

# Análise comparativa dos efeitos do mel, do óleo-serina de copaíba e de um produto comercial (fibrinolisa, desoxirribonuclease e cloranfenicol) na cicatrização por segunda intenção, em ratos.

## *Comparative analysis of the effects of honey, copaiba oil-resin and a commercial product (fibrinolysin, deoxyribonuclease and chloramphenicol) on second intention healing, in rats.*

MARIA DE LOURDES PESSOLE BIONDO-SIMÕES, ECBC-PR<sup>1</sup>; LUCÉLIO HENNING JÚNIOR<sup>2</sup>; BRUNO RUSSIANO DE OLIVEIRA BOENO<sup>2</sup>; JULYANA LEONI DO PRADO<sup>2</sup>; LUIZA RODRIGUES DA COSTA<sup>2</sup>; ROGÉRIO RIBEIRO ROBES<sup>3</sup>; SÉRGIO OSSAMU IOSHII<sup>4</sup>

### R E S U M O

**Objetivo:** comparar a cicatrização, por segunda intenção, sob os efeitos da aplicação tópica de mel, óleo-resina de copaíba e um produto comercial (fibrinolisa, desoxirribonuclease e cloranfenicol) a um grupo controle, em ratos. **Métodos:** ressecção de pele, com 1cm de diâmetro, foi realizada no dorso de 40 ratos alocados em quatro grupos de dez animais. Todas as feridas foram limpas, diariamente, com 2ml de solução de NaCl 0,9%. O primeiro grupo (controle - GC) ficou restrito a tal procedimento. Nas feridas do segundo (GM), terceiro (GO) e quarto grupos (GF), após limpeza, aplicou-se, respectivamente, 1ml de mel, 1ml de óleo-resina de copaíba e 1ml de creme contendo fibrinolisa, desoxirribonuclease e cloranfenicol. Ocluíram-se as feridas com gaze estéril. Imediatamente após a incisão e nos dias três, sete e 14 do experimento, as feridas foram copiadas e, usando planimetria, analisou-se a contração. Após a eutanásia, a histologia foi utilizada para avaliação da reação inflamatória e do colágeno nas cicatrizes. **Resultados:** a redução da área da ferida do GM ( $p=0,003$ ), GO ( $p=0,011$ ) e GF ( $p=0,002$ ) foram superiores ao do GC. A quantidade de colágeno tipo I presente no GM e no GO foi superior aos grupos GC e GF ( $p<0,05$ ). Houve predominância do estágio inflamatório crônico no GM ( $p=0,004$ ), GO ( $p<0,001$ ) e GF ( $p=0,003$ ) quando comparados ao GC. **Conclusão:** o uso tópico do mel e do óleo-resina de copaíba aumenta a contração da ferida, a presença de colágeno tipo I e acelera a cicatrização.

**Descritores:** Mel. Copaíba. Cicatrização de feridas. Ratos.

### INTRODUÇÃO

Define-se ferida como a perda anatômica e fisiológica da continuidade da pele<sup>1</sup>. Feridas são responsáveis por aumento da morbimortalidade e, por isso, têm um impacto significativo na saúde pública<sup>2</sup>. No Brasil, há um grande número de pessoas com feridas complexas, incapacitadas de realizar suas atividades diárias, e que não têm acesso aos medicamentos que facilitem o processo de cicatrização. Isso leva à complicações, como: infecções, amputação de membros e dificuldade de reinserção na classe economicamente ativa<sup>3</sup>.

A cicatrização pode ser dividida, didaticamente, em quatro fases: hemostasia,

inflamação, proliferação e remodelação. Essas fases não ocorrem individualmente no tempo, havendo interposição entre elas, com predomínio de uma ou outra a depender do estado fisiológico da ferida<sup>1</sup>. O aumento da velocidade de cicatrização e da qualidade do tecido formado são assuntos de enorme interesse para a comunidade médica, tendo em vista não somente o grande número de ferimentos relacionados à alta morbimortalidade como também aos altos custos relacionados às etapas de estabilização, manutenção e melhoramento desse processo. Nesse contexto, aumenta o interesse por alternativas ao tratamento convencional, com destaque para o uso de produtos naturais, de acesso fácil e baixo custo<sup>1,4</sup>.

1 - Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro de Ciências da Saúde, Curso de Medicina, Departamento de Cirurgia, Curitiba, PR, Brasil. 2 - Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro de Ciências da Saúde, Curso de Medicina, Curitiba, PR, Brasil. 3 - Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro de Ciências Agrárias, Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Curitiba, PR, Brasil. 4 - Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro de Ciências da Saúde, Curso de Medicina, Departamento de Patologia Médica, Curitiba, PR, Brasil.

Ao longo da história, os compostos naturais foram a base dos medicamentos, muitas vezes partindo do conhecimento popular e chegando ao mercado purificados e melhorados. Nesse contexto, o mel é o mais antigo material usado para acelerar o processo de cicatrização conhecido pelo homem<sup>5</sup>, apresentando várias propriedades que o tornam um elemento potencial para formulações de curativos. É capaz de reduzir o edema, a inflamação e a exsudação de uma ferida e aumentar a eficiência do processo de cicatrização<sup>6</sup>.

A solução viscosa, produzida por diversas espécies de abelhas, é composta predominantemente por açúcares (75% a 79%) e água (20%)<sup>6</sup>. Outros componentes são: proteínas (enzimas invertase, catalase e glicose-oxidase), vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina e tiamina), sais minerais (potássio, ferro, magnésio, fósforo, cobre, zinco e cálcio) e antioxidantes. As quantidades desses componentes variam de acordo com a espécie, sazonalidade, flora local e estocagem<sup>7</sup>.

O óleo-resina de copaíba é outro composto que tem mostrado potencial no aprimoramento da cicatrização. É um óleo-resina extraído de árvores do gênero *Copaifera*, que possui mais de 72 espécies. Dentre os destaques, estão suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, antitumorais, antineoplásicas e antinoceptivas<sup>8,9</sup>. Em decorrência dessas propriedades, o mel e o óleo-resina de copaíba são opções em potencial para acelerar o processo de cicatrização a um custo mais acessível do que os medicamentos atuais e com acesso facilitado no território nacional.

Na formulação dos medicamentos disponibilizados no mercado encontra-se a fibrinolisa, uma enzima proteolítica que atua favorecendo o desbridamento enzimático dos tecidos lesados. A esta enzima pode-se ter associada a desoxirribonuclease, enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster na estrutura do DNA. Muitos desses agentes sintéticos

ainda apresentam um antibiótico, sendo mais comum o cloranfenicol e a gentamicina. São vendidos em forma de pomadas, gel ou adesivos para serem aplicados sobre as feridas.

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial para cicatrização por segunda intenção da aplicação tópica do mel e do óleo-resina de copaíba, comparando-os à aplicação de um produto comercial contendo fibrinolisa, desoxirribonuclease e cloranfenicol em feridas cutâneas de ratos.

## MÉTODOS

O presente trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Obedeceu à Lei Federal número 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para uso científico de animais e as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado em 17 de abril de 2018, recebendo os números RO03/2018, 1165 e 1169.

Para o estudo foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da UFPR, com peso médio de  $486 \pm 18,47$  gramas e idade entre 120 e 140 dias. Durante todo o período de estudo, os animais ficaram alojados no Laboratório da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, em caixas de polipropileno próprias para a espécie, com cama de maravalha branca, sendo mantidos três animais por caixa. Manteve-se a temperatura ambiente em  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo claro/escuro de 12 horas e a umidade relativa do ar e o volume de ruído próprios do ambiente. Todas as caixas estavam dispostas em prateleiras à igual distância da fonte de luz. Os animais tiveram livre acesso à ração própria para a espécie e à água. Separou-se a amostra, de forma aleatória, em quatro grupos de dez animais.

A anestesia foi realizada por um médico veterinário, obtida com injeção intramuscular (0,1ml/100g de peso do animal) de uma solução 1:1 de quetamina 10% (50mg) e xilazina 2% (20mg), completada por via inalatória com isoflurano 1% a 1,5% sob máscara associada a oxigênio 100%. Sob anestesia, realizou-se a tricotomia da região dorsal com tricótomo e identificação dos animais. Seguiu-se com a antisepsia realizada com polivinilpirrolidona-iodo e com a delimitação do campo operatório com campo esterilizado fenestrado.

Em seguida, fez-se a demarcação para a confecção de uma lesão circular, com 1cm de diâmetro, na região central do dorso e, utilizando-se uma lâmina de bisturi número 11, produziu-se uma lesão que deixou exposta a fáscia muscular dorsal. Este foi considerado o dia zero do experimento.

Na sequência, foi avaliada a área exata da ferida cirúrgica por meio de um decalque da lesão. Os ratos do grupo controle (GC) tiveram as feridas limpas com 2ml de solução de NaCl 0,9%. Os ratos do grupo mel (GM), após a limpeza, tiveram o leito da ferida coberto por 1ml de mel, os do grupo óleo-resina de copaíba (GO) por 1ml de óleo-resina de copaíba e os do grupo fibrinolisina com desoxirribonuclease e cloranfenicol (GF) por 1ml deste produto. Completou-se o tratamento com a oclusão das feridas com curativo de gaze seca. Fez-se a troca do curativo diariamente.

Nos dias três, sete e 14, voltou-se a aferir a área da ferida por decalque da lesão. A análise das áreas foi realizada com o software MATWORKS® MATrix LABoratory (MatLab) v.R2018a, que forneceu as medidas individuais em milímetros quadrados. A contração da ferida foi definida como sendo a área no dia zero subtraída da área no dia da avaliação.

Após a análise macroscópica, no 14º dia de experimento foi realizada a eutanásia dos animais. Anestesiados segundo o protocolo descrito anteriormente, fez-se injeção intracardíaca de 2ml de solução de cloreto de potássio 19,1%.

Confirmada a morte, ressecou-se um segmento de pele, quadrado, de 3cm de lado, que continha a cicatriz na parte central. O retalho foi estendido sob papel de filtro e submerso em formalina para a fixação e posterior processamento para estudo histopatológico.

Dos blocos de parafina que continham o material, fizeram-se cortes com 4µ de espessura que, montados em lâminas, foram submetidos às colorações: hematoxilina-eosina (HE) e picrosirius (Sirius Supra Red F3BA).

Na coloração HE, por leitura de quatro campos com ampliação de 400x, foi avaliado o processo inflamatório. Para a classificação e quantificação avaliou-se o tipo e a quantidade das células predominantes, infiltrados poli e monomorfonuclear. Utilizou-se como parâmetro: 0= ausência, 1= uma a dez células por campo, 2= 11 a 50 células por campo e 3= 50 ou mais células por campo. Com estes dados foi possível quantificar a reação em: intensa, moderada, discreta e ausente. Quando existia o predomínio de polimorfonucleares a reação era considerada aguda. Quando o predomínio era dos monomorfonucleares a reação era dita crônica e quando não havia predomínio era dita agudo-crônica.

Na análise dos cortes corados pelo picrosirius, as fibras colágenas mais espessas e birrefringentes apresentam coloração vermelho alaranjada (colágeno I), e as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes, apresentam coloração esverdeada (colágeno III). As imagens foram captadas por uma câmera Sony, CCD101. Realizou-se a análise das imagens usando o aplicativo Image-Plus® 4.5 para Windows® da MediaCybernetics. Foram analisados em cada corte seis campos com ampliação de 100x em microscópio óptico com lente de luz polarizada e localizados na linha da cicatriz. Em cada um foi calculado o percentual de área ocupada pelas fibras vermelhas e amarelas (colágeno I) e verdes (colágeno III).

Considerando que os demais tipos de colágeno constituem frações muito pequenas para fins práticos, acatou-se a somatória dos colágenos I e III como sendo o colágeno total da cicatriz.

Para a contração da área da ferida os dados foram analisados estatisticamente considerando a média, mediana, valor mínimo, valor máximo e desvio padrão. Para a comparação dos grupos em relação à área foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, enquanto para a comparação dos momentos de avaliação, dentro de cada grupo, foram utilizados também o teste não paramétrico de Friedman e o teste exato de Fischer. Escolheu-se o nível de significância  $p \leq 0,05$  ou 5% para a rejeição da hipótese de nulidade. Os dados foram analisados pelo programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0 Armonk, NY:IBM Corp.

Para a análise do colágeno, foi utilizado o teste paramétrico ANOVA: fator único. Os grupos foram primeiro analisados ao mesmo tempo,

e depois, de dois em dois. O  $p$  escolhido para rejeição da hipótese nula foi  $p \leq 0,05$  ou 5. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados normais foram comparados entre si com o teste  $t$  e, os não normais, com o teste de Mann-Whitney. Os dados foram analisados pelo programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.0 Armonk, NY:IBM Corp.

## RESULTADOS

Houve o óbito de dois animais do grupo controle por acidente anestésico no dia zero.

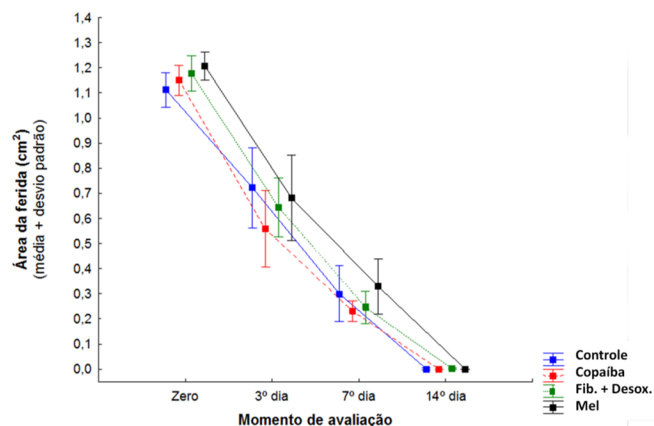
Na avaliação macroscópica das feridas não foram observadas a presença de hemorragia ou secreção purulenta nos quatro grupos, durante todo o período de estudo.

A redução da área da ferida, avaliada por planimetria, nos dias três, sete e 14 não demonstrou diferenças significantes entre os grupos (Tabela 1, Figura 1).

**Tabela 1.** Áreas de lesão nos quatro grupos e nos três tempos estudados.

Variável/Grupo	Áreas da ferida (cm <sup>2</sup> )						Valor de p*
	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
3 <sup>o</sup> dia							0,187
Controle	8	0,722	0,669	0,566	1,011	0,161	
Copaíba	10	0,558	0,52	0,366	0,783	0,153	
Fib.+Desox.+Clor.	10	0,644	0,628	0,481	0,814	0,118	
Mel	10	0,681	0,628	0,478	0,983	0,17	
7 <sup>o</sup> dia							0,051
Controle	8	0,3	0,272	0,181	0,484	0,111	
Copaíba	10	0,231	0,245	0,165	0,293	0,041	
Fibrase	10	0,245	0,249	0,16	0,385	0,065	
Mel	10	0,329	0,281	0,211	0,593	0,11	
14 <sup>o</sup> dia							0,289
Controle	8	0,002	0	0	0,012	0,004	
Copaíba	10	0	0	0	0	0	
Fib.+Desox.+Clor.	10	0,002	0	0	0,009	0,004	
Mel	10	0	0	0	0	0	

\* Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; Fib.+Desox.+Clor.= fibrinolísina com desoxirribonuclease e cloranfenicol.



**Figura 1.** Demonstração gráfica da contração das feridas.

Entretanto, quando se comparam os resultados das contrações das feridas analisando os grupos dois a dois entre o dia zero e o dia sete, as feridas tratadas com óleo de copaíba eram menores do que as do controle ( $p=0,008$ ). O mesmo aconteceu com as tratadas com mel ( $p=0,45$ ) e as tratadas com fibrinolissina com desoxirribonuclease e cloranfenicol em relação ao controle ( $p=0,001$ ) (Tabela 2).

A contração da ferida, do dia zero ao dia 14, foi mais expressiva no grupo tratado com mel ( $p=0,003$ ) quando comparada ao controle. Redução significativa também foi verificada no grupo tratado com óleo de copaíba ( $p=0,011$ ).

O grupo tratado com fibrinolissina com desoxirribonuclease e cloranfenicol não mostrou diferença significativa em relação ao controle ( $p=0,062$ ) (Tabela 2).

No 14º dia, estavam reepitelizadas sete das oito feridas do GC (controle), oito das dez feridas do GF (fibrinolissina com desoxirribonuclease e cloranfenicol), todas as do GO (copaíba) e todas do GM (mel) ( $p>0,05$ ). A figura 2 traz exemplos do fechamento das lesões.

A reação inflamatória, presente nos quatro grupos, era de intensidade mínima. Houve predomínio de feridas em estágio inflamatório crônico no GM, GO e GF quando comparado com o grupo controle ( $p=0,004$ ,  $p<0,001$  e  $p=0,003$ , respectivamente). Não houve diferença entre os grupos GO, GM e GF ( $p=0,074$ ).

Na avaliação quantitativa do colágeno, quando se analisou a área do corte histológico representada por colágeno, comparados os quatro grupos, embora se tenha verificado uma média maior no grupo controle e no grupo que utilizou fibrinolissina com desoxirribonuclease e cloranfenicol, a diferença não foi significativa em relação aos demais grupos (ANOVA  $p=0,612$ ) (Tabela 3, Figura 3).

**Tabela 2.** Análise da redução da área de lesão comparados os grupos dois a dois.

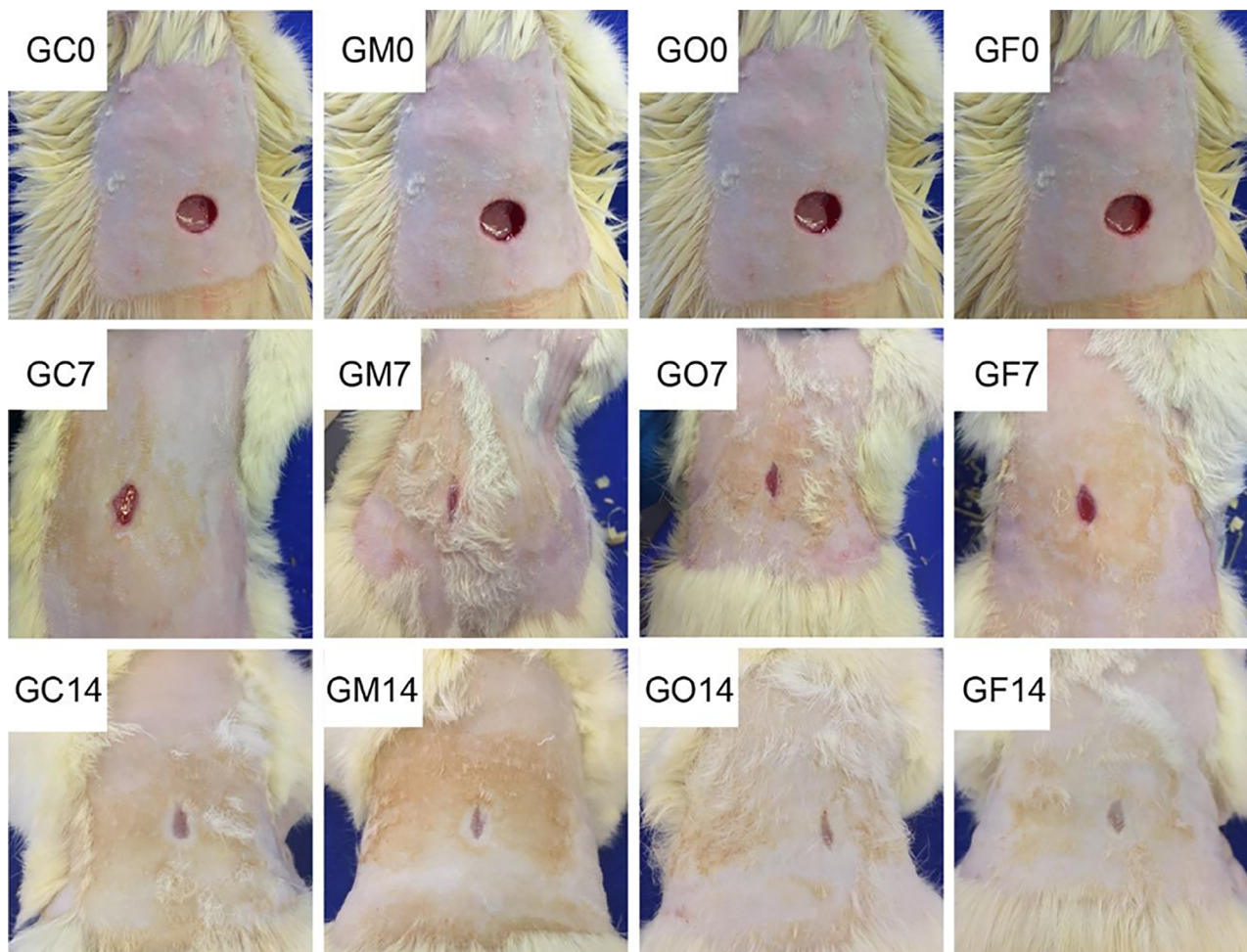
Grupos comparados	Valores de p	
	Redução (7º - zero)	Redução (14º - zero)
Controle x Copaíba	0,008	0,011
Controle x Fib.+Desox.+Clor.	0,001	0,062
Controle x Mel	0,045	0,003
Copaíba x Fib.+Desox.+Clor.	0,0479	0,002
Mel x Fib.+Desox.+Clor.	0,164	0,151

Fib.+Desox.+Clor.= fibrinolissina com desoxirribonuclease e cloranfenicol.

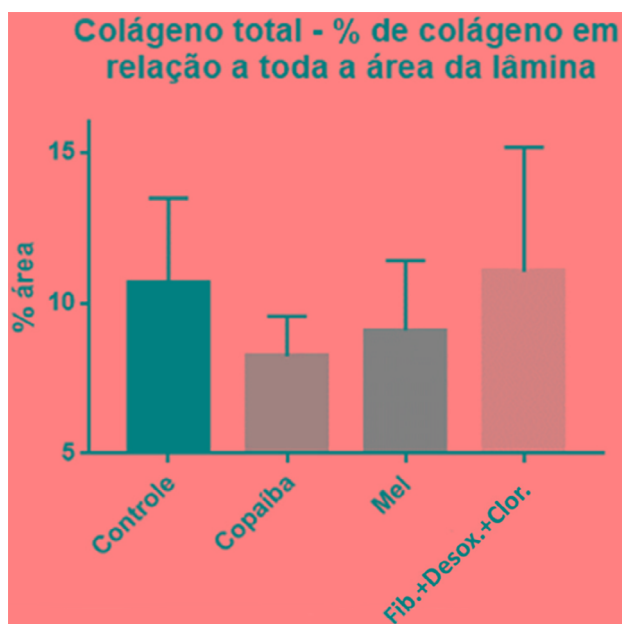
**Tabela 3.** Médias dos percentuais de área dos cortes histológicos representados por colágeno.

Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
% área	Controle	8	10,2	10,5	6,9	13,9	2,2
	Fib.+Desox.+Clor.	10	10,4	10,0	7,4	13,7	2,8
	Mel	10	11,0	10,7	9,0	13,9	1,5
	Copaíba	10	9,8	9,6	8,7	11,1	0,9

Análise da variância (ANOVA) com um fator e o teste post-hoc LSD (least significant difference);  $p=0,612$ ; Fib.+Desox.+Clor.= fibrinolissina com desoxirribonuclease e cloranfenicol.



**Figura 2.** Evolução macroscópica da cicatrização das feridas. GC= grupo controle, GM= grupo mel, GO= grupo óleo-resina de copaíba e GF= Grupo desoxirribonuclease + cloranfenicol; 0= momento zero; 7= momento sete dias, e 14= momento 14 dias.



**Figura 3.** Média do percentual da área dos cortes histológicos ocupada por colágeno em cada grupo.

Na avaliação qualitativa do colágeno tipo I verificou-se que os grupos que utilizaram mel e óleo de copaíba alcançaram maiores valores quando comparados aos grupos tratados com fibrinolisa com desoxirribonuclease e cloranfenicol e controle ( $p < 0,001$ ) (Tabela 4, Figura 4). Na comparação dois a dois verificou-se que as feridas tratadas com óleo de copaíba mostravam mais colágeno do tipo I do que as do grupo controle ( $p = 0,0475$ ), o mesmo aconteceu com as tratadas com mel em relação ao controle ( $p = 0,0031$ ). A comparação do óleo de copaíba em relação ao fibrinolisa com desoxirribonuclease e cloranfenicol foi superior ( $p = 0,0423$ ). O mesmo se deu com o uso do mel ( $p = 0,0299$ ) (Tabela 5). A figura 5 traz imagens da marcação do colágeno.

**Tabela 4.** Média dos percentuais de colágeno I em relação ao colágeno total.

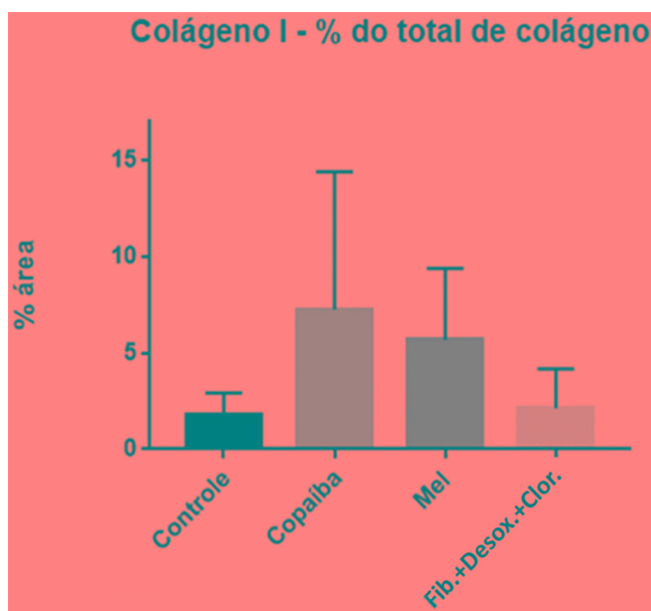
Variável	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
% col. I	Controle	8	13,4	13,8	10,1	15,8	1,9
	Fib.+Desox.+Clor.	10	13,6	14,0	11,0	15,6	1,7
	Mel	10	16,6	16,5	13,0	18,5	1,6
	Copaíba	10	16,4	16,1	14,9	18,4	1,2

Análise da variância (ANOVA) com um fator e o teste post-hoc LSD (least significant difference);  $p < 0,001$ ; col. I = colágeno I; Fib.+Desox.+Clor. = fibrinolisina com desoxirribonuclease e cloranfenicol.

**Tabela 5.** Comparação da média de colágeno I em relação ao colágeno total, comparando os grupos dois a dois.

Comparação	Valor de p
Controle x Copaíba	0,0475
Controle x Mel	0,0031
Controle x Fib.+Desox.+Clor.	0,6494
Copaíba x Mel	0,9886
Copaíba x Fib.+Desox.+Clor.	0,0423
Mel x Fib.+Desox.+Clor.	0,0288

Teste t para dados normais e teste de Mann-Whitney para dados não normais; Fib.+Desox.+Clor. = fibrinolisina com desoxirribonuclease e cloranfenicol.

**Figura 4.** Demonstração gráfica da média da área de colágeno representada por colágeno tipo I em cada grupo.

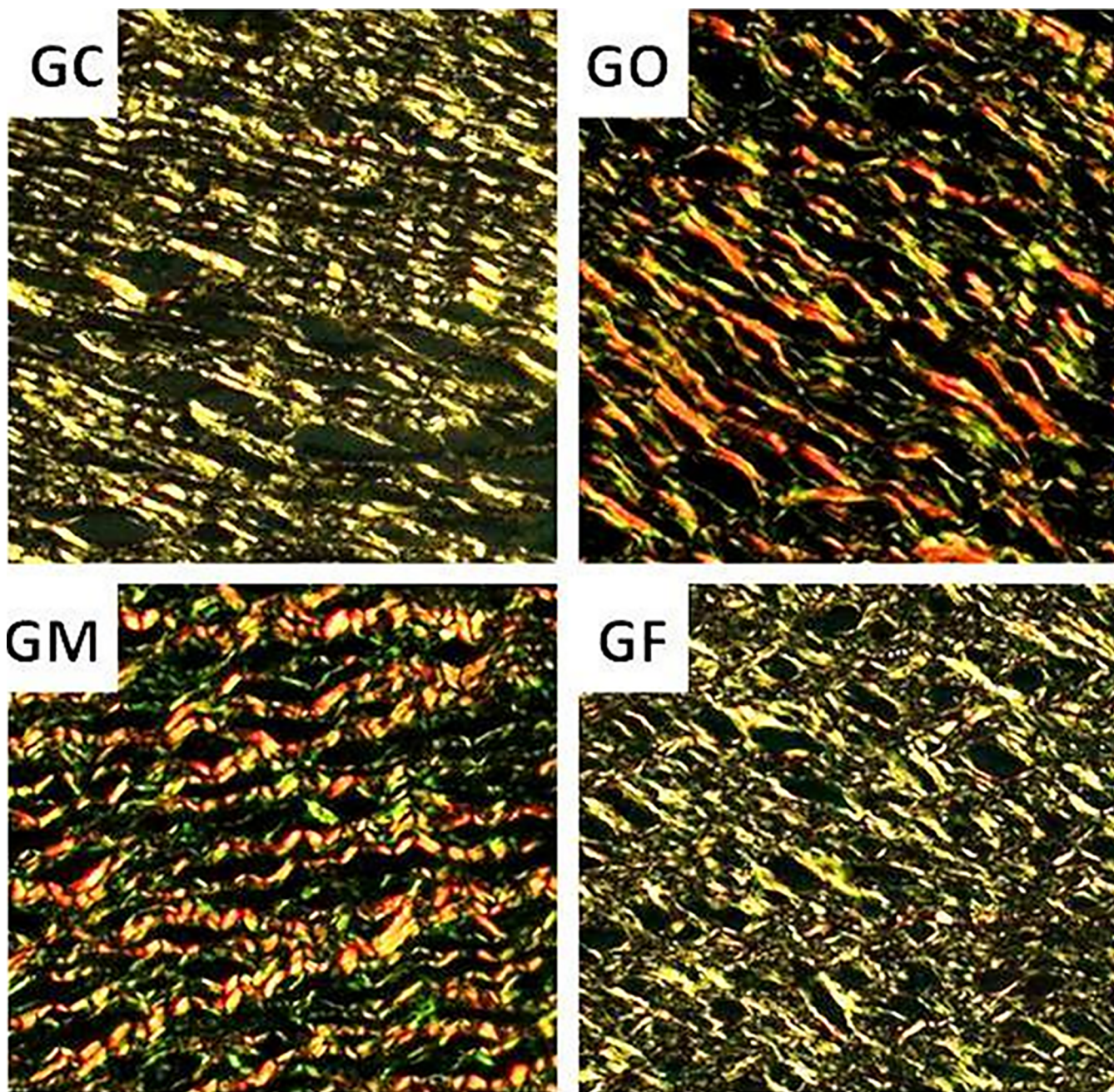
## DISCUSSÃO

A epitelização completa das feridas se deu ao final do tempo de estudo em 35 das 38 lesões acompanhadas. Entretanto, a velocidade com que o processo acontece e a qualidade da cicatriz formada

são de grande interesse. O presente estudo avaliou a influência de diferentes tratamentos por meio da quantificação da contração da área da ferida, da reação inflamatória e da quantidade e qualidade de colágeno ao final do processo cicatricial.

A indústria farmacêutica está sempre desenvolvendo ou aprimorando produtos para auxiliar na cicatrização. Como exemplo, tem-se o fármaco utilizado neste estudo, composto por fibrinolisina, desoxirribonuclease e cloranfenicol. A enzima fibrinolisina e a desoxirribonuclease atuam favorecendo o debridamento enzimático do exsudato presente nos tecidos lesados, acelerando a remoção das células agredidas e não viáveis. O cloranfenicol possui ação bactericida e bacteriostática, limitando a colonização bacteriana no leito da ferida. Desta forma, a associação dos compostos permite que a cicatrização ocorra de maneira acelerada, com menos colonização bacteriana e, por conseguinte, com menos inflamação, promovendo a granulação e a epitelização mais precoces. Entretanto, existem controvérsias quanto à capacidade que esse composto tem de reparar a ferida e seu custo<sup>8</sup>.

A utilização de produtos naturais na cicatrização é uma prática com registros desde a pré-história. O mel é um dos compostos mais antigos usados para acelerar o processo de cicatrização conhecido pelo homem. É citado no Papiro de Edwin Smith, por volta do Século XX a.C.<sup>10</sup>. Além disso, suas propriedades já foram estudadas em inúmeros trabalhos que evidenciaram sua capacidade de acelerar o processo de cicatrização e de melhorar a qualidade da cicatriz formada<sup>7,11-13</sup>.



**Figura 5.** Fotomicrografias de cortes histológicos corados pelo picosirius (Sirius supra red F3BA), luz polarizada, 100x. Colágeno tipo I= fibras coradas em tons do amarelo ao vermelho; Colágeno tipo III= fibras coradas em tons de verde.

O óleo-resina de copaíba também possui uso muito antigo, sendo a primeira citação conhecida em uma carta do Petrus Martius para o Papa Leão X, em 1534, que relatava uma droga utilizada pelos índios chamada de "Copei"<sup>10</sup>. Assim como o mel, a capacidade do óleo-resina de copaíba de melhorar o processo de cicatrização também é conhecido<sup>8</sup>.

Considerando que tanto o mel quanto o óleo-resina de copaíba são produtos naturais, disponíveis em praticamente todo o território nacional, sua utilização poderia ser mais acessível à população carente.

O aumento de velocidade de contração nos sete primeiros dias do estudo, observados nos três grupos tratados, quando comparados ao controle,



demonstra que a utilização dos compostos é mais efetiva no início do processo cicatricial. Outros estudos já concluíram essa maior eficiência, porém verificaram velocidade maior no final do processo de cicatrização, ao contrário deste trabalho<sup>8</sup>.

Tais incrementos de velocidades podem ser explicados por características comuns aos elementos estudados: os três compostos comparados ao controle possuem atividade antibacteriana direta, se não bactericida, no mínimo bacteriostático. A dificuldade de infecção, promovida por meio não imunológico facilita a reepitelização, uma vez que permite um cenário mais próximo do ideal para o processo cicatricial<sup>14,15</sup>.

Tanto o mel quanto o óleo-resina de copaíba possuem capacidade de favorecer a angiogênese<sup>11,16</sup>, o que facilita o aporte de oxigênio ao leito da ferida, a chegada de células inflamatórias e o estabelecimento do tecido de granulação de maneira precoce. Além disso, ambos os compostos exibem atividades anti-inflamatórias diretas, já determinadas<sup>5,9</sup>.

Neste estudo, a reação inflamatória foi mínima. No GM, GO e GF, entretanto, estava em fase crônica (predomínio de monomorfonucleares), sugerindo que foram capazes de modular o padrão de resposta inflamatória no leito da cicatriz, alcançando estágios mais avançados em um menor período de tempo, quando comparados com o grupo controle. O mesmo padrão inflamatório foi mostrado em outros trabalhos<sup>17,18</sup>. Ao aumentar a capacidade de contração no leito da ferida, e, ao mesmo tempo, melhorar o padrão inflamatório, os compostos fornecem um ambiente mais propício para a maturação dos elementos da cicatriz, como o colágeno.

Dessa forma, observou-se ainda uma maior quantidade de fibras colágenas do tipo I no GM e GO em relação aos outros grupos, sendo esses dados já presentes na literatura<sup>7,8</sup>. Assim, pode-se inferir, ainda, que o mel e o óleo-resina de copaíba induzem à proliferação de fibroblastos e à formação de matriz extracelular.

Sendo o colágeno do tipo I mais resistente, uma maior concentração deste indica uma ferida com melhor qualidade, quando comparada às dos grupos GF e GC.

Além disso, para o grupo tratado com óleo-resina de copaíba, observou-se uma menor quantidade total de colágeno no leito da ferida. Uma vez que o óleo-resina de copaíba é capaz de aumentar a atividade da metaloproteinase tipo 2<sup>18</sup>, uma enzima responsável pela fase de remodelamento e homeostase do colágeno, acredita-se que a aplicação tópica do óleo-resina propicia o acontecimento mais precoce de fases mais tardias da cicatrização.

Uma grande vantagem do mel e do óleo-resina de copaíba em relação ao produto comercial é seu acesso facilitado. Neste estudo, utilizou-se produtos comercializados, vendidos no varejo comum. O produto comercial é vendido apenas em drogarias e necessitam de receita médica, o que dificulta a sua utilização para populações com baixo acesso a serviços médicos. Além disso, ambos, mel e óleo-resina de copaíba, chegam a custar 60 vezes menos do que o produto comercial, a depender do local do país onde são comprados. A utilização destes produtos naturais torna o tratamento mais barato, mais acessível, aumentando a adesão do paciente, em especial no caso de pequenos ferimentos que não receberiam nenhum tipo de assistência médica, mas estão sujeitos às mesmas complicações que outros.

Portanto, há evidências para afirmar que o mel e o óleo-resina de copaíba são tão efetivos quanto o produto comercial para o tratamento de feridas, com a vantagem de formar uma cicatriz de melhor qualidade, ter maior acessibilidade e custo de tratamento reduzido. Entretanto, não houve diferença significativa na ação dos compostos mel e óleo-resina de copaíba quando comparados entre si. Outros estudos ainda são necessários para comparar o desempenho dos diversos tipos de mel e óleo-resina de copaíba e evidenciar seus mecanismos de ação e, assim, fornecer as evidências para sua recomendação clínica.

## ABSTRACT

**Objective:** to compare the healing by second intention under the effects of topical application of honey, copaiba oil-resin and a commercial product (fibrinolysin, deoxyribonuclease and chloramphenicol) with a control group in rats. **Methods:** we carried out a skin resection, 1 cm in diameter, on the back of 40 rats allocated to four groups of ten animals. All wounds were cleaned daily with 2ml of 0.9% NaCl solution. The first group (control - GC) was restricted to such procedure. In the wounds of the second (GM), third (GO) and fourth groups (GF), after cleaning, we respectively applied 1ml of honey, 1ml of copaiba oil-resin and 1ml of cream containing fibrinolysin, deoxyribonuclease and chloramphenicol. The wounds were occluded with sterile gauze. Immediately after the incision and on days three, seven and 14 of the experiment, the wounds were copied and contraction was analyzed using planimetry. After euthanasia, we histologically evaluated the inflammatory reaction and collagen in the scars. **Results:** the reduction of the wound area of GM ( $p=0.003$ ), GO ( $p=0.011$ ) and GF ( $p=0.002$ ) were higher than the GC. The amount of type-I collagen present in GM and GO was higher than in GC and GF groups ( $p<0.05$ ). There was a predominance of chronic inflammatory stage in GM ( $p=0.004$ ), GO ( $p<0.001$ ) and GF ( $p=0.003$ ) when compared with GC. **Conclusion:** the topical use of honey and copaiba oil-resin increases wound contraction, the presence of type-I collagen and accelerates healing.

**Keywords:** Honey. Copaiba. Wound healing. Rats.

## REFERÊNCIAS

- Morton LM, Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74(4):589-605.
- Drew P, Posnett J, Rusling L; Wound Care Audit Team. The cost of wound care for a local population in England. *Int Wound J.* 2007;4(2):149-55.
- Jeffcoate WJ, Harding KG. Diabetic foot ulcers. *Lancet.* 2003;361(9368):1545-51.
- Lam TK, Lowe C, Johnson R, Marquart JD. Secondary intention healing and purse-string closures. *Dermatol Surg.* 2015;41 Suppl 10:S178-86.
- Saikaly SK, Khachemoune A. Honey and wound healing: an update. *Am J Clin Dermatol.* 2017;18(2):237-51.
- Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(6):731-42.
- Alves DFS, Cabral Júnior FC, Cabral PPAC, Oliveira Junior RM, Rego ACM, Medeiros AC. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. *Rev Col Bras Cir.* 2008;35(3):188-93.
- Collaço LM, Scapini JG, Collaço LM, Matsubara A, Veiga Júnior VF. Comparative analysis of the effects of *Copaifera multijuga* oil-resin and nitrofurazona in the cutaneous wound healing process. *Rev Col Bras Cir.* 2016;43(6):445-51.
- Gomes Nde M, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Pinto Ada C, Fernandes PD. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. *J Ethnopharmacol.* 2010;128(1):177-83.
- Veiga Junior VF, Pinto AC. O gênero *copaifera* L. genus. *Quím Nova.* 2002;25(2):273-86.
- Goharshenasan P, Amini S, Atria A, Abtahi H, Khorasani G. Topical application of honey on surgical wounds: a randomized clinical trial. *Forsch Komplementmed.* 2016;23(1):12-5.
- Javadi SMR, Hashemi M, Mohammadi Y, MamMohammadi A, Sharifi A, Makarchian HE. Synergistic effect of honey and *Nigella sativa* on wound healing in rats. *Acta Cir Bras.* 2018;33(6):518-23.
- Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi AA. Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *Scientific World J.* 2011;11:766-87.
- Simões CA, Conde NC, Venâncio GN, Milério PS, Bandeira MF, da Veiga Júnior VF. Antibacterial activity of copaiba oil gel on dental biofilm. *Open Dent J.* 2016;10:188-95.
- Mandal MD, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011;1(2):154-60.
- Estevão LRM, Medeiros JP, Scognamillo-Szabó MVR, Baratella-Evênciuo L, Guimarães EC, Câmara CAG, et al. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. *Pesq Agropec Bras.* 2009;44(4):406-12.

17. Estevão LRM, Medeiros JP, Baratella-Evêncio L, Simões RS, Mendonça FS, Evêncio-Neto J. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. *Acta Cir Bras.* 2013;28(12):863-9.
18. Masson-Meyer D, Enwemeka CS, Bumah V, Andrade T, Frade MA. Topical treatment with *Copaifera langsdorffii* oleoresin improves wound healing in rats. *Int J Phytomedicine.* 2013;5(3):378-86.

Recebido em: 21/05/2019

Aceito para publicação em: 10/08/2019

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

**Endereço para correspondência:**

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões

E-mail: malubiondo@gmail.com

