e observado em ambos os grupos sem diferença estatística entre os animais tratados e não tratados. De certa maneira, o presente trabalho também compartilha de alguns resultados citados por Barbosa *et al.* (2008) e observados na tabela 03.

No estudo de Pereira *et al.* em 2002, somente doses de 3 e 4 J/cm² obtiveram efeito no crescimento celular em cultura de fibroblastos. O laser de arsênio-gálio-alumínio, utilizado com doses de 1 J/cm², resultou em aumento da atividade celular, em estudos *in vitro* (VINCK *et al.*, 2003) e em estudos *in vivo* (NICOLAU, 2003).

Pugliese *et al.* (2003) estudaram os efeitos da radiação por *laser* nas primeiras 72 horas em relação às fibras elásticas e colágeno em ratos, e observaram que os animais irradiados tiveram uma redução no edema e no infiltrado inflamatório. Concluíram que a terapia por *laser* de baixa potência contribui para o aumento na quantidade de colágeno e fibras elásticas na fase inicial do processo de cicatrização.

De acordo com Lima (2004), na análise comparativa entre os tempos pós-operatórios, das feridas do grupo IV (queimadura + droga + laser), analisadas em

seu estudo, demonstraram processo de reparo muito mais diferenciado e evoluído que os demais grupos e em todos os períodos experimentais, principalmente nos períodos iniciais de 3 e 7 dias, o que corrobora os trabalhos que atestam a maior efetividade do laser em baixa intensidade sobre os eventos da reparação tecidual ser maior na fase proliferativa da resposta inflamatória cicatricial (GARCIA *et al.*, 1995).

Ricevuti *et al.*(1989) em estudo *in vitro* utilizando o laser HeNe afirmaram que a terapia laser é capaz de mobilizar mais rapidamente os fagócitos polimorfonucleares nas três primeiras horas e que, a partir de 72 horas, sua migração seria inibida.

Lima *et al.* (2009) avaliaram a irradiação do laser de baixa intensidade, com comprimento de onda de 660nm, meio ativo fosfato de índio-gálio-alumínio, nas dosimetrias de 3 J/cm² e 21 J/cm² sobre diferentes culturas de fibroblastos; uma linhagem celular imortalizada (3t3), na qual os resultados demonstraram que a irradiação de 3 J/cm² induz um processo de proliferação celular, em conformidade com a densidade de energia (dose) utilizada neste trabalho.

Os resultados do trabalho de Busnardo e Simões (2010) confirmam que o laser de baixa intensidade com densidade energética de 4 J/cm² promove aumento da deposição de colágeno tipo III no 3º dia pós-operatório.

Pereira *et al.* (2010) observaram diferenças nas respostas inflamatórias, com números elevados de células polimorfonucleares nas primeiras horas, seguido pela diminuição dos níveis no 3º dia pós-tratamento, após o uso da terapia laser (670 nm, 9 mW, 4 J/cm², 124 s) em animais . Em outro trabalho, Garcia *et al.* (1996) relataram um aumento de fibroblastos nos grupos irradiados no sétimo dia pós-cirúrgico utilizando dose de 3J/cm², resultados condizentes com o descrito na tabela 03.

Ferreira (2006), comparando os efeitos do laser de baixa potência 660nm com a densidade de energia de 3 J/cm², entre ratos jovens e idosos durante 7 dias, observou que houve melhora considerável das condições da cicatriz, bem como da reepitelização da pele, mas ainda considerou que são necessários mais estudos que comprovem a eficácia do laser frente às feridas cutâneas induzidas cirurgicamente.

Carvalho *et al.* (2003) realizaram uma análise morfológica do percentual das fibras colágenas, por densidade de cor, nas cicatrizes de 48 ratos. Utilizaram o laser HeNe com dosagem de 4 J/cm² por 36 segundos no grupo experimento. Avaliaram os resultados no 3º, 7º e 14º dia do pós-operatório e também constataram aumento significativo no percentual de colágeno do 3º ao 7º dia. Quando comparado o 14º com o 7º dia, observaram uma desaceleração no percentual de colágeno. Os autores atribuem essa desaceleração ao estado de maturação dessas feridas, uma vez que há relatos de que, na fase de remodelagem/ maturação, a proliferação celular diminui, assim como o número e o tamanho dos fibroblastos.

Ao avaliar o crescimento celular e a síntese de colágeno em cultura de fibroblastos, Pereira *et al.* (2002) concluíram que a densidade de energia de 3 ou 4J/cm² produzem melhores resultados que 5J/cm². Analisando os dados, percebe-se que a energia final obtida no estudo foi de 2,9J; 3,9J e 4,8J, respectivamente. Bjordal *et al.* (2003) citam que doses acima de 4J por ponto podem inibir a atividade dos fibroblastos. Estes estudos mostram que doses energéticas muito altas parecem não proporcionar os melhores efeitos de reparo tissular (FUKUDA, 2008).

Ainda sobre os efeitos da dose com fins terapêuticos específicos, Matera *et al.* (1994) relatam que a densidade de energia recomendada em laserterapia para promover aumento no número de fibroblastos, fibras colágenas, incremento vascular e reepitelização deve se situar entre 1 e 5J/cm². Neste trabalho, os autores concluíram que 2J/cm² apresentou melhores resultados que 4J/cm² (FUKUDA, 2008).

Simunovic *et al.* (2000) realizaram um estudo com diversos comprimentos de onda, no processo de cicatrização. Um dos aspectos analisados em seu estudo foi a formação do colágeno. As fluências utilizadas na pesquisa foram de 4 J/cm² para o laser de 632,8nm, 20 J/cm² para o laser de 904nm e 24 J/cm² utilizando ambos os comprimentos de onda. Em relação ao colágeno, melhores resultados foram encontrados utilizando 4 J/cm², sendo que com dose mais elevadas apresentaram menor efeito ou inibição no processo de reparação.

Nascimento *et al.* (2006), ao compararem a quantidade de fibroblastos entre as áreas irradiadas e controle, verificaram uma diferença estatisticamente significativa, demonstrando que o processo de cicatrização foi acelerado na área irradiada pelo *laser* 632.8nm, resultados que corroboram o observado por Kana *et al.* (1981) e Bisht, Gupta e Misra (1994) e também neste trabalho ao comparar os resultados das tabelas 03 e 06.

Hawkins e Abrahamse (2006) aplicaram doses de 0,5; 2,5; 5;10 e 16 J/cm², dois dias consecutivos, a fibroblastos da pele humana. Mostraram que a de 5 J/cm² estimulou a atividade mitocondrial, a proliferação celular e a migração dos fibroblastos. Entretanto, doses mais altas diminuíram a viabilidade das células e a proliferação com dano para a membrana celular e para o DNA.

Azevedo *et al.* (2006) realizaram um estudo para avaliar o efeito de diferentes densidades de potência (mW/cm²) na biomodulação de fibroblastos gengivais humanos. O *laser* utilizado foi um diodo GaAlAs, com 2 J/cm² de densidade de energia. O grupo de 10 mW apresentou maior crescimento celular durante todo o experimento, levando à conclusão de que quanto menor a densidade de potência, maior o crescimento celular.

A maioria dos trabalhos sobre a aplicação de *laser* para cicatrização de feridas cutâneas mostra efeitos positivos observados por meio da proliferação de fibroblastos, células endoteliais e aumento na deposição de colágeno e queratina (MATERA, 1994; LUCAS, 2003; HOPKINS, 2004; TATARUNAS, 1998; NORONHA, 2004), mas alguns trabalhos como o de Hallman *et al.* (1988), ao realizarem estudo *in vitro* com fibroblastos humanos irradiados com *laser* HeNe 632.8nm nas diferentes fases de maturação, não observaram nenhum efeito significativo da radiação *laser* sobre a proliferação celular, seja estimulante seja inibitório. Colver e Priestley (1989), ao utilizarem o *laser* HeNe, também observaram resultados negativos quando analisaram os efeitos proliferativos, a síntese de colágeno e a síntese de glicosaminoglicanas em fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Estes dados poderiam sugerir que o *laser* não estaria interferindo na fase proliferativa da cicatrização. Já Schlager *et al.* (2000), ao utilizarem dois comprimentos de onda em seu estudo, um de 690nm e outro 635nm, para ambos os grupos, uma densidade de

energia de 1,5 J/cm², em um modelo experimental utilizando 30 ratos, divididos em 3 grupos, sendo 2 grupos irradiados e um grupo controle, cujos parâmetros analisados foram vermelhidão, diâmetro e edema. O resultado encontrado foi que não houve diferença entre os grupos tratados comparados com o controle. Estes resultados divergem dos resultados encontrados ao comparar os grupos tratados com o controle.

O tratamento da lesão epitelial com própolis 5% por 7 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (TABELA 04), quando comparado a 3, 14 e 21 dias sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, aumentando a contagem de fibroblastos.

Tabela 04

Efeito da própolis a 5% sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados.

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	47,00	50,00	55,00	50,02	1,60 a
7 dias	62,00	65,00	72,00	65,04	1,91 b
14 dias	40,00	49,00	53,00	48,67	2,11 a
21 dias	45,00	49,00	57,00	49,56	2,43 a

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Resultado semelhante foi encontrado por Simões *et al.* (2008) e Sanchez Neto *et al.* (1993), que afirmaram que os fibroblastos atingem seu maior número no 7º dia, ocorrendo um decréscimo a partir de então.

Segundo Brudzynski e Carlone (2004), componentes presentes na própolis, como ésteres de ácido cafeico, são capazes de estimular a proliferação de queratinócitos epidérmicos, em sete dias. A tendência a maior reepitelização foi verificada no grupo tratado com própolis vermelha. Substância química, mesmo em concentração reduzida, foi detectada na própolis do presente estudo (TABELA 02).

Segundo Ferreira *et al.* (2007), a deposição de colágeno foi avaliada após 4 e 7 dias, quando a área ocupada pelas fibras verdes (tipo III) foi maior nas feridas tratadas com pomada de própolis ($p < 0,05$). Por outro lado, as fibras vermelhas e amarelas, que correspondem às fibras mais maduras (tipo I) ocuparam uma menor área nas feridas tratadas com a pomada de própolis ($p < 0,05$).

Pereira *et al.* (2006) utilizaram 18 ratos, divididos em três grupos experimentais: grupo controle, grupo própolis 5% e grupo própolis 10%, contendo 6 ratos por grupo. A análise microscópica mostrou para todos os grupos, aos 3 dias, uma ferida recoberta por pseudomembrana com tecido de granulação subjacente com rico infiltrado inflamatório MN e moderada vascularização. Aos 8 dias notou-se epitelização das feridas em todos os grupos, notando-se discreto infiltrado inflamatório nos grupos própolis a 5% e a 10%, e entre estes dois grupos pode-se notar uma menor extensão de tecido de granulação no grupo própolis a 10%, indicando-se que este grupo apresentou os melhores resultados em relação aos fenômenos relacionados com o processo de cura.

Diaz *et al.* (1997) realizaram um estudo sobre a aplicação de própolis a 5% na cura de feridas sépticas faciais em humanos e relataram que 90% dos pacientes apresentaram uma melhora total aos 7 dias de tratamento e somente 1 paciente necessitou de 13 dias para a cura total da ferida.

O tratamento da lesão epitelial com própolis 10% por 3, 7, 14 e 21 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$) (Tabela 05) sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, aumentando a contagem de fibroblastos nos 3 e 7 dias e resultado inverso nos períodos de 14 e 21 dias.

Tabela 05

Efeito da própolis a 10% sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	59,00	60,00	65,00	60,91	1,31 a
7 dias	66,00	87,00	93,00	86,91	3,59 b
14 dias	44,00	45,00	51,00	46,00	1,66 c
21 dias	31,00	37,00	39,00	36,11	1,35 d

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 5% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tem sido relatado que compostos fenólicos exercem uma grande variedade de propriedades biológicas, tais como capacidade para realizar atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres, dentre eles os derivados do óxido nítrico, o que pode acelerar a cicatrização de feridas cutâneas (NAKAJIMA *et al.*, 2007; SERARSLAN *et al.*, 2007; SEHN *et al.*, 2009). Outras atividades da própolis avaliadas em animais experimentais têm revelado efeitos benéficos em inflamações agudas, crônicas (HU *et al.*, 2005; PAULINO *et al.*, 2008) e na angiogênese.

Sutta *et al.*(1974), ao utilizarem solução alcoólica de própolis em tratamento de feridas de animais, observaram que o tratamento com própolis induzia a uma melhor cicatrização, reduzindo a resposta inflamatória e, por conseguinte, a cicatrização do epitélio era mais rápida. Os autores consideraram a própolis adequada para o tratamento de feridas, após a eliminação da infecção.

Especificamente nas feridas cutâneas, a própolis apresenta um fator anti-inflamatório e antibacteriano, o que conseqüentemente melhora a cicatrização das feridas (RAMOS e MIRANDA, 2007).

Por meio de testes em laboratório, foi provado que a própolis contém pelo menos onze flavonoides (SANTOS, 1999). A atividade anti-inflamatória observada na própolis parece ser devida à presença de flavonoides, especialmente galangina. Este flavonóide apresenta atividade inibitória contra a ciclo-oxigenase (COX) e lipo-

oxigenase (BORRELLI *et al.*, 2002). A própolis tem demonstrado ação anti-inflamatória também por inibir a síntese das prostaglandinas, ativar a glândula timo, auxiliando o sistema imune pela promoção da atividade fagocítica e estimulando a imunidade celular (KOSALEC *et al.*, 2005). Fato a se considerar, já que a amostra de própolis adotada no estudo possuía aproximadamente 6.8% de concentração de flavonoides.

Ao comparar a cicatrização subcutânea induzida em ratos com uma solução alcoólica de própolis a 10% mais 30%, ambas estimularam a reparação tecidual, com formação neovascular significativa, seguida por regeneração tecidual rápida, apesar do resultado das lesões tratadas com solução a 30%, ser mais lento (PERUCHI *et al.*, 2001).

O tratamento da lesão epitelial do grupo controle laser com por 3, 7, 14 e 21 dias não diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) (Tabela 06) sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, sem aumento na contagem de fibroblastos nos respectivos períodos.

Tabela 06

Efeito do grupo controle laser sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	44,00	47,00	54,00	47,38	1,94 a
7 dias	44,00	46,00	50,00	45,95	1,28 a
14 dias	42,00	44,00	49,00	44,11	1,26 a
21 dias	40,00	45,00	47,00	45,38	1,48 a

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

No presente estudo, ao se avaliar a proliferação fibroblástica em ambos os grupos, observou-se no grupo controle menor contagem de fibroblastos quando comparado com o grupo tratado.

O tratamento da lesão epitelial do grupo controle própolis por 3, 7, 14 e 21 dias não diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$) (TABELA 07 e GRÁFICO 01) sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, sem aumento na contagem de fibroblastos.

Tabela 07

Efeito do grupo controle própolis sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	37,00	41,00	47,00	41,50	2,14 a
7 dias	38,00	40,00	42,00	40,35	0,95 a
14 dias	39,00	41,00	47,00	41,46	1,60 a
21 dias	36,00	40,50	45,00	40,55	1,97 a

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

No presente estudo, ao se avaliar a proliferação fibroblástica em ambos os grupos, observou-se no grupo controle menor contagem de fibroblastos quando comparado com os grupos tratados a 5% e 10%, com exceção do período de 21 dias tratados individualmente com própolis a 10% e também associado ao laser. Ficou evidente um aumento significativo na contagem de fibroblastos nos demais períodos dos grupos tratados com relação ao grupo controle.

O tratamento da lesão epitelial do grupo associado ao laser com própolis a 5% por 3, 7, 14 e 21 dias não diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p>0,05$) (TABELA 08) sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados. Houve aumento na contagem de fibroblastos quando comparado aos demais grupos laser, própolis a 5%, controles própolis e laser, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo ao comparar os resultados descritos na Tabela 08 e Gráfico 01.

Tabela 08

Efeito da associação de laser e própolis a 5% sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	65,00	69,00	72,00	69,11	1,49 a
7 dias	66,00	70,00	72,00	69,55	1,22 a
14 dias	67,00	72,00	73,00	71,17	2,08 a
21 dias	67,00	68,00	76,00	69,17	3,01 a

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Alguns estudos associaram a própolis e o Aloe vera com o objetivo de analisar a influência destas substâncias na contração de feridas em dorso de ratos e concluíram que o gel de *Aloe vera in natura* e a tintura hidroalcoólica de própolis aceleraram clinicamente a contração de feridas induzidas em ratas da espécie *Rattus norvegicus albinus* (SEGUNDO *et al.*, 2007). Já Mendonça *et al.* (2008) utilizaram o laser As-Ga-Al de baixa potência, 830nm e o barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman Martius*) em solução aquosa para tratar ferida séptica de ovino e concluíram que a associação de ambos apresentou eficiência no auxílio da reparação tecidual. Portanto, este estudo propôs analisar a associação de laser de baixa intensidade e própolis na indução de fibroblastos nas lesões de pele induzidas cirurgicamente.

O tratamento da lesão epitelial do grupo associado ao laser com própolis a 10% por 14 e 21 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$) (TABELA 09 e GRÁFICO 01) sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, diminuindo a contagem de fibroblastos no 14º e 21º dias do tratamento.

Tabela 09

Efeito da associação de laser e própolis a 10% sobre a contagem de fibroblastos de tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	63,00	65,00	68,00	64,82	1,19 a
7dias	63,00	66,00	67,00	65,93	1,27 a
14 dias	43,00	46,00	47,00	45,70	1,22 b
21 dias	34,00	39,00	41,00	38,61	1,85 c

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 5% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Lima (2004) propôs o tratamento com laser em baixa intensidade, 685nm, 50mW, 4J/cm² associado ou não à droga fotossensibilizadora em feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e concluiu que as feridas tratadas com laser e as tratadas com solução fotossensibilizadora e laser evidenciaram processo de reparação mais diferenciados, quando comparadas às feridas do grupo controle. O presente estudo utilizou a associação do laser de baixa intensidade com a própolis a 10% na indução de fibroblastos nas lesões de pele induzidas cirurgicamente.

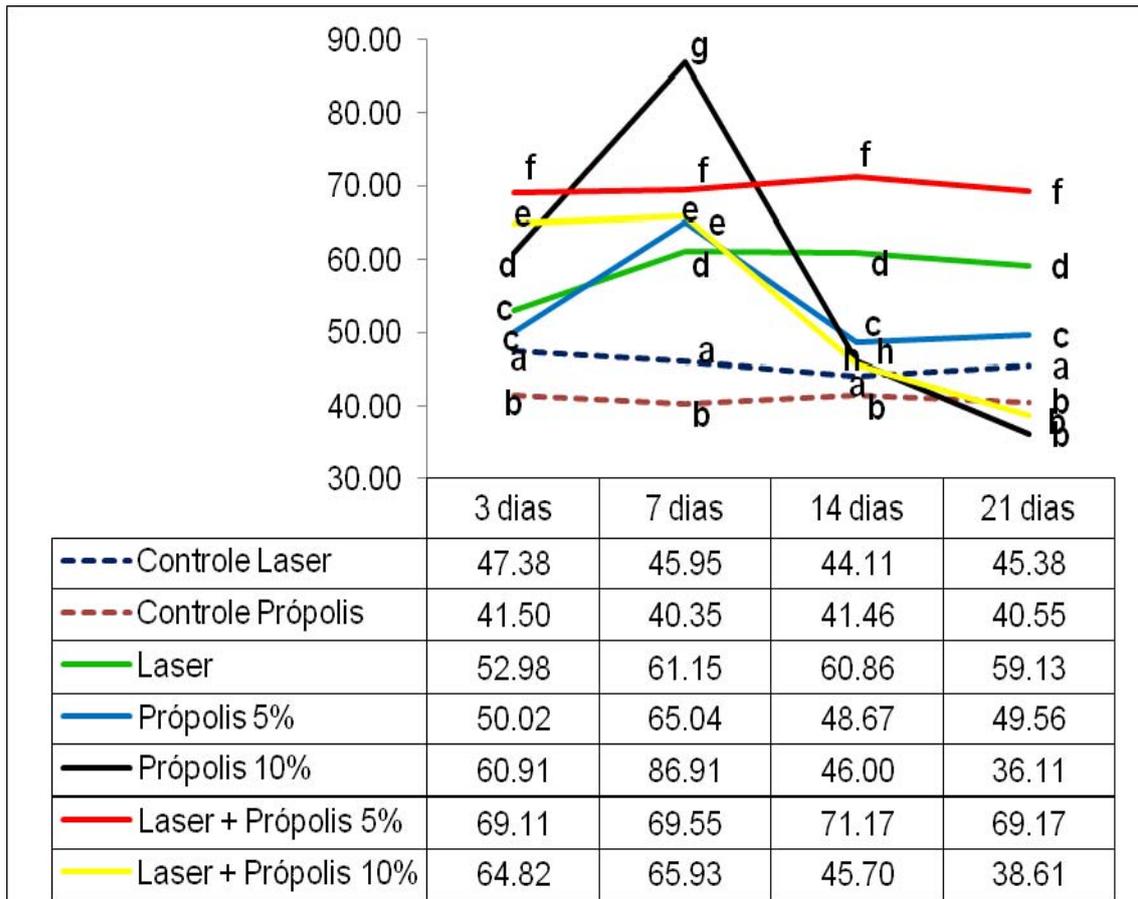


Gráfico 02 - Comparação entre as médias de fibroblastos dos tecidos conjuntivos dos ratos submetidos aos tratamentos nos quatro períodos.

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% e 5% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Verifica-se ao comparar os grupos tratados e controles, que o grupo laser associado à própolis 5% parece ser efetivo em todos os períodos analisados no processo de cicatrização, e não apenas em alguns períodos observáveis nos demais grupos.

O tratamento da lesão epitelial com laser de baixa potência por 3 e 7 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (Tabela 10), quando comparados os períodos de 14 e 21 dias sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, aumentando a contagem de vasos sanguíneos no período de 3 dias.

Tabela 10

Efeito do laser sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra Máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	0,00	0,00	4,00	0,41	0,87 a
7 dias	0,00	0,00	3,00	0,13	0,61 b
14 dias	0,00	0,00	1,00	0,07	0,25 c
21 dias	0,00	0,00	2,00	0,05	0,32 c

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Pesquisadores fizeram trabalhos empregando a terapia laser em tecidos íntegros. Um aumento do fluxo sanguíneo foi verificado, o que poderia levar a uma maior oxigenação dos tecidos e a uma biomodulação positiva (SCHAFFER *et al.*, 2000).

Rocha-Junior *et al.* (2007) realizaram um estudo para investigar o comportamento de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) submetidos a tratamento de baixa intensidade com 3,8 J/cm², dose de 15 mW de potência e 15 s de tempo de aplicação. Os animais (n = 12) foram divididos em dois grupos, um controle e o outro tratado com laser. Os resultados apresentaram aumento da neovascularização e proliferação de fibroblastos, bem como a diminuição da quantidade de processos inflamatórios nas lesões cirúrgicas submetidas ao tratamento com laser.

Schindl *et al.* (2000) verificaram um aumento do número de vasos formados em úlceras na pele irradiadas com *laser* em baixa intensidade. Tassinari (2005) observou em seu experimento um aumento da angiogênese no grupo *Laser* no decorrer do período experimental (14 dias).

O tratamento da lesão epitelial com própolis a 5% por 3 e 21 dias diferiram estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (Tabela 11), quando comparados a 7 e 14 dias sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo em ratos

durante os períodos tratados, com aumento na contagem de vasos sanguíneos nos 3 dias e ausência de novos vasos nos 21 dias.

Tabela 11

Efeito da própolis a 5% sobre a contagem vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	0,00	0,00	4,00	0,43	0,81 a
7 dias	0,00	0,00	2,00	0,17	0,44 b
14 dias	0,00	0,00	2,00	0,10	0,37 b
21 dias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 c

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

A quercetina, em ambas as concentrações testadas, mostrou um forte efeito inibitório sobre a produção de VEGF, sugerindo seu envolvimento na modulação de angiogênese (SUJEN *et al.*, 2009; SOGNO *et al.*, 2009; IGURA *et al.*, 2001). Zhong *et al.* (2006) demonstraram que o tratamento com quercetina diminuiu significativamente a secreção de VEGF pelas células da leucemia mieloblástica NB4 *in vitro*. Além disso, estudos indicam que os flavonoides inibem VEGF induzindo funções das células endoteliais e vias de sinalização que operam a nível molecular (HASEBE *et al.*, 2003; TSENG *et al.*, 2004). Fato a se considerar, já que a amostra de própolis adotada no estudo possuía aproximadamente 6.8% de concentração de flavonoides.

O tratamento da lesão epitelial com própolis a 10% por 14 e 21 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (TABELA 12), quando comparados os períodos de 3 e 7 dias sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, com diminuição na contagem de vasos sanguíneos nos 21 dias e ausência de novos vasos nos 14 dias.

Tabela 12

Efeito da própolis a 10% sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	0,00	0,00	3,00	0,27	0,62 a
7 dias	0,00	0,00	4,00	0,33	0,79 a
14 dias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 b
21 dias	0,00	0,00	3,00	0,14	0,54 c

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Lima (2009) propôs, em seu trabalho, estudar os efeitos da própolis verde nos fenômenos inflamatórios e angiogênicos, usando o modelo de implante subcutâneo de esponja em ratos. Utilizando-se a dosagem do conteúdo de hemoglobina (Hb) das esponjas implantadas como um índice indireto da formação de novos vasos sanguíneos, pôde-se estimar a vascularização do implante. Dose diária de extrato aquoso de própolis (500mg/kg) administrada por gavagem para os diferentes grupos de camundongos causaram redução no conteúdo de hemoglobina dos implantes, indicando uma diminuição do número de vasos. Uma diminuição significativa no conteúdo de hemoglobina foi observada nos dias 7 e 14 após o tratamento com própolis. Essa diferença foi confirmada pela análise morfométrica dos implantes, mostrando um número de vasos significativamente menor no grupo tratado em comparação ao grupo controle. Tendo em vista que o VEGF é considerado um marcador molecular da angiogênese, foram avaliados os níveis dessa citocina nos implantes. Curiosamente, os níveis de VEGF aumentaram progressivamente no grupo tratado com própolis, mas diminuíram no grupo controle. O modelo de implante de esponja utilizado no trabalho tem sido eficaz em induzir a formação de um tecido fibrovascular caracterizado por parâmetros bioquímicos, funcionais e histológicos (WALSH *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 1987).

Embora alguns estudos já tenham avaliado o efeito do extrato aquoso de outras amostras de própolis e de componentes do ácido cafeico em processos inflamatórios, não foi encontrado na literatura qualquer trabalho que investigou

componentes relevantes da angiogênese inflamatória (recrutamento celular, formação de novos vasos sanguíneos e deposição de matriz extracelular) (LIMA, 2009).

Foi demonstrado por Hepsen *et al.* (1999) que a própolis suprimiu a neovascularização da córnea em coelhos, através das vias ciclo e lipo-oxigenase. Estudos *in vitro* usando células endoteliais humanas de veia umbilical têm demonstrado que o extrato de própolis atua na formação do tubo capilar por inibição da proliferação celular e migração de forma dose-dependente (AHN *et al.*, 2007).

Barreto (2008) utilizou extratos hidroalcóolicos de própolis vermelha incorporados a filmes bioativos, preparados a partir de colágeno I extraído de tendão bovino, e aplicados sobre feridas cirúrgicas padronizadas previamente confeccionadas em dorso de ratos. Os animais foram distribuídos em seis grupos (n=5): G1 e G4 – animais sem tratamento sacrificados em 7 e 14 dias; G2 e G5 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados em 7 e 14 dias; G3 e G6 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados em 7 e 14 dias. A maior densidade vascular identificada em G1 pode refletir uma estimulação exacerbada da proliferação endotelial por citocinas liberadas por células inflamatórias. Não houve diferença entre os grupos G2 e G3, apesar de relatos prévios indicarem que a própolis exibe atividade antiangiogênica (SONG *et al.*, 2002). Esses dados conflitantes podem mais uma vez ter relação com a concentração empregada ou com a variedade botânica da própolis utilizada no estudo. A densidade vascular ao décimo quarto dia foi substancialmente mais baixa, e não mostrou diferença entre os grupos, corroborando os relatos de Mandelbaum *et al.* (2003), que afirmam que nas fases tardias do reparo a vascularização é inconspícua, cedendo espaço à síntese ativa, deposição e remodelação do colágeno (BARRETO, 2008). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram os achados relacionados ao décimo quarto dia segundo Mandelbaum *et al.* (2003).

Segundo Barreto (2008), há de se considerar que a intrincada interação da rede microvascular com componentes de matriz extracelular, que caracteriza a reação de granulação, funciona como reservatório complexo de fatores de crescimento que estimulam a proliferação e migração fibroblástica para o interior da ferida, além de

aumentar o aporte de oxigênio na área lesada, garantindo uma melhor síntese de colágeno. À medida que o colágeno é depositado e maturado, ocorre compressão de vasos sanguíneos e capilares, levando as células endoteliais a sofrerem apoptose, de maneira tal que a reação de granulação ricamente vascularizada é substituída progressivamente por tecido cicatricial relativamente hipocelular e hipovasular (DESMOULIÈRE *et al.*, 1996).

Segundo Balbino, Pereira e Curi (2005), alguns sinalizadores contribuem para a formação de novos vasos. O primeiro deles é o VEGF. Atualmente a família do VEGF inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFE e o PLGF. O VEGF-A está sendo identificado como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento (GALE, YANCOPOULOS, 1999). Os macrófagos e os queratinócitos da região em reparo aumentam de forma pronunciada a expressão gênica de VEGF-A (BROWN *et al.*, 1992; FRANK *et al.*, 1995), e seus receptores estão aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação (LAUER *et al.*, 2000; PETERS *et al.*, 1993). A associação destes fatos por si só é um indicativo forte de sua participação na angiogênese. Esta hipótese foi recentemente reforçada pela demonstração de que a sua neutralização por anticorpos reduz a angiogênese, a formação de tecido de granulação e o acúmulo de fluidos em regiões que sofreram lesão (HOWDIESHELL *et al.*, 2001).

A síntese e deposição de matriz extracelular e a neoformação capilar representam eventos-chave no processo de cicatrização da pele. O potencial cicatrizante de produtos naturais como a própolis tem sido cada vez mais estudado, levando-se em conta a disponibilidade e o baixo custo destes produtos (FERREIRA *et al.*, 2007).

Ferreira *et al.* (2007) avaliaram o efeito da forma farmacêutica pomada de própolis (pomada C) na neoformação capilar e na morfogênese de fibras colágenas no tecido cicatricial, em feridas excisionais em ratos Wistar. No dorso de cada animal, com auxílio de um demarcador de área conhecida, foram feitas duas feridas. A ferida esquerda, experimental, recebeu tratamento diário com pomada de própolis. Sobre a ferida direita, controle, aplicou-se apenas a base da pomada. Os animais foram sacrificados em 4,7,10 e 14 dias após o início do tratamento. Aos 4 dias de tratamento, não houve diferença no número de capilares sanguíneos entre feridas

tratadas e controles. Aos 7 dias, apesar do pico na angiogênese, em ambos os grupos, as feridas tratadas com a pomada de própolis apresentaram menos capilares sanguíneos ($p < 0,05$); aos 10 e 14 dias o número de capilares nas feridas controle e tratadas declinou (remodelação), sendo mais acentuado nas feridas controle, de modo que as feridas tratadas com a própolis apresentaram um número maior ($p < 0,05$) de capilares nas fases mais tardias do reparo. Estes resultados sugerem uma ação modulatória da própolis na neoformação capilar, especialmente nas fases mais tardias da cicatrização.

O tratamento da lesão epitelial do grupo controle laser de baixa potência por 3 e 7 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (TABELA 13), quando comparados com os períodos de 14 e 21 dias sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, aumentando a contagem de vasos sanguíneos.

Tabela 13

Efeito do grupo controle laser sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	0,00	0,00	3,00	0,42	0,81 a
7 dias	0,00	0,00	1,00	0,13	0,33 b
14 dias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 c
21 dias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 c

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

O tratamento da lesão epitelial do grupo controle própolis por 3 e 7 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (TABELA 14), quando comparados com os períodos de 14 e 21 dias sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, aumentando a contagem de vasos sanguíneos.

Tabela 14

Efeito do grupo controle própolis sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	0,00	0,00	2,00	0,16	0,45 a
7 dias	0,00	0,00	4,00	0,29	0,91 b
14 dias	0,00	0,00	1,00	0,04	0,20 c
21 dias	0,00	0,00	1,00	0,03	0,16 c

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

O tratamento da lesão epitelial do grupo associado ao laser de baixa potência e própolis 5% por 3 e 7 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (TABELA 15), quando comparados com 14 e 21 dias sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, com aumento na contagem de vasos sanguíneos .

Tabela 15

Efeito da associação de laser e própolis a 5% sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	0,00	0,00	4,00	0,53	1,12 a
7 dias	0,00	0,00	3,00	0,32	0,78 b
14 dias	0,00	0,00	1,00	0,08	0,29 c
21 dias	0,00	0,00	1,00	0,08	0,29 c

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Segundo Kitchen (2003) o laser terapêutico de baixa potência atua nas feridas com o estímulo à microcirculação, garantindo um aporte eficiente de elementos nutricionais e defensivos para região lesada, favorecendo sua regeneração. Este estímulo à microcirculação aumentaria o aporte de elementos nutricionais, associado

ao aumento da velocidade mitótica, facilitaria a multiplicação das células (SILVA *et al.*, 1998; TAVARES; MAZZER e PASTORELLO, 2005), assim como a neovascularização, o que também contribuiria para a cicatrização (ROCHA *et al.*, 2003; ROCHA-JUNIOR *et al.*, 2006; VIEIRA, 2006; MILLIS *et al.*, 2008).

Após realização de estudo para investigar o comportamento de feridas cutâneas submetidas a tratamento de laser de baixa intensidade, Rocha Junior *et al.* (2007) afirmaram, como resultado, o aumento da neovascularização e proliferação de fibroblastos, bem como a diminuição da quantidade de processos inflamatórios nas lesões cirúrgicas submetidas ao laser o tratamento.

Lima (2009) observou uma diminuição significativa no conteúdo de hemoglobina nos dias 7 e 14 após o tratamento com própolis. Essa diferença foi confirmada pela análise morfométrica dos implantes mostrando um número de vasos significativamente menor no grupo tratado em comparação ao grupo controle.

O tratamento da lesão epitelial do grupo associado ao laser de baixa potência e própolis 10% por 3 dias diferiu estatisticamente (Teste de Kruskal-Wallis, $p \leq 0,01$) (TABELA 16), quando comparado a 7, 14 e 21 dias sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo em ratos durante os períodos tratados, aumentando a contagem de vasos sanguíneos.

Tabela 16

Efeito da associação de laser e própolis a 10% sobre a contagem de vasos sanguíneos do tecido conjuntivo de ratos durante os períodos tratados

Períodos	Amostra mínima (AMin)	Mediana (Med)	Amostra máxima (AMax)	Média (M)	Desvio Padrão (DP)
3 dias	0,00	0,00	3,00	0,47	0,83 a
7 dias	0,00	0,00	1,00	0,07	0,27 b
14 dias	0,00	0,00	1,00	0,05	0,22 b
21 dias	0,00	0,00	1,00	0,06	0,24 b

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Pereira *et al.* (2006) utilizaram 18 ratos, divididos em três grupos experimentais: grupo controle, grupo própolis 5% e grupo própolis 10%, contendo 6 ratos por grupo. A análise microscópica mostrou para todos os grupos, aos 3 dias, uma ferida recoberta por pseudomembrana com tecido de granulação subjacente com rico infiltrado inflamatório, MN e moderada vascularização.

Peruchi *et al.* (2001), ao compararem a cicatrização subcutânea induzida em ratos com uma solução alcoólica de própolis a 10% e 30%, perceberam que ambas soluções estimularam a reparação tecidual, com formação neovascular significativa, seguida por regeneração tecidual rápida, apesar do resultado das lesões tratadas com solução a 30% ser mais lento do que a tratada com solução a 10%.

De acordo com Barreto (2008), a densidade vascular ao décimo quarto dia foi substancialmente mais baixa, corroborando os relatos de Mandelbaum *et al.* (2003), que afirmam que nas fases tardias do reparo a vascularização é inconspícua, cedendo espaço à síntese ativa, deposição e remodelação do colágeno.

Dados recentes obtidos *in vitro* ou em estudos com animais indicam que os flavonoides podem também alterar a função das células, independentemente do seu poder antioxidante (KIM *et al.*, 2006), afetando todo o processo de carcinogênese por mecanismos diferentes. Uma vez que é sabido que a neovascularização representa um processo fundamental no crescimento do tumor, invasão e metástases, um grande interesse científico tem desenvolvido nos últimos anos sobre os potenciais inibidores de angiogênese. Entre os produtos naturais da saúde, flavonoides na dieta têm mostrado possuir efeito antiangiogênico, inibindo vários passos importantes para o crescimento de novos vasos: uma deficiência de expressão do VEGF por flavonoides diferentes tem sido documentada (LAMY, BÉDARD, LABBÉ, *et al.*, 2008; SINGH-GUPTA, ZHANG, BANERJEE *et al.*, 2009).

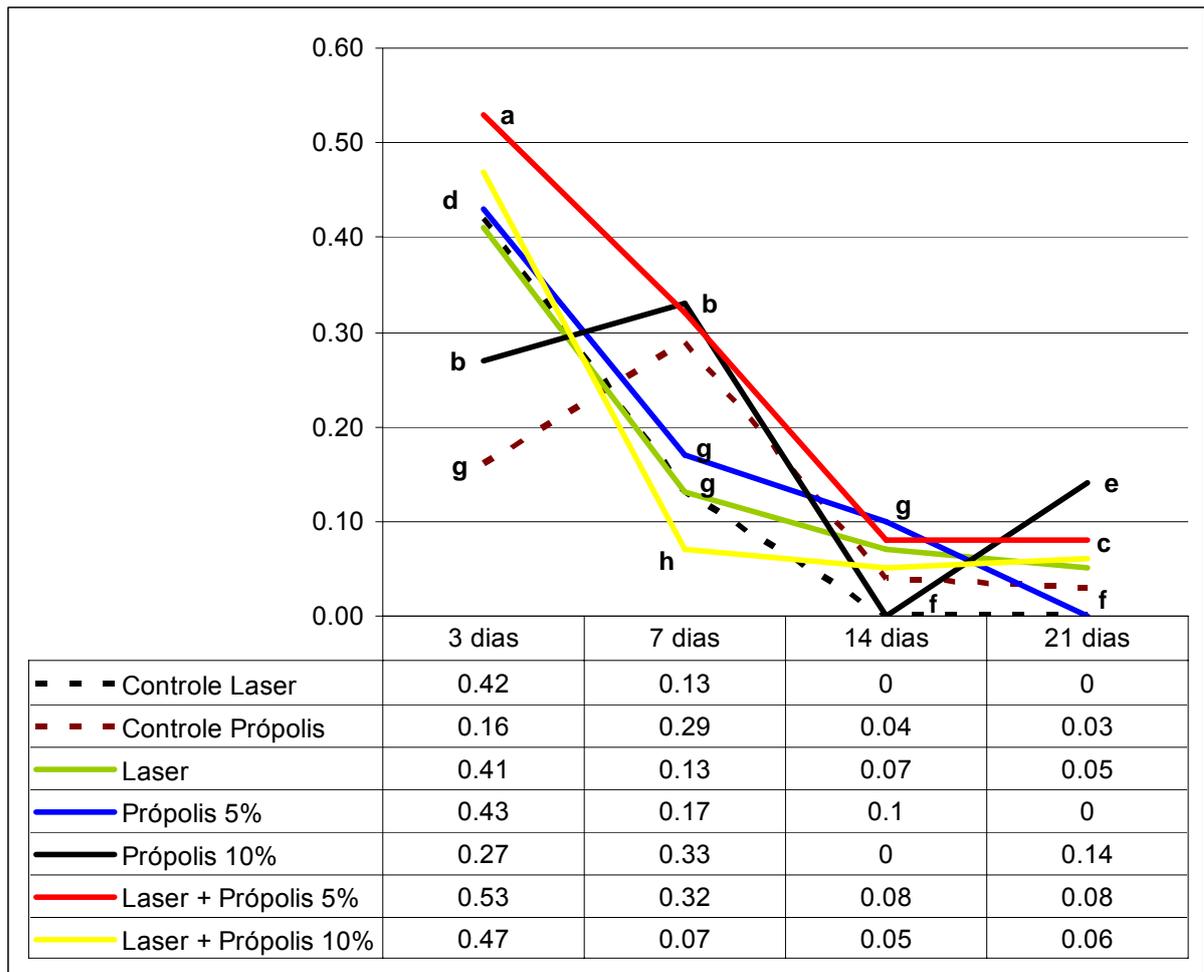


Gráfico 03 - Comparação entre as médias de vasos sanguíneos dos tecidos conjuntivos dos ratos submetidos aos tratamentos nos quatro períodos.

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia dos Microrganismos da UNIFENAS, 2010.

Notas: Letras iguais indicam não significância e letras diferentes indicam significância ao nível de 1% e 5% pelo Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os resultados obtidos neste trabalho, associados à revisão literária, sugerem que o laser de baixa intensidade, 658nm, 15mW de potência, 3 J/cm², assim como a solução de própolis a 5% e 10%, são indicativos para tratar feridas, sendo efetivos no processo inicial de cicatrização, no período de 3 e 7 dias, sejam usados individualmente ou em associação de ambos. Portanto, podem ser considerados como mais um recurso de baixo custo, usados por profissionais da área de saúde para tratar feridas, tornando-se um tratamento acessível à população.

Ainda assim, segundo Tavares *et al.* (2005), restam alguns questionamentos a serem respondidos, com relação ao laser de baixa intensidade, tais como: dose ideal para um determinado tratamento, tipo de laser a ser utilizado, fase da inflamação

ideal para intervenção laserterápica, já que, metodologicamente, são utilizados diferentes tipos de laser, com diferentes comprimentos de onda, potência do laser e dosagens, o que pode explicar achados contraditórios (POSTEN *et al.*, 2005).

Outra questão a ser considerada diz respeito à escassez de estudos terapêuticos da própolis em feridas, e a consistência metodológica dos estudos existentes, já que alguns fatores como a falta de padronização sobre locais de coleta, formas utilizadas em sua extração, entre outros, podem influenciar no resultado (BARBOSA *et al.*, 2009).

Sugerem-se novas pesquisas com o intuito de analisar outros fatores envolvidos no processo de inflamação e cicatrização que não sejam apenas a contagem de fibroblastos e vasos sanguíneos, objetivos deste estudo.

7 CONCLUSÕES

Do presente estudo pôde-se concluir que:

1. Em relação à cicatrização das feridas nos grupos comparados pôde-se constatar que o laser de baixa potência, 658nm, exerceu uma ação mais efetiva nos dias iniciais da cicatrização. Ao comparar ao grupo controle, houve uma taxa de cicatrização mais intensa em relação a todo o processo de cicatrização (3, 7, 14 e 21 dias);
2. O uso de própolis a 5% promoveu uma ação mais efetiva na fase inicial da cicatrização (7 dias). Em comparação ao grupo controle, houve uma taxa de cicatrização mais intensa em relação à fase exsudativa e proliferativa (3 e 7 dias) do processo de cicatrização.
3. O uso de própolis a 10% promoveu uma ação efetiva nas fases exsudativa e proliferativa do processo de cicatrização (3, 7 e 14 dias). Esses resultados também se aplicam ao se comparar com o grupo controle.
4. Ambos os recursos laser de baixa potência 658nm e própolis a 5% promoveram uma ação efetiva na fase inicial da cicatrização, sendo a taxa de cicatrização do laser maior em 14 e 21 dias, quando comparados os grupos.
5. Ambos os recursos laser de baixa potência 658nm e própolis a 10% promoveram uma ação efetiva na fase inicial da cicatrização, sendo a taxa de cicatrização do laser maior em 14 e 21 dias, quando comparados os grupos.
6. Ao comparar os grupos própolis a 5% e a 10% verificou-se uma ação efetiva na fase inicial (3 e 7 dias) da cicatrização em ambos os grupos, sendo a taxa de cicatrização maior no grupo de própolis a 10%.

7. A associação dos recursos laser de baixa potência 658nm e própolis a 5% promoveram uma ação efetiva em todo o processo de cicatrização (3, 7, 14 e 21 dias), quando comparados aos grupos controle laser, controle própolis, própolis a 5%, própolis a 10% e laser de baixa potência 658nm.
8. A associação dos recursos laser de baixa potência 658nm e própolis a 10% promoveram uma ação menos efetiva em meados e ao final do processo de cicatrização (14 e 21 dias). Quando este grupo foi comparado aos demais grupos controle laser, controle própolis, própolis a 5%, própolis a 10% e laser de baixa potência 658nm, verificou-se uma ação efetiva na fase inicial do processo de cicatrização (3 dias).
9. Não houve efeitos deletérios do uso do laser de baixa potência 658nm e da própolis a 5% e a 10% em ratos no processo de cicatrização.
10. Tanto o laser de baixa potência 658nm, quanto a própolis a 5% estimularam a neoangiogênese na fase inicial do processo de cicatrização (3 dias). Ao comparar os grupos laser e própolis a 5% com os respectivos grupos controles, verificou-se apenas estímulo a neoangiogênese da própolis na fase inicial do processo de cicatrização (3 dias) e do laser em meados e final do processo de cicatrização (14 e 21 dias).
11. A associação do laser de baixa potência e da própolis a 5% estimularam a neoangiogênese nas fases iniciais do processo de cicatrização (3 e 7 dias) quando comparados aos demais grupos controle laser, controle própolis, própolis a 5%, própolis a 10% e laser de baixa potência 658nm.
12. A associação do laser de baixa potência e da própolis a 10% estimularam a neoangiogênese na fase inicial do processo de cicatrização (3 dias) quando comparados aos demais grupos controle laser, controle própolis, própolis a 5%, própolis a 10% e laser de baixa potência 658nm; porém, foi menos efetivo quando comparado com o grupo laser associado a própolis 5%.

REFERÊNCIAS

ABE, R. *et al.* Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. **J Immunol**, v.166, n.12, p.7556-7562, 2001.

ABERGEL, R. P.; LYONS, R. F.; CASTEL, J. C. Bioestimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, New York, v. 13, n. 8, p. 127- 133, May 1987.

AHN, M. *et al.* Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of China. **Food Chem**, v.101, p.1400-1409, 2007.

ALENCAR, S.M. *et al.* Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural**, v.35, p.909-915, 2005.

AMADEU, T.P. *et al.* Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **Int J Low Extrem Wounds**, v.2, n.2, p.60-68, 2003.

AMARAL, A.C.; PARIZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Lasers Surg Med**, v.16, p.44-51, 2001.

AMORIN, J.C.F. Reparação gengival após a técnica de gengivectomia e aplicação de laser em baixa intensidade. Avaliação clínica e biométrica em humanos. 2001. 121f. Dissertação (mestrado profissionalizante) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ANDRADE, S.P.; FAN, T.P.D.; LEWIS, G.P. Quantitative in vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **Br. J. Exp. Pathol.** v. 68, p.755-766, 1987.

ANDERS, J.J.; *et al.* FGF expression increases with low power laser irradiation during healing of cutaneous wounds in normal and diabetic *Psammomys obesus*. **Lasers Surg. Med.**, v. 14, p.12, Suplemento, 2002.

ARVOUET-GRAND, A. *et al.* Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. **J Pharm Belg**, v.49, p.462-468, 1994.

AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis in *Leishmania amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, p.215-220, 2007.

AZEVEDO, LH *et al.* Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. **Lasers Med Sci**, v.21, n.2, p.86-89, 2006.

AZEVEDO, I.B.S. *et al.* Tratamento de escaras de decúbito com própolis. **Rev Bras Enferm.**, v. 39, n. 213, p.33-37, 1986.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J Ethnopharmacol**, v.100, p.114-117, 2005a.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **e CAM**, v.2, p.29-32, 2005b.

BANKOVA, V. *et al.* Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Z Naturforsch**, v.50c, p.277-280, 1996.

BANKOVA, V. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z Naturforsch**, v. 54c, p.167-172, 1995.

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

BANSKOTA, A. H. *et al.* Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **J.Nat Prod.**, v. 29, p.896-900, 1998.

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

BARBOSA, F.S. **Efeito da laserterapia de baixa potência GaAlInP na inflamação granulomatosa experimental em camundongos**. 2008 Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

BARBOSA, M. H. *et al.* Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul Enferm.**, v. 22, n. 3, p.318-322, 2009.

BARRETO, A.L.S. Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos. 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Tiradentes, Tiradentes, 2008.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v.16, p.331-342, 1995.

BAXTER, G.D. **Therapeutic lasers**. New York: Churchill Livingstone, 1994. p. 259.

BERNARDO, C.L.E.; et al. Própolis: cicatrizante e antibiótico natural. **Rev Bras Enferm.**, v.43, n.1/4, p.101-106, 1990.

BIBIKOVA, A.; BELKIN, V; ORON, U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. **Anat Embryol (Berl)**., v. 190, p.597-602, 1994.

BIHARI, I; MESTER, AR. The biostimulative effect of low level laser therapy of longstanding crural ulcers using helium neon laser, helium neon plus infrared lasers, and noncoherent light: preliminary report of a randomized double blind comparative study. **Laser Ther.**, v.1, p.75-78, 1989.

BISHT, D.; GUPTA, S. C.; MISRA, V. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, v. 100, n. 2, p. 43-46, aug. 1994.

BJORDAL, J.M. *et al.* A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic disorders. **Austr J Physioter.**, v.49, p.107-116, 2003.

BONHEVI, J.S.; COLE, F.V.; JORDÁ, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **J. Oil Chem. Soc.**, v.71, p.529-532, 1994.

BORRELLI, F. *et al.* Phytochemical compounds involved in the inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v.73, p.53-63, 2002.

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.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 132, de 29 de Maio de 2003. **Diário Oficial da União**, de 02 de Outubro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.

BROWN, L. F. *et al.* Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1375-1379, 1992.

BUCALA, R. *et al.* Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. **Mol Med**, v.1, n.1, p.71-81, 1994.

BRUDZYNSKI, K; CARLONE, R. Stage dependent modulation of limb regeneration by caffeic acid phenethyl Ester (CAPE) immunocytochemical evidence of a CAPE. **J Experimental Zoology.**, V.301 A, n.5, p.389-400. 2004.

BUSNARDO, V.L.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Rev Bras Fisiot.** São Carlos, v.14, n.1, p.45-51, jan/fev, 2010.

CAMPOS, G. M. *Estatística prática para docentes e pós-graduandos*, 2000. Disponível: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/gmc_livro.html> Acesso em: 7 mar. 2009.

CANDIDO, L.C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: Editora SENAC-SP, 2001.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, p.1-6, 2002.

CARVALHO, P.T.C. *et al.*; Photodynamic inactivation of in vitro bacterial cultures from pressure ulcers. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, n.4, 2006.

CARVALHO, P. T. *et al.* Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, n. 3, p. 177-183, May/June 2006.

CARVALHO, P.T.C. *et al.* Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. **Fisioter Bras.**, v. 4, n.4, p.253-258, 2003.

CARRILLO, J.S.; *et al.* A randomized double blind clinical trial on the effectiveness of helium-neon laser in the prevention of pain, swelling and trismus after removal of impacted third molars. **Int. dent. J.**, v.40, p.31-36, 1990.

CASTRO, ML. *et al*, Propolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quim. Nova**, v. 30, N. 7, p.1512-1516, 2007.

CATÃO, MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Rev Bras Patol Oral.**, v.3, p.214-218, 2004.

CATEF 2005. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos. Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis 2005. Disponível em < E:\Própolis\Anvisa - Instituição - Câmaras Técnicas - Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos - CATEF.

CHIBEBE, P.C.de A. *et al*. Análise histológica de tecido gengival de indivíduos que apresentam fibromatose gengival induzida por medicamento. **Odontologia. Clin. Cientif.**, v. 5, n.4, p.293-298, 2006.

CHOI, Y.M. **et al**. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT**, v.39, p.756-761, 2006.

CHOW RT, BARNESLEY L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. **Lasers Surg Med.**, v. 37, p.46-52, 2005.

CIZMARIK, J. *et al*. **Analisis y critica de las teorías acerca de la formación del propoleos**. Apimondia: Bucarest. 1998.

COLVER, G. B.; PRIESTELEY, G. C. Failure of a heliumneon laser to affect components of wound healing "*in vitro*". **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 121, n. 2, p. 179-186, aug., 1989.

CORTANI, G. Estrazione della frazione oleresinosa della propoli ed esempi di utilizzazione di tale resina nella preparazione di prodotti cosmetici. **Riv. Ital. Sostanze Grasse**, v. 68, p. 99-100, 1991.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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.

DAMANTE, C.A.; MARQUES, M.M.; MICHELI, G. de. Terapia com *laser* em baixa intensidade na cicatrização de feridas - revisão de literatura *Low-intensity laser*

therapy on wound healing - review of literature. RFO, v. 13, n. 3, p. 88-93, set/dez. 2008.

DAMANTE, C.A. *et al.* Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty and low-level laser therapy. **Lasers Surg Med.**, v. 35, p.377-384, 2004.

DAMANTE, C.A. *et al.* Clinical evaluation of the effects of low-intensity laser (GaAIs) on wound healing after gingivoplasty in humans. **Journal of Applied Oral Science**, v.12, n.2, p.133-136, 2004.

DAMYANLIEV, R. *et al.* The treatment of suppurative surgical wounds with propolis. **Folia Medica**, Plovdiv, v. 24, n. 2, p. 24-27, 1982.

DANTAS, A. P. **et al.** Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **J Ethnopharmacol**, v.103, p.187-193, 2006.

DANTAS FILHO, V. P. Aspectos éticos do tratamento de feridas. In: JORGE, A.S.; DANTAS, S.R.P.E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 7-10.

DEBLOCK-BOSTYN, G. L'Abeille et ses produits. **Bull Soc. Pharma Lille**, v.38, p. 181-203, 1982.

DEBUYSER, E. **La propolis**. France, 1983. | Thesis (Doctor) - Université de Nantes, France, 1983.

DECLAIR, V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com ácido linoleico. **J Bras Med**, v.82, n.6, p.3-7, 2002.

DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. The role of myofibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. In: CLARK, R.A.F. (Editor). **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum, 1996. p.391-423.

DIAZ, J.C.Q. *et al.* Empleo de la tintura de propóleo al 5 en la cura de heridas sépticas faciales. **Rev. Cuba Estomatol.**, Cuba, v.34, n.1, p.347-351, 1997.

DUARTE, S. *et al.* The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Arch Oral Biol.**, v.51, n. 1, p.15-22, 2006.

ERENO, D. Curativo de Borracha. **Revista Pesquisa Fapesp**, número 88, junho de 2003, *Ethnopharmacol*, v.94, p.307-315, 2004.

FERNANDES Jr., A. *et al.* Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, p.563-566, 2005.

FERREIRA, G.Z. *et al.* Ação da própolis na angiogênese e fibroplasia de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Int. J. Morphol.**, v. 25 n. 1, mar. 2007.

FERREIRA, M. A. **Efeitos do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização em ratos jovens e idosos: estudo morfométrico e morfológico.** 2006. Dissertação de Mestrado (Mestre em Saúde) - Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2006.

FRANK, S. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 12607- 126013, 1995.

FUNARI, C. S; FERRO, V. O. Análise de Própolis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n. 1, p.171-178, jan.-mar. 2006.

FUKUDA, TY; MALFATTI, CA. Análise da dose do laser de baixa potência em equipamentos nacionais. **Rev Bras Fisioter**, São Carlos, v. 12, n. 1, p. 70-74, jan./fev. 2008.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol**, v.200, n.4, p.500-503, 2003.

GALE, N.W.; YANCOPOULOS, G.D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development. **Genes Dev.**, v.13, p. 1055-1066, 1999.

GARCIA, VG *et al.* Influência do número de aplicações de raio laser de bioestimulação sobre a reparação de feridas de extração dentária. Estudo histológico em ratos. **Rev Faculd Odontol Lins.**, v.12, p.29-37, 2000.

GARCIA V, OKAMOTO T, KINA J. Histologic study of healing process in rat cutaneous wounds treated by laser. **Rev Odontol UNESP.**, v. 25, n. 1, p.37-48, 1996.

GARCIA, VG; KINA, JR; MILANEZI, LA. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo clínico em ratos. **Rev Faculd Odontol**, Lins, v.8, p.9-15, 1995.

GARAVELLO-FREITAS, I. *et al.* Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. **J Photochem Photobiol B.**, v.70, p.81-89, 2003.

GAVISH, L. *et al.* Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein. **Laser Surg. Med.**, v. 35, p. 369-376, 2004.

GAM, A.N.; THORSEN, H; LONNBERG, F. The effect of low level laser therapy on musculoskeletal pain: a meta-analysis. **Pain.**, v. 52, p.63-66, 1993.

GERALDINI, C.A.C.; SALGADO, E.G.C., RODE S.M. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária - avaliação ultra-estrutural. **Revista da Faculdade de Odontologia** São José dos Campos, v.3 n.2, 2000.

GIORGIO, S.; RIBEIRO, M.C.M.; AYRES, D.C. Composições medicamentosas a base de própolis brasileira tipifi cada com atividade leshmanicida e método de tratamento. **BR/SP PI 0601863-7 A**, 2006.

GLIENKE, P. O.; HEHL, H. A flavonoid containing extract of propolis. European Patent 135 601, 11pp. 1985 apud MARCUCCI, M. C. Propolis (Bee Glue): uses in cosmetic and pharmaceutical industry. **Química & Indústria**, p. 26-30, 1995.

GOETZ, P. Monographies médicalisées de phytothérapie: propolis. **Phytotherapie**, v. 3, p. 29-30, 1990.

GOMEZ-VILLAMANDOS, R. J. *et al.* I. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. **Lasers Surg Med.**, v.16, p.184-188, 1995.

GREENWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, v.71, p.107-118, 1990.

GRÉGIO, A.M.T. *et al.* Efeito da Propolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. **Estud. Biolog.**, v.27, n.58, jan./mar. 2005.

GREGORY, S. R. *et al.* Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **J Alter Complement Med**, v.8, p.77-83, 2002.

GUPTA A. K. *et al.* The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats. **J. Biomat. Appl.** v. 15, n. 3, p. 177-186, Jan. 2001.

HALLMAN, H. O. *et al.* Does low-energy Helium-Neon irradiation affect in vitro replication of human fibroblasts? **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 8, n. 2, p. 125-129, feb. 1988.

HALL, G. *et al.* Effect of low-level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swed. Dent. J.**, v.18, p.29-34, 1994.

HASEBE, Y. *et al.* Inhibition specific hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by flavonoid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n.10, p. 1379-1383, 2003.

HAWKINS D. H.; ABRAHAMSE H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. **Lasers Surg Med.**, v. 38, n.1, p.74-83, 2006.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, n. 3, p. 251-259, 2005.

HAY, K. D.; GREIG, D. E. Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. **Oral Surg**, v. 70, p. 584-586, 1990.

HAYACIBARA, M.F. *et al.* In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol**, v.101, p.110-115, 2005.

HEPSEN, I. F., H. Er, *et al.* Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. **Ophthalmic Res**, v. 31, n. 6, p.426-431, 1999.

HERRERO, C. Los efectos terapeuticos. **Bol Sociedad Española Láser Médico Quirúrgico.**, v. 15, p.22-26, 1998.

HESS, C.T. **Tratamento de feridas e úlceras.** Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Ed, 2002.

HILDEBRAND, K.A. *et al.* The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Med Arthrosc**, v.13, n.3, p.136-144, 2005.

HONMURA, A. *et al.* Therapeutic effect of Ga Al As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. **Laser Surg Med**, v. 12, p.441- 449, 1992.

HOPKINS, J. T. *et al.* Low-level laser Therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham Controlled study. **J Athl Train.**, v. 39, n. 3, p.223-229, 2004.

HOWDIESHELL, T. R. *et al.* Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **J. Sur. Res.**, v. 96, p. 163-182, 2001.

HU, F. *et al.* Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol**, v.100, p.276-283, 2005.

IGURA, K. *et al.* Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. **Cancer Letters**, v. 171, n. 1, p. 11-16, 2001.

IKENO K, IKENO T, MIYAZAWA C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res.**, v. 25, p.347-351, 1991.

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

INSTITUTO de Química. **Laboratório de Cromatografia Gasosa**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2007. Disponível em: <<http://www.afh.bio.br/tegumentar/tegumentar.asp>>. Acesso em: 14 jul de 2010.

IUSIM, M. *et al.* Evaluation of the degree of effectiveness of biobeam low level narrow band light on the treatment of skin ulcers and delayed postoperative wound healing. **Orthopedics.**, v. 15, p.1023-1026, 1992.

JULIA, V. *et al.* Características de la cicatrización de las heridas en el período fetal. **Cir Pediatr**; v.5, n.3, p.117-121, 1992.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto/atlas. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 488p.

KADOTA, S. *et al.* Antioproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**, v.80, p.67-73, 2002.

KANA, J. S. *et al.* Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 116, n. 3, p. 293-296, jul, 1981.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near I-R radiation on cells. **JPhotochem Photobiol. B**, v. 49, n. 1, p. 1-17, mar. 1999.

KARU, T.I. Molecular mechanism of low-power lasertherapy. **Lasers Life Sci.**, v.2, p.53-74, 1998.

KARU, T; PYATIBRAT, L; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B.**, v.27, p.219-223, 1995.

KARU, TI. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, v.56, n.5, p.691-704, 1989.

KARU, T. Photobiological Fundaments of Low-Power Laser Therapy. **J. Quantum Electronics**, v. QE 23, n. 10, p. 1703-1717, 1987.

KIM, J. D. *et al.* Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and cell adhesion to endothelial immune. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, n. 3, p. 165-176, 2006.

KITCHEN, S. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11. ed. São Paulo: Manole, 2003. p.171-187.

KITCHEN, S; PARTRIDGE, C. J. A review of low level laser therapy. **Physioter.**, v.77, n.3, p.161-168, 1991.

KOLÁROVÁ, H; DITRICHOVÁ, D; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg Med.**, v.24, p.231-235, 1999.

KOO, H. *et al.* Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Cur. Microbiol.**, 2000.

KOSALEC, I. *et al.* Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm**, v.55, p.423-430, 2005.

KROL W. *et al.* Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. **J. Ethnopharmacol.**, v.55, p.19-25, 1996.

KUJUMGIEV, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J Ethnopharmacol.**, v.64, n.3, p.235-240, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia, bases patológicas das doenças.** 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

LAMY, S; V. *et al.* The flavones apigenin and luteolin diet affect the migration of smooth muscle cells and expression of VEGF through inhibition of PDGFR- β phosphorylation. **Cancer Prevention Research**, v. 1, n. 6, p. 452-459, 2008.

LAUER, G. *et al.* Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wound. **J. Invest. Dermatol.**, v. 115, p. 12-18, 2000.

LIMA, H. J. C. *et al.* Ação do laser terapêutico em diferentes culturas de fibroblastos. In: CIOSP CONGRESSO INTERNACIONAL DE ODONTOLOGIA DE SÃO PAULO, 17, 2009. **Anais...**São Paulo, 2009.

LIMA, M.G. **A produção de própolis no Brasil.** São João da Boa Vista: São Sebastião Editor e Gráfico. 2006.

LIMA, M.A. **Reparação de feridas cutâneas retardadas, submetidas ao tratamento com laser em baixa intensidade, associado ou não à droga fotossensibilizadora:** estudo histológico em ratos. Dissertação (Mestrado). 2004. Faculdade de Ciências Odontológicas, UNIMAR, Marília, 2004.

LIMA, A.A. S. de *et al.* População de mastócitos em ulcerações bucais de ratos tratados com extrato etanólico de própolis. **Rev. Bras. de Patologia Oral**, 2004.

LOMELI, R. A.; KROTZSCH, E.; MICHCHENKO, A. Efecto de la estimulación láser de $\lambda = 650$ nm, utilizando dosis de uso clínico, sobre la proliferación de fibroblastos humanos cultivados. **Rev Mex Med Fis Rehab**, v.15, n.3-4, p.69-71, 2003.

LONGHINI, R. *et al.* Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, p.388-395, 2007.

LOWE, A. S.; WALKER, M. D.; O'BYRNE, M. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 23, n. 7, p. 291-298, apr. 1998.

LUBART R. *et al.* Effects of visible and near-infrared lasers on cells cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.3, p.2-31, 1992.

LUCAS, C; GEMERT, MJC; HAAN, RJ. Efficacy of low-level laser therapy in the management of stage III decubitus ulcers: a prospective, observer-blinded multicentre randomized clinical trial. **Lasers Med Sci.**, v.18, p.72-77, 2003.

LUCAS, C. *et al.* Efficacy of low level laser therapy on wound healing in human subjects: a systematic review. **Lasers Med Sci.**, v.15, p.81-93, 2000.

MAGRO FILHO, O., PERRI C.A.C. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. **J. Nihon. Univ. Sch. Dent.**, v.32,p.4-13, 1990.

MANARA, L. R. B. *et al.* Utilização da própolis em odontologia. **Rev FOB**, v.7, p.15-20, 1999.

MANDELBAUM, S.H. *et al.* Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares parte I. **An Bras Dermatol**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MANI, F. *et al.* Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **J Ethnopharmacol**, v.105, p.95-98, 2006.

MARCUCCI, MC. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**, v. 74, p. 105-112, 2001.

MARCUCCI, MC. Process to typing natural products. Requested patent. Brazilian National Institute for Intellectual Property, INPI, 2000.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p.83-89, 1995.

MARQUELE, F.D. *et al.* Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **J Pharm Biomed Anal**, v.41, p.461-468, 2006.

MARTINS, N. L.P. *et al.* Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (BABAÇU). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, 2006. Suplemento 3.

MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z.; PEREIRA, D.B. Efeitos da radiação soft-laser (diodo) sobre o processo de cicatrização cutânea em felinos. **Braz J Vet Res Anim Sci.**, v.31, n.1, p.43-48, 1994.

MATSUDA, A.H.; MACHADO, L.B.; MASTRO, N.L. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiat Phys Chem**, v.63, p.353-355, 2002.

MENDONÇA, G.B.N. *et al.* Laser As-Ga-Al de baixa potência associado com solução aquosa de barbatimão na reparação tecidual de ferida cutânea séptica de ovino. Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2008. Anais...Rio Grande do Sul, 2008.

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v.5, p.31-39, 1985.

METZ, C.N. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. **Cell Mol Life Sci**, v.60, n.7, p.1342-1350, 2002.

MILLIS, D. L.; FRANCIS, D.; ADAMSON, C. Novas modalidades terapêuticas na reabilitação veterinária. In: LEVINE, D. *et al.* **Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2008. p.95-117.

MIRZOEVA, OK; CALDER, PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.55, p.441-449, 1996.

MISERENDINO, L.J.; PICK, R. **Laser in dentistry**. Carol Stream. Quintessence Publishing, 1995. 341 p.

MIZUNO, M.; LINUMA, M.; KATO, H. Useful ingredients and biological activity of propolis. **Fragrance Journal**, v.15, n.2, p.20-28, 1987.

MIYATAKA, H. *et al.* Evaluation of propolis. I: Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biol. Pharm. Bull.**, v.20, p.496-501, 1997.

MODOLIN, M.; BEVILACQUA, R.G. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. **Rev. Bras. Clin. Ter.**, v.14, n.6, p.208-213, 1985.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. **Anatomia Orientada para Clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap.1, p. 11-12.

MOORE P, *et al.* Effect of wavelength on low-intensity laser irradiationstimulated cell proliferation *in vitro*. **Lasers Surg Med**, v.36, p.8-12, 2005.

MORI, L. *et al.* Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. **Exp Cell Res**, v.304, n.1, p.81-90, 2005.

NAKAJIMA, Y., M. *et al.* Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sci**, v.80, n.4, p.370-377, jan/ 2007.

NAGAOKA, T. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 26, p.487-491, 2003.

NASCIMENTO, D.G. *et al.* Efeitos da irradiação com o laser HeNe 632.8 nm sobre a cicatrização de feridas em ratos. **Ciência, Cuidado e Saúde Maringá**, v. 5, n. 2, p. 229-235, maio/ago. 2006.

NICOLAU, RA *et al.* Effect of low-power gaalas (660 nm) on bone structure and cell activity: An experimental animal study. **Lasers Med Sci**, v. 18, p.89-94, 2003.

NORONHA, L. *et al.* Estudo morfométrico e morfológico da cicatrização após uso do laser erbium: YAG em tecidos cutâneos de ratos. **J Bras Patol Med.**, v.40, n.1, p.41-48, 2004.

NUSSBAUM, EL; BIEMANN, I; MUSTARD, B. Comparasion of ultrasound/ ultraviolet-c and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. **Phys Ther.**, v.74, p.812-823, 1994.

NUSSBAUM, EL; ZUYLEN, JV; BAXTER, GD. Specification of treatment dosage in laser therapy: unreliable equipment and radiant power determination as confounding factors. **Physiother Can.** p. 157-167, 1999.

OLIVEIRA, A. C. P. *et al.* Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, p.493-497, 2006.

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

ONLEN, Y. *et al.* Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on *Pseudomonas keratitis* in rabbits. **Microbiol Res**, v.162, p.62-68, 2007.

ORSI, RO. *et al.* Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.6, p.205-219, 2000.

ORSOLIC, N. *et al.* Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *JEthnopharmacol*, v. 94, p.307-315, 2004.

OZKUL, Y.; SILICI, S.; ERÖGLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine*, v.12, p.742-747, 2004.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacogn*, v.17, p.102-107, 2007.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. de. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, v.58, p.2-7, 2000.

PARK, Y.K. *et al.* Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc Tecnol Aliment.*, v.18, n.3, p.313-318, 1998.

PARIZOTTO, N. A. **Ação do laser de hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual:** um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho. 1998. Tese (Doutorado).

PAULINO N. *et al.* Antiinflammatory effects of a bioavailable compound, artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.*, v.587, p.296-301, 2008.

PEREIRA, M.C.M.C. *et al.* Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 98, p.188–192, 2010.

PEREIRA, R.S. *et al.* Avaliação do efeito cicatrizante da própolis a 5% e a 10% em feridas cirúrgicas em ratos. In: **ENCONTRO DE PESQUISA DE IES DO SISTEMA ESTADUAL DE MINAS GERAIS**, 2, 2006. Anais... Caratinga: UNEC, 2006.

PEREIRA, A.S; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova*, v.25, p.321-326, 2002.

PEREIRA, A. N. *et al.* Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.*, v. 31, p.:263-267, 2002.

PEREIRA, A.L; BACHION, M.M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. **Rev Bras Enferm.**, v. 58, n.2, p.208-213, mar/abr. 2005.

PERUCHI, C.M.S. *et al.* Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. **Rev Fac Odontol Univ Chile.** V.19, n.2, p.23-34, 2001.

PETERS, K.G.; DEVRIES, C.; WILLIAMS, L.T. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 8915-8919, 1993.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, p. 7-20, 2002.

POSTEN, W. *et al.* Low-Level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol. Surg.**, New York, v. 31, n. 3, p. 334-340, Mar. 2005.

POURZARANDIAN, A. *et al.* Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **J Periodontol**, v. 76, n.2, p.187-93, 2005.

POZZA, D. H. *et al.* Análise da ação analgésica da terapia laser vermelho (660nm) e infravermelho (830nm) em tecidos íntegros do coxim plantar de camundongos. **Rev. Odont. Tiradentes.** p.25, 2009.

PRYTZYK, E. *et al.* Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **J. Ethnopharmacol**, v.88, p.189-193, 2003.

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

QUAN, T.E. *et al.* Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.4, p.598-606, 2004.

RAHAL, S.C. *et al.* Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.1, p.61-67, 2003.

RAMOS, A. F. N.; MIRANDA J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.13, n.4, p.697-710, 2007.

REED, B.V. Wound healing and the use of thermal agents. In: MICHLOVITZ, S.L. **Thermal agents in rehabilitation**. 3.ed. Philadelphia: F.A.Davis, 1996.

REED, M. J. *et al.* Neovascularization in aged mice: delayed angiogenesis is coincident with decreased levels of transforming growth factor beta 1 and type I collagen. **Am J Pathol**, v.152, p.113-23, 1998.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.22, p.281-287, 1998.

RENDELL, M. S. *et al.* The skin blood flow response in wound healing. **Microvasc. Res.** v. 53, n. 3, p. 222-234, May 1997.

REZENDE, G.P.S.R.; PIMENTA, F.C.; COSTA, L.R.R.S. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. **Braz J Oral Sci**, v.5, p.967-970, 2006.

REZENDE, S. B. Ação do diodo laser ($\lambda = 830\text{nm}$) sobre o processo de cicatrização de lesões cutâneas: estudo biométrico e histológico em ratos. 2001. Dissertação (Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RIBEIRO, M. S. *et al.* Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. **J Clin Laser Med Surg.**, v.22, n.1, p.59-66, 2004.

RIBEIRO, S.M.C.P. Soluções anti-sépticas em curativos. In: JORGE S.A. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003. cap. 9, p. 101-109.

RIBEIRO, M.S. **Curso clínico de laser em odontologia**. apostila de curso FUNDECTO – USP. São Paulo, 2001.

RICEVUTI, G *et al.* In vivo and in vitro He Ne laser effects on phagocyte functions. **Inflamm**, v.13, n.5, p. 507-527, 1989.

ROCHA, JÚNIOR A. M. *et al.* Efeitos da terapia a laser de baixa intensidade na evolução da cicatrização de lesões em humanos: a contribuição dos estudos experimentais in vitro e in vivo. **J Vasc Bras.**, v. 6, n. 3, 2007.

ROCHA JÚNIOR, A. M.; *et al.* Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.81, n.2, p.150-156, 2006.

ROCHA, L. *et al.* Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmacogn**, v.13, p.71-74, 2003.

ROCHA, J. C. T. Terapia laser, cicatrização tecidual e Angiogênese. **RBPS**, v.17, n.1, p.44-48, 2003.

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

SANCHEZ NETO, R. *et al.* Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cir. Bras.**, v.8, n.1, p.18-23, 1993.

SANTOS, V.R. Própolis: antibiótico natural alternativo em odontologia. **Revista do CROMG**. v.5, n.3, 1999.

SAPERIA, D. *et al.* Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with helium-neon laser. Proposed mechanism for enhanced wound healing. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 138, p.1123-1128, 1986.

SCHAFFER, M. *et al.* E. Effects of 780nm diode Laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrastenhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. Photochem. Photobiol.** v. 54, p. 55-60, 2000.

SCHINDL, A. *et al.* Systemic effects of low-intensity Laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvascular Research**, v. 64, p. 240-246, 2002.

SCHLAGER, A. *et al.* Low-Power Laser Light in the Healing of Burns: A Comparison Between Two Different Wavelengths (635nm and 690nm) and a Placebo Group. **Lasers in Surgery and Medicine**., v. 27, n. 1, p. 39-42, 2000.

SCAZZOCCHIO, F. *et al.* Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiol Res**, v.4, p.327-333, 2005.

SCHELLER, S. *et al.* The ability of ethanolic extract of propolis (EEP) to protect mice against gamma irradiation. *Z. Naturforsch. Sect. C. Biosc.*, v. 44, p.1040-1052, 1989.

SCHINDL, A. *et al.* Low intensity laser irradiation in the treatment of recalcitrant radiation ulcers in patients with breast cancer – long term results of 3 cases. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., Copenhagen*, v. 16, no. 1, p. 34-37, feb. 2000.

SEGUNDO, A.S. *et al.* Influência do Aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Rev. de Periodontia*. v. 17, n.1, março, 2007.

SEHN, E. *et al.* Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Acta Anal Chim.*, v. 635, n. 1, p.115-120, 2009.

SERARSLAN, G., E. ALTUG, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol*, v. 32, n. 6, p.709-715, nov. 2007.

SFORCIN, J. M. *et al.* Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*, v.73, p.243-249, 2000.

SFORCIN, J. M. *et al.* Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Venom Anim Toxins.*, v.7, n. 1, p.139-144, 2001.

SHINDL, A. *et al.* Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic ulcer determined by a video measuring system. *J. Am. Acad. Dermatol*, v. 40, p.481-484, 1999.

SHUB, T.A.; KAGRAMANOVA, K.A.; VOROPAEVA, S.D.; KIVMAN, G.Y.A. Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. *Antibiotiki*, v.26, p.268-271, 1981.

SILVA, E.C; FILHO, A.H; MUSSKOPF, D.E. Radiação laser. In: RODRIGUES em. **Manual de recursos terapêuticos**. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 17-35.

SILVA, E.B. *et al.* Efeito da ação da própolis na lâmina própria da mucosa bucal de ratos. *Rev. Robrac*, v.9, n.28, 2000.

SILVA, J. F. M. da *et al.* Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chem**, v.99, p.431-435, 2006.

SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D.B.; ARAÚJO, R.P.C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Rev Bras Farmacogn**, v.18, p.84-89, 2008.

SIMÕES, L.M.C. *et al.* Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J thnopharmacol**, v. 94, p. 59-65, 2004.

SIMUNOVIC, Z. *et al.* . 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. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 18, n.2, p. 6773, 2000.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v. 341, n.10, p.738-746, 1999.

SINGH-GUPTA, V; H. *et al.* Radiation induced by HIF-1 α cell survival is inhibited by soy isoflavones in prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1675-1684, 2009.

SOGNO, H. *et al.* Anti-angiogenic activity of a new class of chemopreventive compounds: terpenes acid oleanic. **Recent result in. Cancer Research**, v. 181, p. 209-212, 2009.

SONG, Y. S., *et al.* Inhibition of angiogenesis by propolis. **Arch Pharm Res**, v.25, n.4, p.500-504, aug. 2002.

SOUSA, J.P.B. *et al.* Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, p. 85-93, 2007.

STADLER, I. *et al.* In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes. **Lasers in Surgery Medicine**, v. 27, p. 255-261, 2000.

STEPANOVIC, S. *et al.* In vitro antimicrobial activit of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiol Res**, v.158, p.353-357, 2003.

SWERTS, M. S. O. *et al* Atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias bucais. **Jornal Brasileiro de Endo Perio**, v.3, n.3, p.256-261, 2002.

SWERTS, M. S. O. Terapias coadjuvantes no tratamento do doença cárie:xilitol, própolis e associações. In: MOYSÉS, S. J.; GROISMAN, S. (Org.). **Programa de Atualização em Odontologia Preventiva e Saúde Coletiva**. Porto Alegre, RS: Editorial Médica Panamericana, 2007. v. 3, p. 121-160.

SWERTS, M. S. O.; GROISMAN, S. Uso de xilitol, própolis, clorexidina e associações no tratamento da cárie: enfoques para clínica odontológica. **Perionews**, v.1, p.12-16, 2008.

SUGRUE, M.E. *et al.* The use of infrared laser therapy in the treatment of venous ulceration. **Ann Vasc Surg.**, v.4, p.179-181, 1990.

SUJEN, E.S. *et al.*The Phytoestrogen Quercetin Impairs Steroidogenesis and Angiogenesis in Swine Granulosa Cells In Vitro. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2009.

SUTTA, J; HANKO, J; JANDA, J; TKAC, J. Experimental and clinical experiences in the treatment of wounds in domestic animals by local application of an alcoholic solution of propolis. **Folia Veterinaria, Bratislava**, v. 18, p. 143-147, 1974.

SY, L.B. *et al.* Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. **Int Immunopharmacol**, v.6, p.1053-1060, 2006.

TASSINARI, S.C. **Estudo dos efeitos do laser em baixa intensidade na reparação em mucosa bucal de ratos**. 2005. Dissertação (mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo IPEN – FOU SP, São Paulo, 2005.

TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência GaAs (904nm). **Acta Cir Bras.**, v.131, n.2, p.86-93, 1998.

TAVARES, J.P. *et al.* Estudo de toxicologia clínica de um fototerápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.350-356, 2006.

TAVARES, M. R.; MAZER, N.; PASTORELLO, M. Efeito do laser terapêutico na cicatrização tendinosa: estudo experimental em ratos. **Fisioterapia Brasil**, v.6, n.2, p. 96-100, 2005.

TERAKI, Y.; SHIOHARA, T. Propolis-induced granulomatous contact dermatitis accompanied by marked lymphadenopathy. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 144, n. 6, p. 1277-1278, 2001.

THEODORO, L.H.; GARCIA, V.G.; MARCANTÔNIO JUNIOR, E. Lasers em implantodontia. **BCI**, v.9, p.74-78, 2002.

TOMASEK, J.J. *et al.* Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, n.5, p.349-363, 2002.

TOTH, G. Propolis: medicine or fraud? **Amer. Bee J.**, v.125, p. 337-338, 1985.

TRUSHEVA, B. *et al.* Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **e CAM**, v. 3, p. 249- 254, 2006.

TSENG, S. H. *et al.* Resveratrol suppresses angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. **Clinical Cancer Research**, v.10, n.6, p.2190-2202, 2004.

UZEL, A. *et al.* Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiol Res**, v.160, p.189-195, 2005.

VAN BREUGEL HHFI, BÄR D. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photobiomodulation of human fibroblasts *in vitro*. **Lasers Surg Med**, v.12, p.528-537, 1992.

VARGAS, A.C. *et al.* Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, p.159-163, 2004.

VARGAS, G. *et al.* Use of an agent to reduce scattering in skin. **Lasers In Surgery and Medicine**, v.24, p.133-141, 1999.

VEÇOSO, M.C. **Laser em Fisioterapia**. São Paulo: Lovise, 1993.

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Rev Brasarmacogn**, v.17, p.384-387, 2007.

VIEIRA, S. A. L. Efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas experimentais. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) – Universidade de Franca, 2006.

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.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**, v.42, p.354-361, 2006.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z.A. Comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v.7, p.1-6, 2000.

YOUNG, S. R.; DYSON, M.; BOLTON, P. Effect of light on calcium uptake by macrophages. **Laser Therapy**, v.2, n.2, p.53-57, 1990.

YU, W.; NAIM, J.O.; LANZAFAME, R.J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers Surg. Med.**, v.20, n.1, p.56-63, 1997.

WALKER, M.D. *et al.* Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers In Surgery and Medicine**, v.26, p.41-47, 2000.

WALSH, D. A., D. E. HU, *et al.* Sequential development of angiotensin receptors and angiotensin I converting enzyme during angiogenesis in the rat subcutaneous sponge granuloma. **Br J Pharmacol**, v.120, n.7, p.1302-1311, apr. 1997.

WEIS, L. C. *et al.* Utilização do laser de baixa potência nas clínicas de fisioterapia de Piracicaba, SP. **Fisioter Bras.**, v. 6, p.124-129, 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**, 2. ed., Prentice-Hall: Englewood Cliffs, 1984. 718p.

ZEZELL, D.M. **Curso clínico de laser em odontologia**: apostila de curso FUNDECTO – USP, São Paulo, 2001.

ZHONG, L. *et al.* Effects of quercetin on the morphology and the secretion of VEGF of NB4 leukemia cells in vitro. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, v. 28, n. 1, p. 25-27, 2006.