



Universidade Federal de Sergipe

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO USO DE CARVACROL ASSOCIADO À
FOTOBIMODULAÇÃO A LASER NA REAÇÃO TECIDUAL**

Aracaju-SE

Julho/2018

ISMÁRIO SILVA DE MENESES

**AVALIAÇÃO DO USO DE CARVACROL ASSOCIADO À
FOTOBIMODULAÇÃO A LASER NA REAÇÃO TECIDUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro

Aracaju-SE
Julho/2018

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Meneses, Ismário Silva de

M543a Avaliação do uso de carvacrol associado à fotobiomodulação a laser na reação tecidual / Ismário Silva de Meneses ; orientadora Maria Amália Gonzaga Ribeiro. – Aracaju, 2018.

57 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Materiais Biocompatíveis. 2. Cicatrização. 3. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. I. Ribeiro, Maria Amália Gonzaga, orient. II. Título

CDU 616.314



Universidade Federal de Sergipe

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Sergipe, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ___/___/_____

Orientadora: Prof.a Dr.a Maria Amália Gonzaga Ribeiro

1º Examinador: Prof. Dr. Luiz Alves de Oliveira Neto

2º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

PARECER

AGRADECIMENTOS

Mais um sonho está prestes a se realizar, fruto de um desejo humano e da aprovação de um Deus maravilhoso. Sem dúvidas, um período de muitas trocas, dúvidas, perdas, aprendizados e ao final, a tão esperada recompensa.

Ao **Deus** da minha vida, que mais uma vez demonstrou que “aquele que iniciou a boa obra é fiel para aperfeiçoá-la” (Filipenses 1:6), o teu amor e cuidado chega a me constranger.

A minha filha querida, amada e desejada, para você pequena **Mariana** todos os esforços para me tornar um homem íntegro e um profissional cada vez melhor.

Aos meus pais, **Gilmar** e **Josivalda**, o meu muito obrigado por tudo que fizeram.

Aos meus irmãos **Isauro**, **Itamar**, **Ingrid** e **João Victor**, acreditem em seus sonhos, é possível, se eu consegui, vocês também podem.

A **Adriana** “sortuda”, agradeço a compreensão das diversas faltas e a disposição para ajudar. Estendo a minha gratidão a sua família, minha sogra querida, **Susana** e as suas irmãs, **Sueli**, **Silvana** e **Silvinha**, obrigado por toda torcida e ajuda.

À minha orientadora **Prof.^a Amália**, detentora de um conhecimento impa, que vai além da odontologia clínica, uma pesquisadora e facilitadora do conhecimento por amor e respeito a ciência, mulher sonhadora, guerreira e generosa, um exemplo de serenidade. Admiração e gratidão definem bem o que sinto pela senhora.

Ao querido **Prof. Ricardo Albuquerque**, com quem tenho o prazer de aprender desde a graduação, quando tive a honra de compor o seu grupo seletivo de alunos de iniciação científica, obrigado pela oportunidade e confiança depositada em mim. Meu orientador na graduação e um brilhante co-orientador voluntário nesse projeto. Agradeço pela disponibilidade, atenção e gentileza de sempre e por contribuir na minha formação como docente e pesquisador.

A toda equipe do **Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE)** do Instituto de Tecnologia e Pesquisa da UNIT, em especial Felipe Mendes e John Lenon, pela contribuição durante a execução da pesquisa.

Aos professores membros da banca de qualificação deste projeto, a **Prof.a Dra. Rose Nely Pereira Filho**, a **Profa. Dra. Giuliana Panfiglio Soares** e ao **Prof. Dr. Luiz Alves de Oliveira Neto** pelas sugestões pertinentes e críticas construtivas que engrandeceram este trabalho.

A todos os excelentes professores do **Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PRODONTO)** da Universidade Federal de Sergipe e a Maíra Santos (secretaria do programa), pela gentil atenção de sempre.

Às auxiliares, acadêmicos e pacientes do Departamento de Odontologia que estiveram comigo nessa jornada, agradeço de coração por tudo o que vocês ofereceram para mim.

Aos colegas de turma e de forma especial (*in memoriam*), a Denis, colega que infelizmente não teve a oportunidade de concluir esse sonho, nos deixando precocemente.

À **Universidade Federal de Sergipe**, seu corpo docente, direção e administração.

A todos os colegas de trabalho, do hospital Cirurgia e do Hospital Primavera, de forma especial ao Dr. José Augusto pelo incentivo, motivação e compreensão desde o início desse propósito.

“O homem de muitos amigos deve mostrar-se amigável, mas há um amigo mais chegado do que um irmão” (Provérbios 18:24), obrigado meu amigo irmão Fabio Jr.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução desta pesquisa. Muito obrigado!

“Do crente ao ateu, ninguém explica Deus”.

Música: Ninguém explica a Deus; Interprete: Preto no Branco; Compositor: Clóvis Pinho

RESUMO

O processo de reparo de feridas é um fenômeno fundamental e que abrange aspectos de proliferação celular, diferenciação celular e apresenta complexidade biológica e bioquímica, seu início ocorre logo após a injúria. Para otimizar esse processo, é possível encontrar na literatura trabalhos que comprovam a eficácia do uso de biomateriais, destacando para esse fim o carvacrol, um biomaterial do tipo monoterpene fenólico presente no óleo essencial de plantas medicinais do gênero *Origanum* e *Thymus* (Lamiaceae) e a fotobiomodulação a laser. Este estudo objetivou analisar a reação tecidual com a inclusão de tubos de polietileno utilizando pasta de carvacrol associada ou não à fotobiomodulação a laser (FBML) de $\lambda 660\text{nm}$ em subcutâneo do dorso de ratos da linhagem *Wistar*. Para tanto, 60 animais foram divididos em quatro grupos (n=15) e receberam as seguintes intervenções: implantação de tubos vazios (CTR); implantação de tubos contendo pasta de carvacrol (CVC); implantação de tubos vazios e fotobiomodulação a laser (LLLT); implantação de tubos contendo pasta de carvacrol e fotobiomodulação a laser (CVCLT) e avaliados nos períodos de 03, 08 e 15 dias. Após a eutanásia dos animais nos seus respectivos períodos de avaliação, as peças cirúrgicas foram removidas e submetidas à análise histológica para avaliação da reação inflamatória e fibroplasia nas colorações HE e Picrosirius Red, respectivamente. Na avaliação do processo inflamatório no período de 3 dias, o grupo CVCLT exibiu menor infiltrado inflamatório em relação aos demais grupos ($p < 0,01$). Já no período de 8 e 15 dias, os grupos LLLT e CVCLT apresentaram menor quantidade de infiltrado inflamatório linfocitário em relação aos demais grupos, ($p < 0,01$ e $p < 0,05$). Quanto a avaliação do colágeno dos tipos I e III, não se observou diferença significativa entre os grupos no período de 3 dias. No período de 8 dias, houve diferença no grupo CVC em relação aos demais grupos quanto a avaliação do colágeno do tipo III ($p < 0,001$). E no período de 15 dias as únicas diferenças significativas observada foi entre o grupo CVCLT em relação aos grupos CTR e LLLT na avaliação do colágeno do tipo I ($p < 0,05$). A utilização da pasta de carvacrol associado a fotobiomodulação a laser demonstrou otimizar o período inflamatório da reação tecidual.

Palavras-Chave: Materiais Biocompatíveis; Cicatrização; Terapia com Luz de Baixa Intensidade.

ABSTRACT

The process of wound repair is a fundamental phenomenon and covers aspects of cell proliferation, cell differentiation and presents biological and biochemical complexity, its onset occurs soon after the injury. In order to optimize this process, it is possible to find in the literature studies that prove the effectiveness of the use of biomaterials, highlighting for this purpose the biomaterial carvacrol, a phenolic monoterpene present in the essential oil of medicinal plants of the genus *Origanum* and *Thymus* (Lamiaceae) and the photobiomodulation a laser. This study aimed to analyze the tissue reaction with the inclusion of polyethylene tubes using carvacrol pulp associated or not with laser photobiomodulation (FBML) of $\lambda 660\text{nm}$ subcutaneously from the dorsum of Wistar rats. For this purpose, 60 animals were divided into four groups and received the following interventions: empty tube implantation (CTR); implantation of tubes containing carvacrol paste (CVC); implantation of empty tubes and laser photobiomodulation (LLLT); implantation of tubes containing carvacrol paste and laser photobiomodulation (CVCLT) and evaluated in the periods of 03, 08 and 15 days. After the euthanasia of the animals in their respective evaluation periods, the surgical specimens were removed and submitted to histological analysis for evaluation of the inflammatory reaction and fibroplasia in HE and Picrosirius Red stains, respectively. In the evaluation of the inflammatory process in the 3-day period, the CVCLT group had lower inflammatory infiltration in relation to the other groups ($p < 0.01$). In the 8 and 15 days period, the LLLT and CVCLT groups presented less inflammatory lymphocytic infiltration than the other groups ($p < 0.01$ and $p < 0.05$). Regarding the evaluation of types I and III collagen, no significant difference was observed between the groups in the 3 day period. In the 8-day period, there was difference in the CVC group in relation to the other groups regarding the evaluation of type III collagen ($p < 0.001$). And in the 15-day period, the only significant difference was observed between the CVCLT group in relation to the CTR and LLLT groups in the evaluation of type I collagen ($p < 0.05$). The use of the carvacrol paste associated with laser photobiomodulation has been shown to optimize the inflammatory period of the tissue reaction.

Key words: Biocompatible Materials; Wound Healing; Low-Level Light Therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO DA LITERATURA	3
1.1.1 Feridas	3
1.1.2 Resposta inflamatória	3
1.1.3 Reparação tecidual	4
1.1.4 Carvacrol	4
1.1.5 Laser	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivo específico	7
3. METODOLOGIA	8
3.1 Desenho do estudo	8
3.2 Considerações éticas	8
3.3 Amostra	8
3.4 Distribuição dos grupos	9
3.5 Preparo dos tubos de polietileno	10
3.6 Preparo da pasta de carvacrol	10
3.7 Procedimento cirúrgico	10
3.8 Fotobiomodulação a laser	11
3.9 Eutanásia e obtenção das peças anatômicas	12
3.10 Processamento histológico	13
3.10.1 Avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório	13
3.10.2 Avaliação do reparo por meio do colágeno I colágeno III	14
3.11 Análise estatística	14
4. RESULTADOS - ARTIGO	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
6. COMUNICADO DE IMPRENSA	39
7. REFERÊNCIAS	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Distribuição dos animais segundo grupo e tempo experimental.

Figura A: ilustração da região anatômica e posição tubo de polietileno.

Quadro 2. Parâmetros de irradiação para os grupos LLLT e CVCLT.

Quadro 3. Escores histopatológicos para análise do perfil evolutivo morfológico do processo de reparo cicatricial cutâneo.

Figura 1. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE dos diferentes grupos experimentais representativas do terceiro dia de implantação dos tubos de polietileno (tb).

Figura 2. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE dos diferentes grupos experimentais representativas do oitavo dia de implantação dos tubos de polietileno (tb).

Figura 3. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE dos diferentes grupos experimentais representativas do décimo quinto dia de implantação dos tubos de polietileno (tb).

Figura 4. Distribuição do processo inflamatório (leucócitos) por área de avaliação, de todos os grupos experimentais ao longo dos três períodos de avaliação.

Figura 5. Distribuição do processo inflamatório (leucócitos) por área de avaliação, de todos os grupos experimentais ao longo dos três períodos de avaliação.

Figura 6. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em Pricocirius Red dos diferentes grupos experimentais representativas do terceiro dia de implantação dos tubos de polietileno (T-PLE.).

Figura 7. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em Pricocirius Red dos diferentes grupos experimentais representativas do oitavo dia de implantação dos tubos de polietileno (T-PLE.).

Figura 8. Fotomicrografias de secções histológicas coradas em Pricocirius Red dos diferentes grupos experimentais representativas do décimo quinto dia de implantação dos tubos de polietileno (T-PLE.).

Figura 9. Índice percentual médio da disposição de colágenos do tipo I e III na reparação tecidual de subcutâneo de ratos, avaliados através da coloração (Procisirius Red - luz polarizada, ampliação de 400x) ao longo dos três (A e B), oito (C e D) e 15 dias experimentais (E e F).

LISTA DE ABREVIATURAS

FBML – Fotobiomodulação a Laser.

LLLT - *low-level laser therapy*.

WHS - *Wound Healing Society*.

NO - Óxido nítrico.

HNE - Elastase Neutrófilo Humana.

COX - Cicloxigenase.

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa.

LeFT - Laboratório de ensaios Farmacêuticos e Toxicidade.

LMPE - Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental.

CTR - Grupo experimental controle.

CVC - Grupo experimental carvacrol isoladamente.

LLLT - Grupo experimental fotobiomodulação a laser isoladamente.

CVCLT - Grupo experimental carvacrol associado a fotobiomodulação a laser.

T-PLE - Tubos de polietileno.

1. INTRODUÇÃO

O processo de inflamação é caracterizado pela produção de uma cascata de mediadores que regulam importantes fatores da resposta inflamatória, como o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de células de defesas a exemplo dos leucócitos (Velnar *et al.*, 2009). Uma vez liberados, tais mediadores inflamatórios podem ativar ou sensibilizar os nociceptores adjacentes ao tecido lesionado, resultando em sensação de dor (Andrade *et al.*, 2012).

O uso de materiais biocompatíveis na Medicina tem relação com suas propriedades e aplicações para utilização em contato com sistemas biológicos. Estes são chamados de biomateriais, um campo estável e com forte crescimento, que agrega aspectos tecnológicos da Medicina, Biologia, Química e Ciência dos materiais em conjunto com os princípios da Engenharia, para exercer funções diversas em contato íntimo com um organismo (William, 1987; Ratner *et al.*, 2004). A utilização destes frente ao processo cicatricial, tem sido bastante pesquisada, com o objetivo de modular ou acelerar o processo de reparo tecidual, este grupo de biomateriais, se apresentam de várias formas, tais como: folhas, esponjas, dispersões, géis, filmes, soluções injetáveis, sendo cada tipo adequado de acordo com suas propriedades e características (Pires *et al.*, 2015).

Dentre os biomateriais de origem natural, destacam-se os substratos de plantas medicinais, produtos naturais conhecidos por serem uma fonte significativa de novas substâncias químicas com potenciais efeitos terapêuticos (Calixto, 2005). Entre os produtos naturais, o uso de óleos essenciais tem-se demonstrado uma opção promissora devido à comprovada ação terapêutica e por ser também comumente adicionado em alimentos para obter um sabor específico (Ipek *et al.*, 2005). Um óleo essencial é internacionalmente definido como um produto obtido por meio de hidrodestilação. Neste contexto, pode-se incluir o carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), um fenol monoterpênico presente em óleos essenciais de numerosas plantas aromáticas pertencentes à família Lamiaceae; muito utilizada na indústria alimentar. Em relação as propriedades biológicas do carvacrol, já foram demonstrados diversos efeitos tais como antimicrobiano (Klein *et al.*, 2013), antioxidante (Yanishlieva *et al.*, 1999; Beena *et al.*, 2013), antinociceptiva (Melo *et al.*, 2012) e anti-inflamatório (Landa *et al.*, 2009).

Outro recurso já consagrado e bastante utilizado para estimular o reparo tecidual é o laser de baixa energia, a fotobiomodulação a laser, o qual possui ação analgésica, anti-inflamatória, antiedematosa, auxiliando o processo de reparo tecidual. A interação deste com os tecidos biológicos depende do comprimento de onda, da densidade de energia e da potência

do laser. Dentre os mecanismos envolvidos na atuação da terapia a laser, destacam-se: aumento da microcirculação local, angiogênese, vasodilatação e inibição de mediadores inflamatórios como prostaglandinas (Ribeiro *et al.*, 2009a; Matos *et al.*, 2014).

A fotobiomodulação a laser (FBML), com laserterapia de baixa intensidade LLLT, do inglês “*low-level laser therapy*” pode ser realizada em dois diferentes espectros, estes são estabelecidos a partir do comprimento de onda utilizado. O espectro de ação vermelho ou visível apresenta comprimento de onda na faixa aproximada de 630 a 700nm, enquanto o infravermelho ou invisível comprimentos de onda próximo ao 700 a 904nm. Esses dois espectros apresentam mecanismos de ação diferentes entre si (Laraia *et al.*, 2012). Os lasers com comprimento de onda na faixa do visível atuam primeiramente nas mitocôndrias e lisossomos, induzindo diretamente a síntese de enzimas. Os que possuem luz infravermelha agem nas membranas celulares através de alterações no potencial das mesmas, desencadeando efeitos fotofísicos e fotoelétricos responsáveis pela excitação de elétrons, vibração e rotação de moléculas, que se traduzem no aumento da síntese intracelular de ATP (Karu, 1988; Marchionni *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010).

A FBML pode modular a cicatrização de feridas através da indução de um aumento na atividade mitótica, número de fibroblastos, síntese de colágeno e neovascularização (Rocha Júnior *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009; Fiorio *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2018), reduzindo o tempo e melhorando a qualidade da cicatrização.

É possível observar a grande quantidade de estudos prévios demonstrando que o uso do carvacrol, além de outros benéficos efeitos, diminui o tempo de inflamação das lesões encurtando assim o tempo para reparação do tecido. Os mesmos benefícios também são vistos na aplicação da fotobiomodulação a laser. Outros trabalhos inclusive, já demonstraram o efeito positivo da associação do carvacrol e da fotobiomodulação a laser para outras finalidades, porém, a metodologia empregada nesse trabalho, especificamente o protocolo de aplicação do laser e o tipo de tecido avaliado neste estudo até o presente momento é inédita, e foi a justificativa principal para realização do presente trabalho.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 FERIDAS

De acordo com a *Wound Healing Society* (WHS), uma ferida é o resultado da "interrupção de normalidade da estrutura anatômica e funcionalidade" tecidual ou ainda, lesões, defeitos ou ruptura da pele resultantes de efeitos físicos, térmicos ou cirúrgico. Também definida como a descontinuidade cutânea causada por traumas, queimaduras, isquemia, cirurgias, pressão tecidual continuada por longa permanência de tempo ou qualquer outro tipo de agressão externa que altere as condições morfofuncionais da pele (Boateng & Catanzano, 2015)

As feridas são classificadas, de acordo com sua etiologia em agudas ou crônicas, quanto à intensidade podem ser superficiais ou profundas. Os tipos são: feridas abertas, dependendo da causa, podem ser incisadas, lacerantes, superficiais, avulsões, punções e penetrantes e feridas fechadas, quando a pele está intacta e o tecido subjacente não apresenta exposição externa. Apesar de, a pele intacta não garantir que não haja danos aos tecidos subjacentes, músculos, órgãos internos e ossos (Wu & Chen, 2014).

1.1.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Após a lesão tecidual inicia-se a fase inflamatória. Devido à localização estratégica das células epiteliais entre o corpo e o ambiente externo, ocorre a comunicação e sinalização para a expressão de receptores de reconhecimento molecular, ativação e migração de células necróticas para a lesão. Destas, as citocinas produzidas pelos queratinócitos são os principais contribuintes para o início do processo inflamatório (Li *et al.*, 2007).

Além dos queratinócitos outras células como macrófagos, mastócitos e células endoteliais são ativadas, culminando com a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a permeabilidade vascular e aumentando expressão de moléculas de adesão que levam a ligação com células sanguíneas (neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas) (Wang *et al.*, 2017).

Durante a fase inflamatória, a agregação plaquetária é seguida pela infiltração de leucócitos. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para a região da ferida, tendo como objetivo fagocitar e destruir microrganismos (por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio). Esta migração tem início na primeira hora depois da lesão e permanece por até 48 horas (Young & McNaught, 2011). Além disso, essas células também estão envolvidas na

remoção de restos celulares, além de produzir várias citocinas que auxiliarão no processo inflamatório (Babior, 1978; Chhabra *et al.*, 2017).

1.1.3 REPARAÇÃO TECIDUAL

O processo de reparo dos tecidos é dinâmico, complexo e substitutivo de estruturas celulares danificadas e desvitalizadas, induzindo à restauração da função de barreira da pele, restabelecimento da integridade dos tecidos e manutenção da homeostase interna, que inicia pela recuperação ou reparação celular, buscando a revitalização do tecido, neoformação vascular, epitelização, contração e remodelamento histológico e é composto de fases sobrepostas, hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Essas etapas são responsáveis pela restauração da integridade física das estruturas corporais lesionadas, através de um processo complexo, dinâmico, multicelular que envolve células sanguíneas, citocinas, matriz extracelular e fatores de crescimento, que são proteínas responsáveis pela estimulação e ativação da proliferação celular (Velnar *et al.*, 2009; Gou & Dipietro, 2010).

A fase proliferativa inicia após a ativação de fibroblastos, pelos mediadores produzidos pelos macrófagos. Estes fibroblastos migram da região das bordas para o centro da ferida, produzindo componentes da matriz extracelular, como colágeno, levando à formação de tecido conjuntivo na região da lesão, processo este denominado de fibroplasia. Para que o processo de fibroplasia seja eficiente é necessária a formação de novos vasos (angiogênese), originando uma rede vascular rica de capilares ao longo da ferida regulados, principalmente, pelo fator de crescimento do endotélio vascular, o que leva ao aumento da oferta de oxigênio para o tecido em formação, melhorando a nutrição de células metabolicamente ativas (Smigiel & Parks, 2018).

1.1.4 CARVACROL

O carvacrol é um fenol monoterpênóide biosintetizado em plantas a partir do g-terpineno e p-cimeno. Por isso, estes últimos estão sempre presentes em óleos essenciais que contém timol e carvacrol. Além disso, intermediários biosintéticos também podem estar presentes, como: terpinenol-4, álcool cumino e p-cimenol-88. O carvacrol é encontrado em várias plantas pertencentes à família Lamiaceae e é abundante nos óleos essenciais de orégano e tomilho. Sua denominação química é 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol e possui fórmula molecular C₁₀H₁₄O e peso de 150,22 g/mol. Apresenta-se em forma líquida de coloração amarelo claro, cuja densidade é de 0,975 g/ml (20°C) (Melo *et al.*, 2009).

Com vasto uso na indústria de cosméticos, os constituintes dos óleos essenciais, com modificações dos grupamentos moleculares, podem ser utilizados como modelos estruturais para pesquisa de novos fármacos com maior eficácia e seletividade (Maimone & Baran, 2007). Por isso, ocupam lugar especial na história da medicina popular de culturas orientais e ocidentais.

O carvacrol também tem sido amplamente utilizado como suplemento dietético para combater infecções digestivas e problemas relacionados com a pele. Outras atividades vêm sendo observadas, diversas ações fisiológicas, tais como antibacteriana, antifúngica, antitumoral, anticarcinogênica, hepatoprotetora e anti-inflamatória (Ozturk *et al.*, 2018).

Suas atividades antiinflamatórias sistêmicas são atribuídas a diversas ações como inibição de histamina, metabolismo do ácido aracdônico, atividade da elastase, sistema complemento e produção de óxido nítrico (NO). Pesquisas demonstraram ser o carvacrol um inibidor de HNE (Elastase Neutrófila Humana) e poderia ser considerado um agente natural antielastase e um candidato possível para fisioterapia no tratamento dos casos patológicos tais como doenças inflamatórias crônicas. Também foi descrito como inibidor da COX (Ciclooxigenase) e por atuar como antioxidante descreveram a redução da produção de citocinas pró- inflamatórias e diminuição do grau de injúria tecidual através da suplementação dietética com óleo essencial de orégano em ratos com colite induzida investigaram o efeito antiinflamatório do carvacrol que reduziu significativamente os níveis de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) no lavado pleural e suprimiu o recrutamento de leucócitos através de lesão produzida por carragenina em ratos (Guimarães *et al.*, Laraia *et al.*, 2012; 2012; Ozturk *et al.*, 2018).

1.1.5 LASER

O laser é um acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). A radiação é constituída por ondas eletromagnéticas, visíveis ou não de acordo com o comprimento de onda das mesmas. Os feixes de luz monocromática e coerente são propriedades do laser capazes de induzir reações fotobiológicas quando absorvidas por moléculas fotorreceptoras conhecidas como cromóforos (conjunto de moléculas que podem ser enzimas, membranas ou outra substância capaz de absorver a luz) presentes nos tecidos do corpo irradiado. Os fótons contidos no laser têm a capacidade de alterar a estrutura dos cromóforos, levando-os a estados eletronicamente excitados que desencadeiam processos biológicos nas células (Karu, 1988).

O laser pode promover mudanças no estado redox (reações de transferência de elétrons) da célula, tendo um papel importante em manter as atividades celulares. O laser de baixa potência acelera a iniciação de reações na membrana celular pelo efeito foto-físico nos canais de cálcio e essas mudanças na permeabilidade da membrana causam o aumento de macrófagos, fibroblastos e atividade dos linfócitos (Marchionni *et al.*, 2010)

Os efeitos biológicos da terapia laser de baixa potência dependem diretamente dos parâmetros adotados para a sua aplicação. A sua potência óptica útil (energia emitida em um segundo) em Watts ou miliWatts, a área do feixe de saída do laser em centímetros quadrados (cm²) e o tempo de irradiação em segundos são os parâmetros básicos usados para calcular os parâmetros como: dose aplicada (energia total transmitida por um feixe laser por unidade de área do feixe de saída) descrita em densidade de energia em Joules por área em cm² (J/cm²) e a energia (energia total transmitida por um feixe laser) descrita em Joules (Santos *et al.*, 2010).

O laser de baixa potência atua na diminuição da dor, no processo inflamatório, estimula à produção do colágeno, proliferação dos fibroblastos e a microvascularização local, aumentando assim o metabolismo celular e o potencial regenerativo (Silveira *et al.*, 2011). Segundo Nes & Poso (2005) e Turhani *et al* (2006) o efeito analgésico do laser se explica pela manutenção do potencial de membrana, já que a mensagem elétrica promove uma despolarização, esse processo de inversão de polaridade seria dificultado e, como consequência, proporcionaria uma menor sensação dolorosa.

Vários estudos têm indicado que as matrizes laser em baixas frequências são bastante úteis na modulação de diferentes atividades biológicas, como analgésico (Nes & Poso, 2005; Turhani *et al.*, 2006), anti-inflamatório (Boschi *et al.*, 2008; Medrado *et al.*, 2010) e efeitos curativos (Demidova-Rice *et al*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009a; Matos *et al.*, 2016). O laser estimula a proliferação das células satélites, a angiogênese e a expressão dos fatores de crescimento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Analisar a reação tecidual da pasta de carvacrol associada ou não à fotobiomodulação a laser ($\lambda 660\text{nm}$) em subcutâneo de ratos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO:

Avaliar histologicamente em 03, 08 e 15 dias a reação tecidual em subcutâneo de ratos quanto a utilização da pasta de carvacrol associada ou não à fotobiomodulação a laser ($\lambda 660\text{nm}$), na coloração HE, infiltrado inflamatório e na coloração Picrosirius Red, células fibroblásticas e colágenos tipo I e III.

3. METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de intervenção, de caráter genuinamente experimental, laboratorial *in vivo*, randomizado e controlado com abordagem analítica quantitativa.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo seguiu os princípios do Código de Ética Experimental e as leis de proteção aos animais, descritas na resolução normativa número 12, de 20 de setembro de 2013, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, que tratam da questão do uso de animais para fins científicos. Consonantemente com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Com base nesses critérios de avaliação e julgamento o Comitê de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) aprovou o presente projeto com protocolo 59/2011.

3.3 - AMOSTRA

Composta por 60 ratos machos, da linhagem *Wistar "Rattus Norvegicus Albinus, Rodentia Mammalia"* todos adultos jovens com aproximadamente 120-150 dias de vida e peso corpóreo entre 250-300g fornecidos pelo Biotério Setorial da Universidade Federal de Sergipe solicitados pelo Departamento de Fisiologia desta mesma instituição. Foram adotados como critérios de exclusão, complicações como infecções, necroses, debilitação do estado geral e os que fossem a óbito antes do período estipulado para eutanásia de cada grupo. Porém, não houve a necessidade de exclusão de nenhum dos animais. Os mesmos foram mantidos em gaiolas específicas, forradas com maravalha, trocadas diariamente, contendo 5 animais em cada, mantidos em sala climatizada com temperatura controlada de 22 a 23°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, receberam água *ad libitum* e dieta padrão Labina®. Para a identificação dos mesmos, foram realizadas marcações com caneta de tinta permanente na calda de cada animal, o número de marcas indicava o número do respectivo animal em um mesmo grupo. A acomodação destes, os procedimentos cirúrgicos e sessões de fotobiomodulação laser, bem como a eutanásia dos animais foram realizados na sala de experimentação animal do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe/UFS. Os animais passaram por adaptação às condições da sala de

experimentos por um período de três dias para que os mesmos se adaptassem ao manuseio, minimizando assim os fatores de estresse do ambiente antes da sua utilização no experimento.

3.4 DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Após atingirem idade e peso adotados neste estudo, os 60 animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, 15 animais por grupo e cada grupo foi subdividido em três intervalos de avaliação (5 animais cada). Os resultados histológicos foram avaliados nos tempos de 03, 08 e 15 dias. A opção por cinco animais em cada grupo/intervalo justifica-se pela necessidade de número amostral para coleta dos dados quantitativos necessários para o devido tratamento estatístico das variáveis estudadas: processo inflamatório e reparo tecidual (Zhu *et al.*, 2011).

Quadro 1: Distribuição dos animais segundo grupo e tempo experimental.

DENOMINAÇÃO		DESCRIÇÃO		
		TUBO	FOTOBIMODULAÇÃO	EUTANÁSIA
Controle	CTR 3	VAZIO	SIMULAÇÃO	3° DIA
	CTR 8	VAZIO	SIMULAÇÃO	8° DIA
	CTR 15	VAZIO	SIMULAÇÃO	15° DIA
Carvacrol	CVC 3	CARVACROL	SIMULAÇÃO	3° DIA
	CVC 8	CARVACROL	SIMULAÇÃO	8° DIA
	CVC 15	CARVACROL	SIMULAÇÃO	15° DIA
Laser	LLLT 3	VAZIO	PRESENTE	3° DIA
	LLLT 8	VAZIO	PRESENTE	8° DIA
	LLLT 15	VAZIO	PRESENTE	15° DIA
Carvacrol + Laser	CVCLT 3	CARVACROL	PRESENTE	3° DIA
	CVCLT 8	CARVACROL	PRESENTE	8° DIA
	CVCLT 15	CARVACROL	PRESENTE	15° DIA

Fonte: UFS, 2018.

3.5 PREPARO DOS TUBOS DE POLIETILENO

Para obtenção dos tubos de polietileno, adotou-se a metodologia utilizada por Torneck (1966) e Matos *et al.*, (2014), na qual um cateter de uretra com 1,5 mm de diâmetro interno foi seccionado sequencialmente com intervalos de aproximadamente 10mm. Cada tubo após a secção foi vedado em uma das suas extremidades com éster de cianocrilato gel (Super Bonder®, Aachen, Alemanha), depois disso os tubos foram autoclavados. O uso do cianoacrilato em subcutâneo já foi referenciado nos trabalhos de Vanholder *et al.*, (1993) e Kemper *et al.*, (2015). No estudo de Salka *et al.*, (2009) foram implantados tubos de polietileno preenchidos com o adesivo Super Bonder® em subcutâneo do dorso de ratos. Eles concluíram que derivados de cianoacrilatos oferecem uma alternativa à síntese tecidual em determinadas situações como incisões ou lacerações e possibilitam aposição das bordas do ferimento, sem necessidade de curativos oclusivos.

3.6 PREPARO DA PASTA DE CARVACROL

O carvacrol foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich (USA) com grau de pureza de (98%). A pasta do carvacrol foi confeccionada no Laboratório de ensaios Farmacêuticos e Toxicidade (LeFT) do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. A pasta era composta por 0,26g de carvacrol, 2g de beta-ciclodextrina e 2 ml de água destilada. A beta-ciclodextrina é bastante utilizada para melhorar a solubilidade, dissolução e biodisponibilidade de drogas pouco solúveis em água (Mura *et al.*, 1999). Obtida a pasta, os tubos de polietileno esterilizados foram preenchidos imediatamente, com auxílio de uma agulha estéril compatível com o diâmetro interno do tubo de polietileno.

3.7 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os ratos foram anestesiados com Cloridrato de Quetamina 90 mg/kg, associado com Xilazina 2% - 10 mg/kg, via intraperitoneal, em seguida foi realizada a tricotomia da região dorsal dos animais e depois disso realizou-se a antisepsia com Polvidine®. Posteriormente, foram confeccionadas duas incisões de 05 mm, próximas à região escapular. A divulsão do tecido subcutâneo foi realizada com tesoura de ponta romba. Os tubos de polietileno foram implantados no sentido longitudinal, com a extremidade inferior do tubo vedada com cianocrilato gel e voltada para a cauda, nos grupos CVC (carvacrol) e CVCLT (carvacrol e fotobiomodulação a laser) os tubos estavam totalmente preenchidos com a pasta do carvacrol. Posteriormente as bordas da ferida foram suturadas de forma contínua com agulhas montadas

de 1,6cm com fio de seda 3-0 e realizada nova antissepsia com Polvidine® da área operada. Após o término do ato operatório, todos os animais receberam Diclofenaco de potássio na dose de 10 mg/kg, via intramuscular, a fim de minimizar a sintomatologia pós-operatória além de uma dose de antibiótico enrofloxacino a 10%, 50 mg/kg, via intraperitoneal. Os animais ficaram separados em grupos conforme os grupos e períodos de eutanásia.

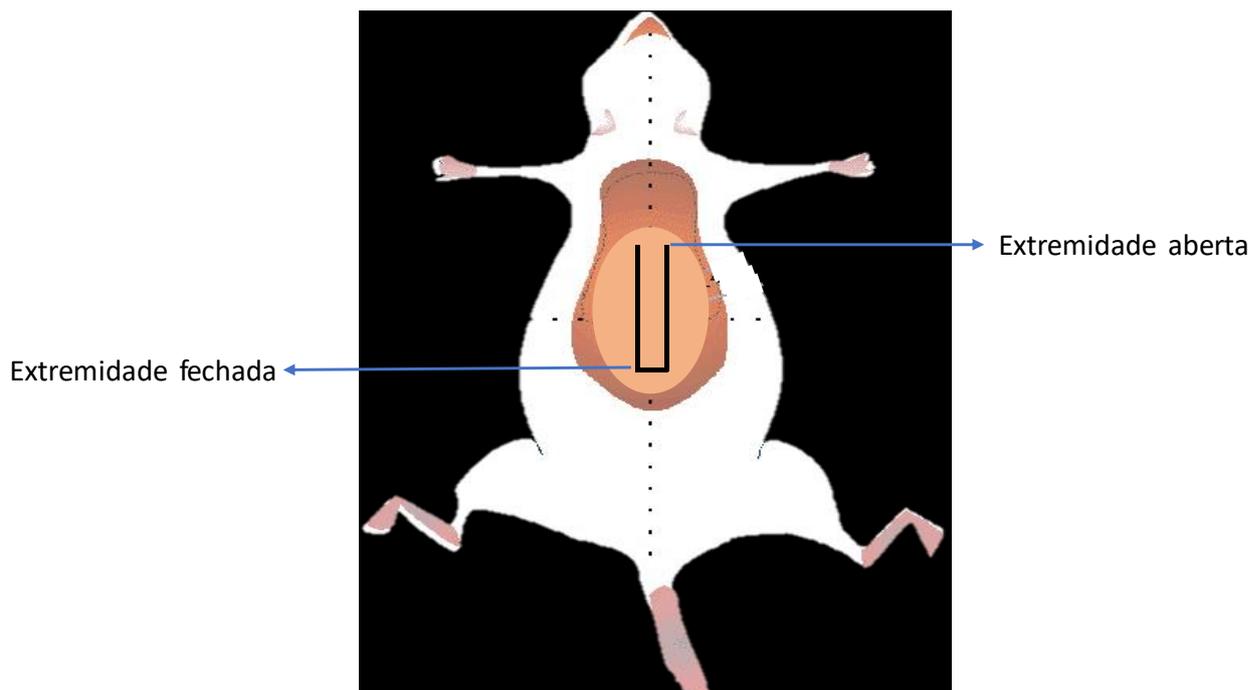


Figura A: ilustração da região anatômica e posição tubo de polietileno.

3.8 FOTOBIMODULAÇÃO A LASER

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais dos grupos LLLT (fotobiomodulação a laser) e CVCLT (carvacrol e fotobiomodulação a laser) foram submetidos a exposição da luz laser (Ribeiro *et al.*, 2009a; Ribeiro *et al.*, 2009b; Matos *et al.*, 2014), foi utilizado um aparelho *Twin-laser* (MMOptics®, Equipamentos Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil) com registro na agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) n. 80051420007 e certificado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) sob o número NCC 2756/05. O aparelho foi calibrado previamente pelo fabricante. Os parâmetros utilizados estão expostos no Quadro 2.

Quadro 2. Parâmetros de irradiação para os grupos LLLT e CVCLT.

Parâmetros de irradiação	
Modo de emissão (CW)	Contínuo
Comprimento	λ660 nm
Meio ativo	InGaAlP
Potência óptica do laser (output)	10 mW
Potência óptica do laser (input)	40 mW
Área do ponto de feixe	4 mm
Área (cm ² - $A=\pi.r^2$)	0,04 cm ²
Densidade de potência (PD)	1mW/cm ²
Densidade de energia (ED)	20J/cm ²
Tempo por ponto	20 segundos
Tempo total	80 segundos
Energia total	0,8J
Divergência do feixe perpendicular à junção	17°
Ângulo da ponta	50°

Fonte: Ribeiro *et al.*, 2009a.

A irradiação foi feita por contato direto (transcutânea) o comprimento de onda utilizado foi no espectro vermelho (λ660nm), com a caneta perpendicular ao local de aplicação em quatro pontos de cada ferida cirúrgica confeccionada, sendo um caudal, um radial, e dois laterais (direito e esquerdo) perpendicular ao longo eixo do dorso do animal. Os grupos expostos a luz laser, foram irradiados com intervalo de 48 horas, sendo a primeira aplicação imediatamente após o ato cirúrgico, conforme protocolo descrito por Ribeiro *et al.*, (2009a) e Matos *et al.*, (2014). Os animais que não receberam a aplicação da luz laser foram submetidos ao emissor de laser desligado, simulando assim uma manipulação semelhante entre os animais do estudo, para que a alteração de estresse não fosse uma variável.

3.9 EUTANÁSIA E OBTENÇÃO DAS PEÇAS ANATÔMICAS

Ao final do 3°, 8° e 15° dias os animais foram identificados e submetidos à eutanásia com solução de lidocaína a 8 mg/Kg e tiopental sódico a 180 mg/Kg, via intraperitoneal. A comprovação da eutanásia foi feita pela ausência de reflexo palpebral, dos movimentos torácicos e opacificação da córnea após dois minutos. Em seguida foi realizada cuidadosamente a dissecação por planos teciduais a remoção em bloco das amostras do tecido cicatricial, conservando uma margem de 0,5cm de todos os lados dos tubos. Os fragmentos destinados à histologia foram fixados em solução tamponada de formol a 10% (pH 7.4) e encaminhadas ao Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE) - UNIT onde foram processados.

3.10 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Após a inclusão em parafina, os blocos foram identificados e posicionados em micrótomo, sendo então seccionados até se encontrar os tubos de polietileno. Estes foram cuidadosamente removidos e o espaço por eles ocupados foi preenchido com parafina líquida. Após 24h foi reiniciado o processo para obtenção dos cortes, obtendo-se 20 cortes semi-seriados, longitudinais à extensão do tubo com espessura de 5µm, de acordo com as técnicas de processamento histológico.

3.10.1 AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Para avaliação das características histomorfológicas associadas à evolução cicatricial foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se o processo de reparo ao longo do experimento, a partir de lâminas contendo, em média, oito secções seriadas de cada animal, baseado na metodologia de Myers *et al.*, (1961), modificado por Almeida *et al.*, (2016). Elementos estromais foram analisados semiquantitativamente observando os aspectos inflamatórios através de poliformonucleares neutrofílicos.

Os escores foram obtidos, e analisados em 10 campos histológicos com magnificação de 200 x, selecionados por casualização sistemática. A análise foi padronizada com leitura iniciada sempre na porção superior da extremidade onde o tubo estava aberto, para cada campo selecionado seguiu-se um campo histológico desprezado, até atingir a margem inferior. Os escores obtidos na análise de cada parâmetro foram multiplicados pelo fator de correção, para melhor representar sua relevância na evolução do reparo, e permitir a determinação do escore final preciso do estágio evolutivo do processo de reparo (Quadro 3).

Quadro 3. Escores histopatológicos para análise do perfil evolutivo morfológico do processo de reparo cicatricial cutâneo.

Critério	Escore	Fator de correção	Escore final
Formação de abscessos		-10	
Inflamação aguda		-4	
Inflamação crônica		-2	
Regeneração epitelial		+5	
Reação de granulação		+5	
Fibroblastos		+5	
Colágeno		+10	
Neoformação de anexos cutâneos		+2	
Escore total			

Avaliação do processo inflamatório e reparo tecidual de Myers *et al.*, (1961). Modificado por Almeida *et al.*, (2016).

3.10.2 AVALIAÇÃO DO REPARO POR MEIO DO COLÁGENO I/COLÁGENO III

Para a avaliação da deposição de colágeno, cortes histológicos corados em Picrosúrius Red e analisadas sob luz polarizada em microscópio modelo OLYMPUS CX 31 com câmera fotográfica acoplada foram utilizados para a análise descritiva. As fibras de colágeno foram analisadas segundo o seu padrão de birrefringência (laranja, laranja-avermelhada), caracterizando o colágeno tipo I ou (esverdeado/amarelo-esverdeada caracterizando o colágeno tipo III, com a soma dos escores até 4. Foi também avaliada a aparência morfológica (ondulado ou estirado, delgado ou espesso, curto ou longo), e o arranjo arquitetônico (reticular, paralelo ou entrelaçados) também com a soma dos escores até 4. A densidade foi avaliada quanto à condição de espaços interfibrilares ou tecido colagenizado com a soma dos escores até 4.

Todas as imagens foram digitalizadas com o mesmo padrão de intensidade de luz do microscópio e altura do condensador. As áreas de colágeno foram então separadas na imagem usando-se o seu padrão de birrefringência vermelho ou laranja para colágeno tipo I e verde ou verde-amarela para o colágeno tipo III, conforme descrito por Ram *et al.* (2016). As imagens foram avaliadas com o software Image J (NIH, USA), utilizando-se o plugin *Threshold Colour* para obter o percentual de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas de acordo com seleção (matiz 0-35 para a cor vermelha - colágeno tipo I; e matiz 45-120 para a cor verde - colágeno tipo III) e posterior obtenção das medidas das áreas com base na cor. Os valores de saturação (0-255) e brilho (5-225) foram padronizados para todas as imagens. Após quantificação de colágenos tipo I e tipo III em cada campo, a média para cada ferida foi calculada e registrada. Os fibroblastos são os principais tipos celulares da fase de remodelação e o processo marcante é a conversão do colágeno tipo III para o tipo I (Childs & Murthy, 2017).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, os dados, expressos como média \pm desvio padrão, foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para análise de normalidade e homocedasticidade, confirmando a simetria de distribuição, assim como aditividade e variância constante dos resultados. Para análise de diferenças significativas entre as médias dos diferentes grupos, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA); para comparações múltiplas das médias, pareando os grupos dois a dois, foi aplicado o teste post-hoc de Tukey. O nível de significância adotado neste estudo foi de 5% ($p < 0,05$). Para tanto, utilizamos o *software* estatístico *GraphPad Prism®* versão 5.0

4. RESULTADOS

Periódico escolhido para submissão: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

Fator de impacto: 3.165 / Qualis (Odontologia): A2

Assessment of carvacrol associated to laser photobiomodulation in the tissue reaction

Running Title: Tissue reaction after use of carvacrol and laser

Ismário Silva Meneses: DDS, MSc student, Department of Dentistry, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil. E-mail: ismariomeneses@hotmail.com

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior: DDS, MSc, PhD, Department of Dentistry, Tiradentes University, Aracaju, SE, Brazil. E-mail: ricardo.patologia@uol.com.br

Adriano Antunes de Souza Araújo: DDS, MSc, PhD, Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil. E-mail: adriasa2001@yahoo.com.br

John Lennon Silva: Undergraduate student, Department of Dentistry, Tiradentes University, Aracaju, SE, Brazil. E-mail: lennonrrr@live.com

Nayara Santos Souza: DDS, Department of Dentistry, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil. E-mail: naysouza4@gmail.com

Felipe de Souza Matos: DDS, MSc, PhD student, Department of Restorative Dentistry, Endodontic Division, Institute of Science and Technology, São Paulo State University (Unesp), São José dos Campos, SP, Brazil. E-mail: felipe_smatos@hotmail.com

Lucindo José Quintans-Júnior: DDS, MSc, PhD, Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil. E-mail: lucindojr@gmail.com

Maria Amália Gonzaga Ribeiro: DDS, MSc, PhD, Department of Dentistry, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil. E-mail: endoribeiro@yahoo.com.br

The place where the work was developed: Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil

* **The work was not submitted in any event.**

* **There was no source of support.**

* **There is no conflict of interest.**

Corresponding Author:

Prof. Dr. Maria Amália Gonzaga Ribeiro

Federal University of Sergipe, Department of Dentistry - Cláudio Batista St., Sanatório, Aracaju, Sergipe, Brazil

ZIP Code: 49060-100

Phone: +55 79 998533200

E-mail: endoribeiro@yahoo.com.br

Assessment of carvacrol associated to laser photobiomodulation in the tissue reaction

Abstract

This study aimed to analyze the tissue reaction caused by carvacrol paste associated or not to laser photobiomodulation (LPBM) at $\lambda 660\text{nm}$ in rat subcutaneous tissue. Sixty Wistar rats were divided into four groups and received the following interventions: subcutaneous implantation of empty polyethylene tubes (CTR); implantation of tubes containing carvacrol paste (CVC); implantation of empty tubes and LPBM (LLLT); implantation of tubes containing carvacrol paste and LPBM (CVCLT). The animals were euthanized at 03, 08 and 15 days after surgery, the surgical specimens were removed, processed for inclusion in paraffin and histological sections stained with hematoxylin-eosin and sirius red to histologically evaluate the inflammatory reaction and fibroplasia. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test were applied to determine significant differences between groups ($p < 0.05$). In the 3-day period, the CVCLT group had lower inflammatory infiltration in relation to the other groups ($p < 0.01$). In the 8 and 15 days period, the LLLT and CVCLT groups had a lower amount of lymphocytic inflammatory infiltrate than the other groups ($p < 0.01$ and $p < 0.05$). Regarding the formation of fibrous tissue, the CVC group had a higher formation of type III collagen in the 8 day period ($p < 0.001$). There was a significant difference in the 8-day period between the CVC group and the other groups regarding the evaluation of collagen type III ($p < 0.001$). And in the 15-day period significant differences were observed in the CVCLT group in relation to the CTR and LLLT groups in the evaluation of type I collagen ($p < 0.05$). The use of the carvacrol paste associated with laser photobiomodulation has been shown to optimize the inflammatory period of the tissue reaction.

Keywords: biocompatible materials; wound healing; laser therapy.

1 - Introduction

The inflammation process is characterized by the production of a cascade of mediators that regulate important factors of the inflammatory response, such as increased vascular permeability and recruitment of defense cells such as leukocytes [1]. Once released, such inflammatory mediators may activate or sensitize the nociceptors adjacent to the injured tissue, resulting in pain sensation [2].

The use of biomaterials in the cicatricial process has been well researched, aiming to modulate or accelerate the process of tissue repair [5]. Biomaterials of natural origin, such as medicinal plant substrates, are known to be a significant source of new chemicals that have potential therapeutic effects [6,7]. Among them, carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol), a monoterpene phenol present in essential oils of numerous aromatic plants belonging to the family Lamiaceae, has shown antimicrobial [8], antioxidant [9,10], antinociceptive [11] and anti-inflammatory effects [12].

Another resource already well established and widely used to stimulate tissue repair is the low level laser therapy (LLLT), which has analgesic, anti-inflammatory and anti-oedematous action, aiding the process of tissue repair through photobiomodulation. The interaction of laser with biological tissues depends on the wavelength, the energy density and the power. Among the mechanisms involved in the biological effects of LLLT, there is an increase in local microcirculation, angiogenesis, vasodilation and inhibition of inflammatory mediators such as prostaglandins [13,14].

Laser photobiomodulation (LPBM) can be performed in two different spectra, established from the wavelength, which have different mechanisms of action [15]. The red or visible spectrum has a wavelength in the range of approximately 630 to 700 nm, while the infrared or invisible spectrum has wavelengths between 700 and 904 nm. Red lasers have lower penetration power and act better on superficial lesions, while infrared lasers have a greater penetration power and act on deeper tissues such as bone, neural tissue and joints. LPBM can modulate wound healing by inducing increased mitotic activity, number of fibroblasts, collagen synthesis and neovascularization [16-19], reducing the time and improving the quality of healing.

Previous studies have shown that the use of carvacrol, in addition to other beneficial effects, decreases the inflammation time of the lesions thus accelerating tissue repair. The same

benefits are also seen in the application of LPBM. Other studies have already demonstrated the positive effect of the association of carvacrol and laser photobiomodulation on tissue repair, however, the methodology employed in this work up to the present moment is unpublished. Thus, the objective of this study was to evaluate the tissue reaction caused by the carvacrol paste associated or not with LPBM at $\lambda 660\text{nm}$ in rat subcutaneous tissue.

2 - Materials and methods

2.1 - Ethical aspects and sample

The research protocol was approved by the Animal Research Ethics Committee (Process n. 59/2011). In this study, sixty male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain) with an average weight between 250 and 300 g and age between 120 and 150 days were used. The animals were randomly divided into four groups (n = 15) according to the following interventions: CTR - subcutaneous implantation of empty polyethylene tubes; implantation of tubes containing carvacrol paste (CVC); implantation of empty tubes and laser photobiomodulation (LLLT); implantation of tubes containing carvacrol paste and laser photobiomodulation (CVCLT).

2.2 - Preparation of polyethylene tubes

To obtain the polyethylene tubes, we followed the methodology used by Torneck et al. [20] and Matos et al. [14], in which a 1.5 mm internal diameter urethral catheter was sectioned sequentially at intervals of approximately 10 mm. After sectioning, each tube was sealed at one end with Cyanoacrylate Ester gel (Super Bonder, Aachen, Germany) and autoclaved. The subcutaneous use of cyanoacrylate has already been reported in other studies [21-23] that implanted polyethylene tubes filled with Super Bonder® adhesive in subcutaneous tissue of the dorsum of rats.

2.3 - Preparation of carvacrol paste

Carvacrol was obtained commercially from Sigma-Aldrich (USA) in 98% purity. The carvacrol paste was prepared with the following components and proportions: 0.26 g of carvacrol, 2 g of beta-cyclodretine and 2 ml of distilled water [24,25]. Beta-cyclodextrin is

widely used to improve the solubility, dissolution and bioavailability of poorly soluble drugs in water [26]. After preparation of the paste, the sterilized polyethylene tubes were filled immediately with the aid of a sterile needle compatible with the internal diameter of the tubes.

2.4 - Surgical procedure

The rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (Ketamine 10%; Agener National Pharmaceutical Chemical Union, Embu, SP, Brazil) associated with thiazine hydrochloride (Rompun 2%; Bayer S.A. - Animal Health, SP, Brazil), administered at a dosage of 0.25 mL/100 mg. Then, a trichotomy and antisepsis in the dorsal region of the animals were performed with a 10% povidone-iodine topical solution (LM PHARMA).

Subsequently, two incisions 5 mm in width were made close to the scapular region and the polyethylene tubes were implanted longitudinally. In the CVC and CVCLT groups, whose tubes were completely filled with the carvacrol paste, the sealed end of the tube was implanted facing the caudal region. The wounds were sutured with 3-0 silk thread, and a new antisepsis was performed with iodine alcohol. All animals received an intramuscular dose of diclofenac potassium (10 mg/kg) and an intraperitoneal dose of 10% enrofloxacin (50 mg/kg) in order to minimize postoperative symptomatology.

2.5 - Laser photobiomodulation

After the surgical procedures, the animals of the LLLT and CVCLT groups were submitted to laser light exposure using a calibrated apparatus Twin Laser-InGaAlP (MMOPTICS, São Carlos, SP, Brazil), with a wavelength in the red spectrum ($\lambda 660$ nm), following the protocol described by Ribeiro et al. [13]. The irradiation was applied by contact, perpendicular to the long axis of the back of the animal, in four points of each wound: one caudal, one radial, and two lateral (right and left). The irradiations occurred at intervals of 48 hours, being the first application immediately after the surgical procedure [13,14]. The non-irradiated animals were submitted to the laser emitter off, simulating the same conditions of manipulation and stress.

2.6 - Euthanasia and sample preparation

Three, eight and fifteen days after surgical procedures, the animals were euthanized and the specimens were removed from each animal via a lozenge incision around the wound with a margin of 1 cm. The samples were fixed in 10% formalin for 24 hours and processed for paraffin embedding. Histological sections with a thickness of 5 μm were cut and then stained with hematoxylin-eosin (HE) and sirius red (SR).

2.7 - Evaluation of the inflammatory infiltrate intensity

The histomorphological characteristics associated to cicatricial evolution were evaluated from histological sections stained in HE, in eight serial sections of each animal, based on the methodology of Myers et al. [27], as amended by Almeida (2016). Stromal elements were analyzed semiquantitatively observing the inflammatory aspects through polyphormonuclear neutrophils.

2.8 - Evaluation of the type I and III collagen deposition

The collagen fibers were analyzed according to their red or orange birefringence pattern for type I collagen and green or yellow-green for type III collagen [28]. The morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long), and the architectural arrangement (reticular, parallel or interlaced) were also evaluated. Density was assessed as to the condition of interfibrillar spaces or collagenized tissue.

The images of the collagen areas were obtained and evaluated with Image J software (NIH, USA), using the Threshold Color plugin to obtain the percentage of collagen by means of automated particle analysis according to the standard established for collagen type I (hue 0-35 for red color) and type III (hue 45-120 for green color). The values of saturation (0-255) and brightness (5-225) were standardized for all images. After quantification of the type I and type III collagen areas based on the color in each field, the mean for each wound was calculated and recorded.

2.9 - Statistical analysis

The data expressed as mean \pm standard deviation were submitted to Shapiro-Wilk and Bartlett tests for analysis of normality and homoscedasticity, confirming the distribution symmetry, as well as additivity and constant variance of the results. For the analysis of significant differences between the means of the different groups, the analysis of variance (ANOVA) was applied and for multiple comparisons of the means, matching the groups two to two, the Tukey post-hoc test was applied. The level of significance adopted in this study was 5% ($p < 0.05$). All statistical tests were performed using the software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., California, USA).

3 - Results

3.1 - Evaluation of the inflammatory infiltrate intensity

In three days, there was a predominance of acute inflammatory reaction, rich in polymorphonuclear neutrophils, which focused on the regions closely related to the open end of the polyethylene tubes. In these areas, the formation of extensive deposits of serofibrinous exudate was also common. In the periphery, and around the tubular end, chronic inflammatory infiltrate and interstitial edema ranging from mild to moderate were observed. As can be observed in Figure 1, the presence of carvacrol determined a significantly more pronounced accumulation of polymorphonuclear neutrophils when compared to the other groups.

In eight days (Figure 2), the CTR group presented only mild to moderate peritubular fibroblast reaction, with the presence of discrete chronic inflammatory infiltrate and remnant interstitial edema. The laser irradiation on the area of implantation of the empty polypropylene tube (LLLT) determined the formation of a more expressive fibroblastic reaction and absence of interstitial edema. In the region adjacent to the tube containing carvacrol (CVC), an exuberant granulation reaction was observed, with persistence of inflammatory lymphohistiocytic infiltrate. On the other hand, the connective tissue surrounding the area containing tubes filled with carvacrol and subjected to irradiation exhibited a thick range of peritubular granulation reaction, rich in hyperemic capillary vessels and spindle cells interpreted as fibroblasts.

In 15 days (Figure 3), in the CTR and CVC groups, fibroblasts and mild to moderate peritubular reaction were evidenced, with an inexpressive presence of chronic inflammatory infiltrate and remnant interstitial edema. In the irradiated groups (LLLT and CVCLT), there is an abundant presence of collagens, especially in the peritubular spaces on the area of implantation of the empty polypropylene tube.

Regarding the quantitative analysis of the inflammatory process, carvacrol associated with LPBM (CVCLT) showed lower inflammatory infiltration in relation to the CTR ($p < 0.01$), CVC ($p < 0.001$) and LLLT ($p < 0.001$), within 3 days. In the 8-day period, the LLLT and CVCLT groups had a lower amount of lymphocytic inflammatory infiltrate than the CTR ($p < 0.01$) and CVC ($p < 0.05$) groups. While in the 15-day evaluation period, LLLT and CVCLT presented a lower amount of lymphocytic inflammatory infiltrate in relation to the other groups ($p < 0.05$) (Figure 1,2,3,4,5).

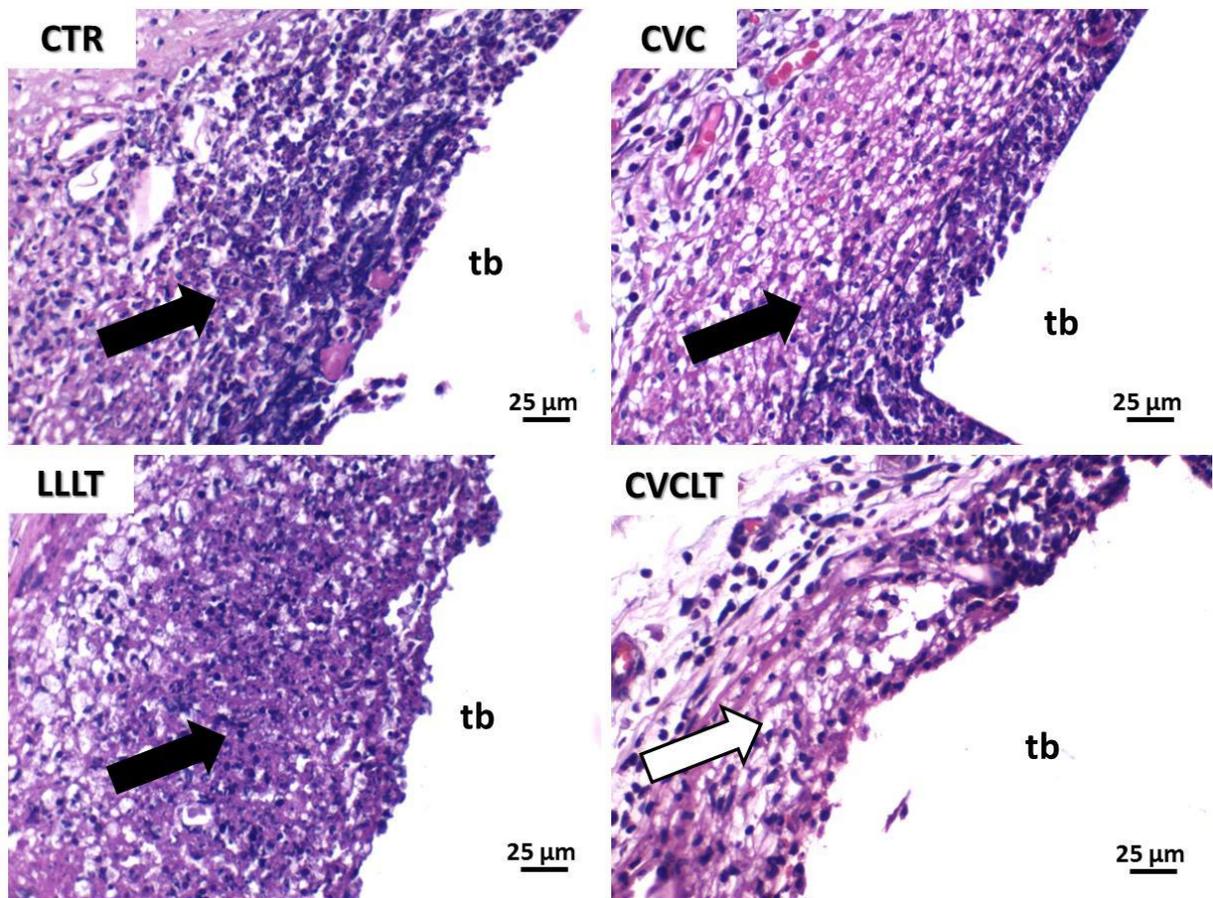


Figure 1. Photomicrographs of histological sections stained in HE of the different experimental groups representative of the third day of implantation of the polyethylene tubes (tb). Polymorphonuclear neutrophils and serofibrinous exudate tend to accumulate in the circumferences of the open end of the tubes (black arrow). Moderate chronic inflammation and peripheral interstitial edema are observed, with a higher vasculocapillary condensation in CVCLT (white arrow) as opposed to greater range of neutrophil infiltration when compared to the other groups. CTR (empty tubes), CVC (tubes containing carvacrol), LLLT (empty tubes irradiated with laser light) and CVCLT (tubes containing carvacrol and irradiated with laser light).

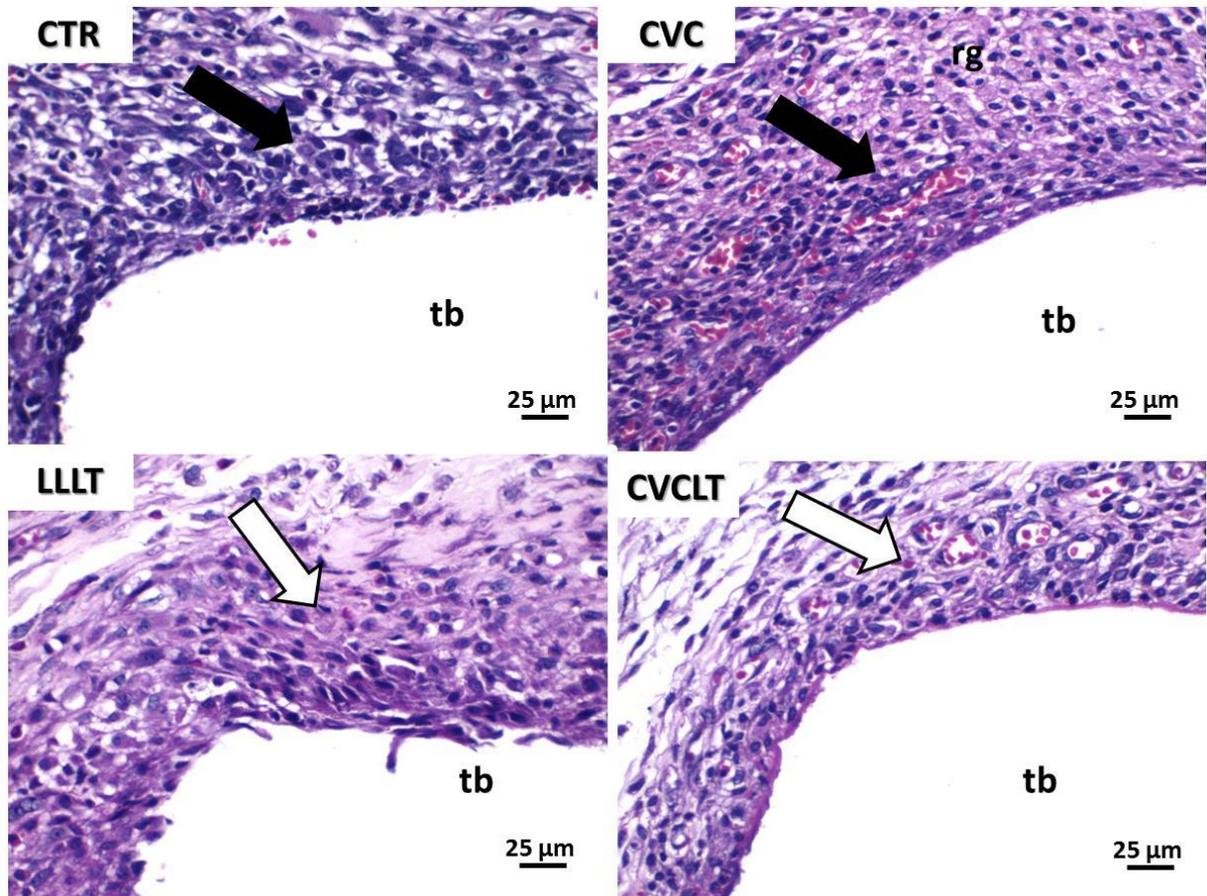


Figure 2. Photomicrographs of histological sections stained in HE of the different experimental groups representative of the eighth day of implantation of the polyethylene tubes (tb). Persistent polymorphonuclear neutrophils and sero-fibrous exudate in the CTR and CVC groups, which also show a persistent peritubular fibroblast reaction (black arrow) and persistent interstitial edema, while LLLT and CVCLT present an intense peritubular fibroblast reaction (white arrow), the latter, still exhibits persistence of richly vascular exuberant granulation reaction. CTR (empty tubes), CVC (tubes containing carvacrol), LLLT (empty tubes irradiated with laser light) and CVCLT (tubes containing carvacrol and irradiated with laser light).

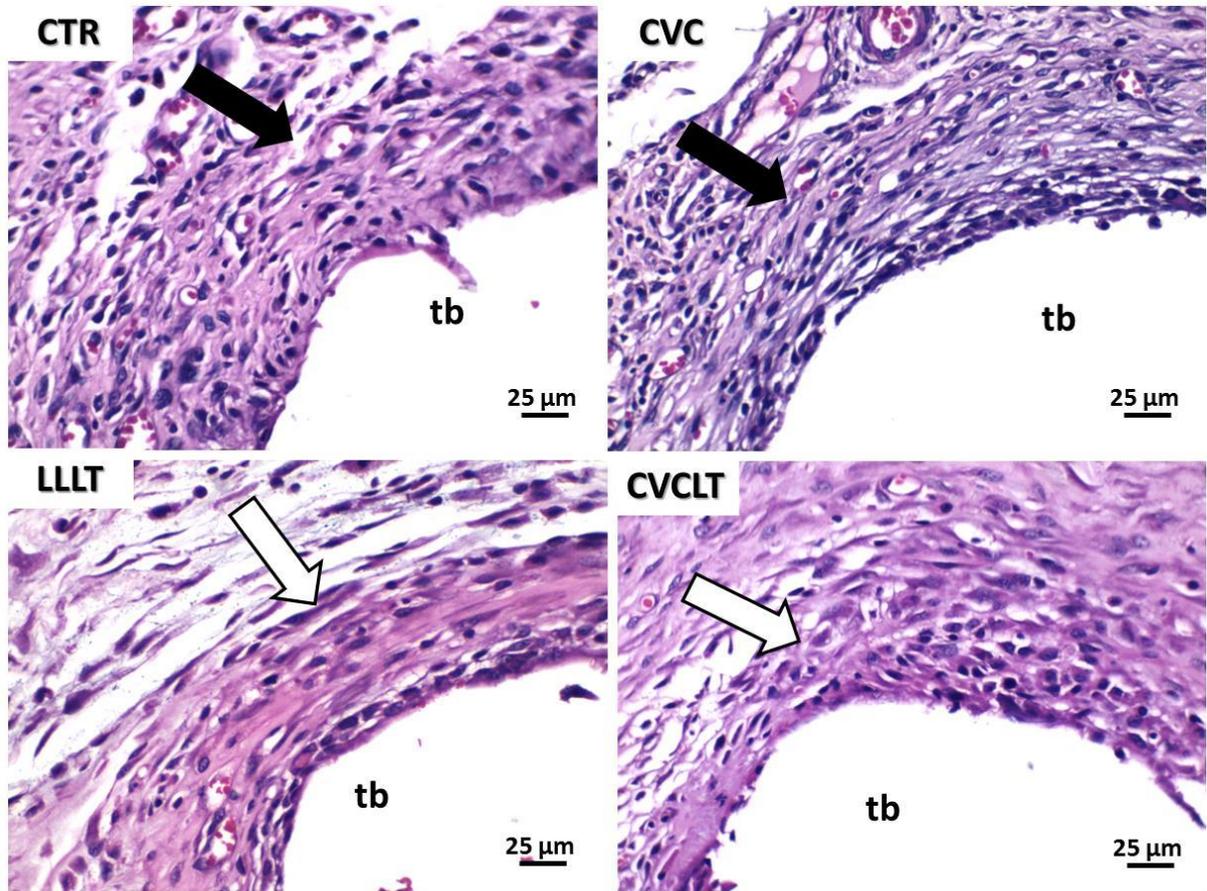


Figure 3. Photomicrographs of histological sections stained in HE of the different experimental groups representative of the fifteenth day of implantation of the polyethylene tubes (tb). Presence of fibroblasts in the CTR and CVC groups, which also show a discrete peritubular fibroblastic reaction (black arrow), while LLLT and CVCLT present collagen in the peritubular spaces (white arrow). CTR (empty tubes), CVC (tubes containing carvacrol), LLLT (empty tubes irradiated with laser light) and CVCLT (tubes containing carvacrol and irradiated with laser light).

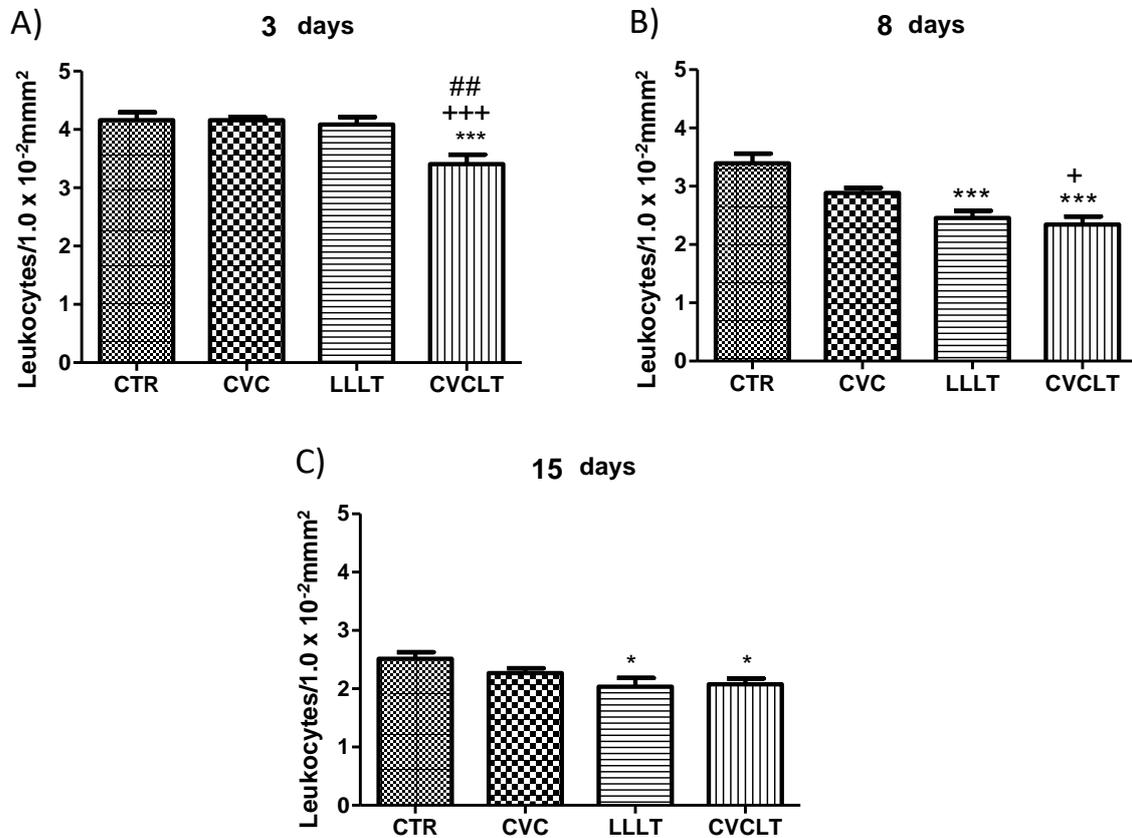


Figure 4. Distribution of the inflammatory process (leukocytes) by area of evaluation of all experimental groups throughout the three evaluation periods. A) CVCLT group had a lower amount of leukocytes compared to CTR and CVC groups (** $p < 0.001$). It also presented statistical difference when compared to LLLT group (** $p < 0.01$). B) LLLT and CVCLT groups had less leukocytes compared to the other groups, being statistically different in relation to the CTR group (** $p < 0.001$). CVCLT group also presented a difference compared to the CVC group ($p < 0.05$). There was no statistical difference between LLLT and CVC. C) LLLT and CVCLT groups had a lower amount of leukocytes than the CTR group ($p < 0.05$). No statistical differences were observed between CVC, LLLT and CVCLT. CTR (control); CVC (carvacrol); LLLT (laser photobiomodulation) and CVCLT (carvacrol + laser photobiomodulation). (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

3.2 - Evaluation of the type I and III collagen deposition

At 3 days, sections stained with SR and examined under polarized light revealed, in all groups, the presence of rare fibrous bundles predominantly short, thin and delicate, with greenish birefringence suggestive of type III collagen throughout the wound area. These fibrils appeared to be arranged in reticular organization, recalling a "spider web" arrangement. Interfibrillary spaces were abundant, large and irregular (Figure 6).

In the 8-day period (Figure 7), all groups presented collagen fibers with predominantly reddish orange and reddish birefringence compatible with type I collagen, which were arranged in a reticular architectural arrangement on the surface of the wounds, but were significantly parallel in depth. In the groups CTR, CVC and CVCLT, the fibers are seen densely arranged, interlaced, compacted and with reduction of the interfibrillar spaces, characterizing a greater density and maturity of collagenization. The LLLT group presented better pattern of organization and maturation of types I and III collagen fibers.

In 15 days (Figure 8), the collagen mesh was composed of thicker and longer collagen fibers, showing a gold-yellow or slightly reddish birefringence, consistent with type I collagen and with a moderate presence of type III collagen in the experimental groups (CVC, LLLT and CVCLT). The fibers were organized in an architectural arrangement clearly parallel to the end of the polyethylene tube, forming less conspicuous and morphologically irregular and narrowed interfibrillar spaces. Although the density of collagenation was very similar between the groups, a thicker and more elongated morphological appearance of the fibers was observed in CVCLT when compared to the other groups.

Regarding the evaluation of types I and III collagen, it was observed that in the 3-day evaluation period, the presence of short, thin and delicate fibers with green birefringence suggestive of type III collagen predominated in all groups (CTR, CVC, LLLT and CVCLT) with no statistical difference between them. In the 8-day period, the only difference observed was between the CVC and CTR group (***) $p < 0.001$ and only for type III collagen. While in the 15-day period, the only significant difference observed was between the CVCLT and CTR groups and between CVCLT and LLLT in the evaluation of type I collagen (* $p < 0.05$) (Figures 6,7,8,9).

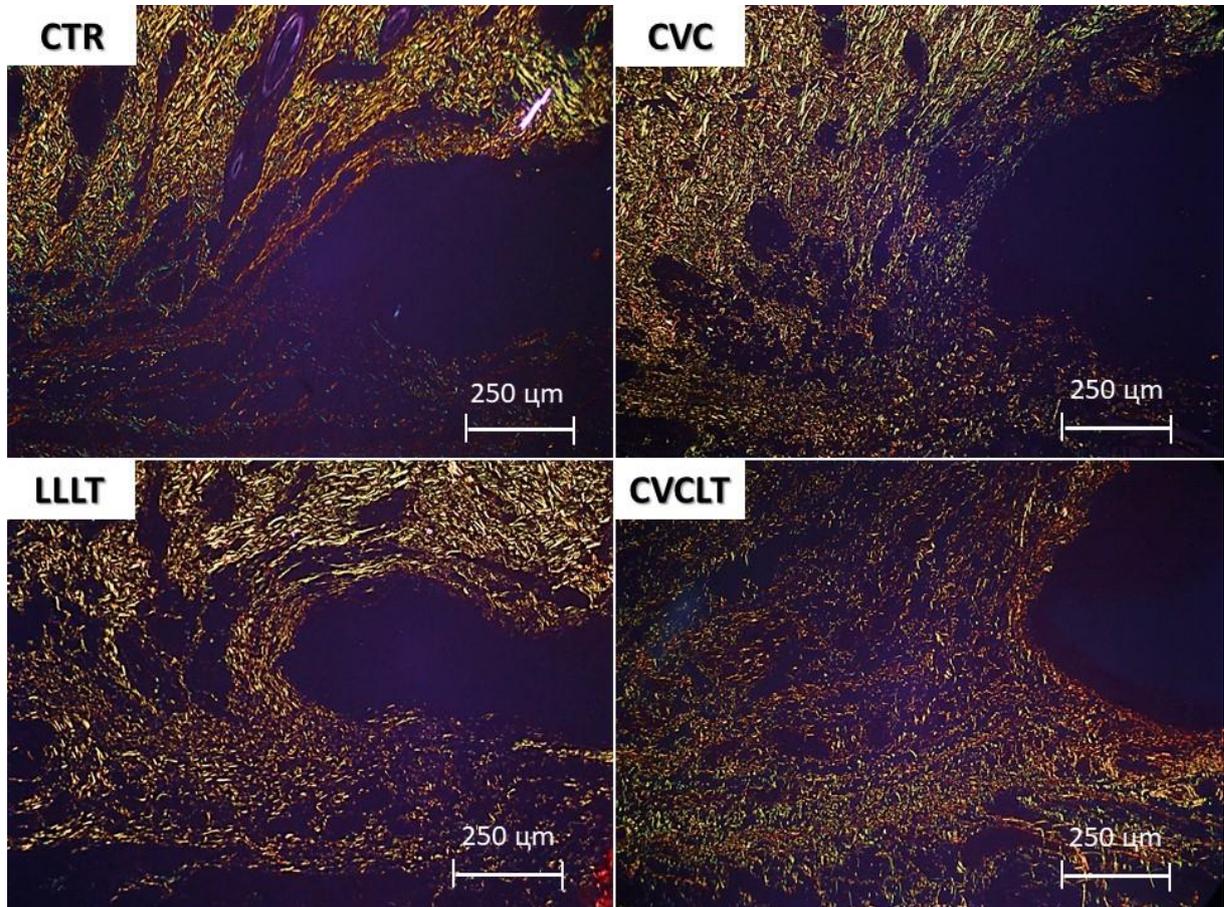


Figure 6. Photomicrographs of histological sections stained in sirius red of the different experimental groups representative of the third day of implantation of the polyethylene tubes (tb). All groups showed predominance of type III collagen. Thin and delicate fibrils of collagen, with short and wavy appearance. Both groups treated with LLLT exhibited higher density of collagen deposition, with clearly less apparent thick interfibrillars.

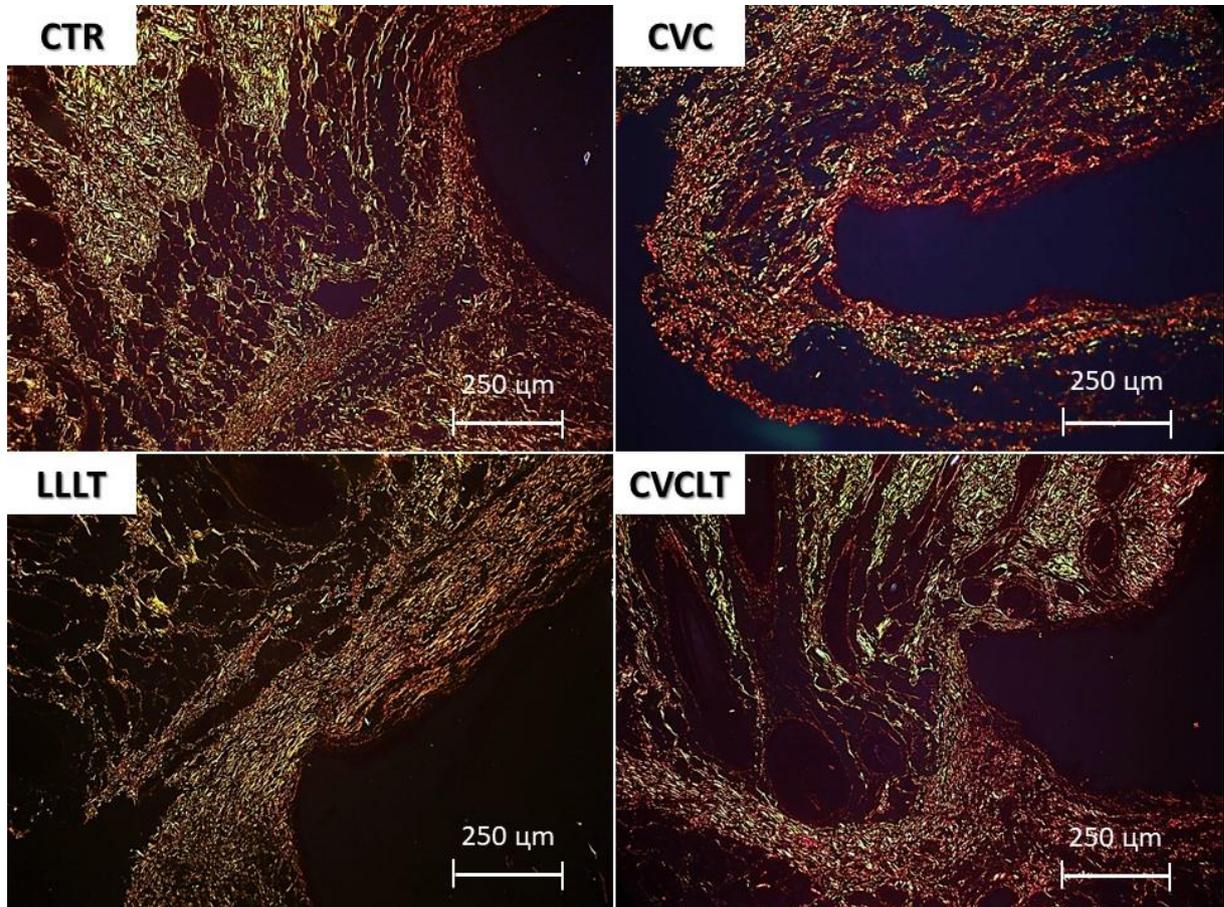


Figure 7. Photomicrographs of histological sections stained with sirius red of the different experimental groups representative of the eighth day of implantation of the polyethylene tubes (tb). All groups showed a predominance of type I collagen. The CTR and CVC groups had thin, irregularly arranged fibers and had very apparent interfibrillar spaces. The LLLT and CVCLT groups present thicker and longer fibers, densely arranged (with little apparent interfibrillar spaces) and with a clearly parallel arrangement.

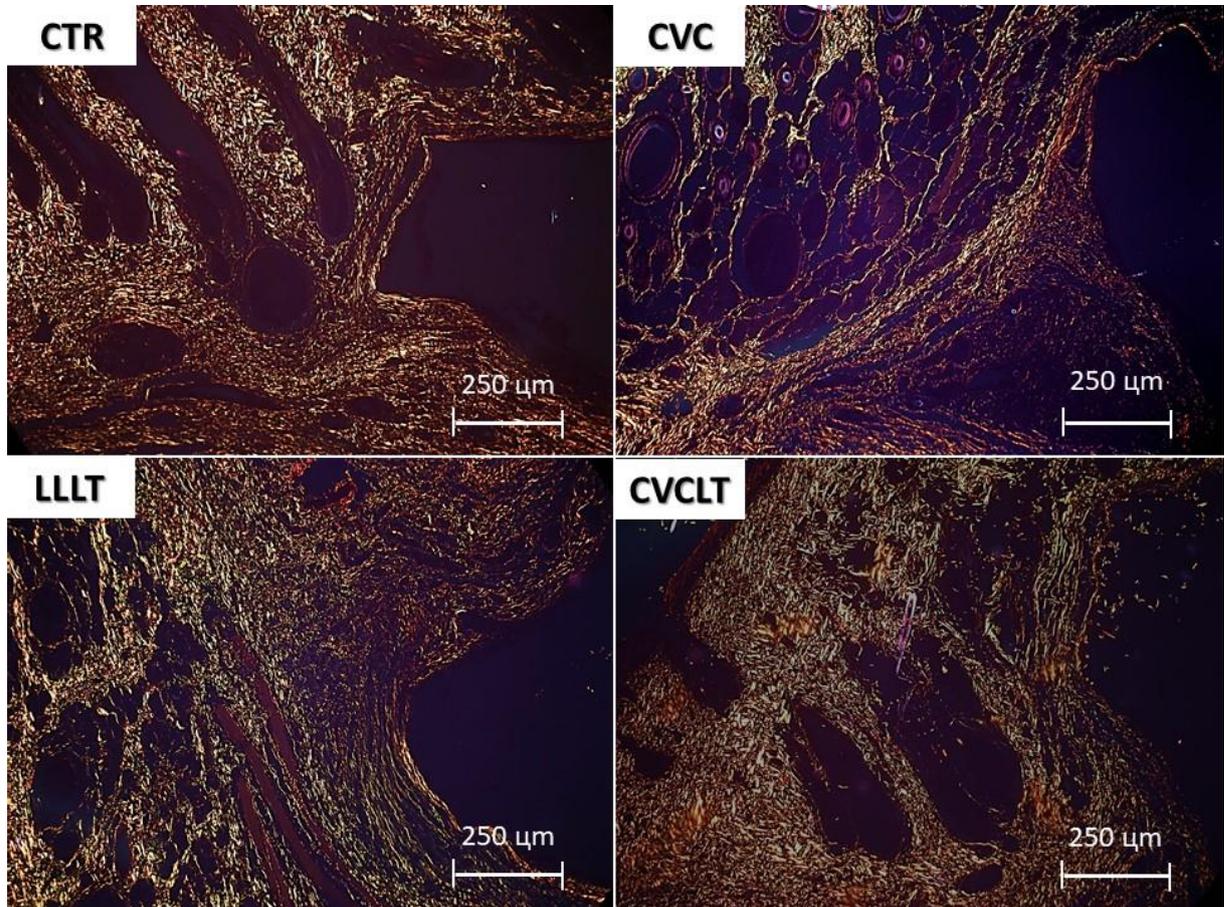


Figure 8. Photomicrographs of histological sections stained with sirius red of the different experimental groups representative of the fifteenth day of implantation of the polyethylene tubes (tb). It is still possible to observe large amounts of type I collagen fibers in all groups (CTR, CVC, LLL and CVCLT). However, it is also possible to observe the presence of type III collagen in the CVC, LLL and CVCLT groups especially highlighted in the latter group.

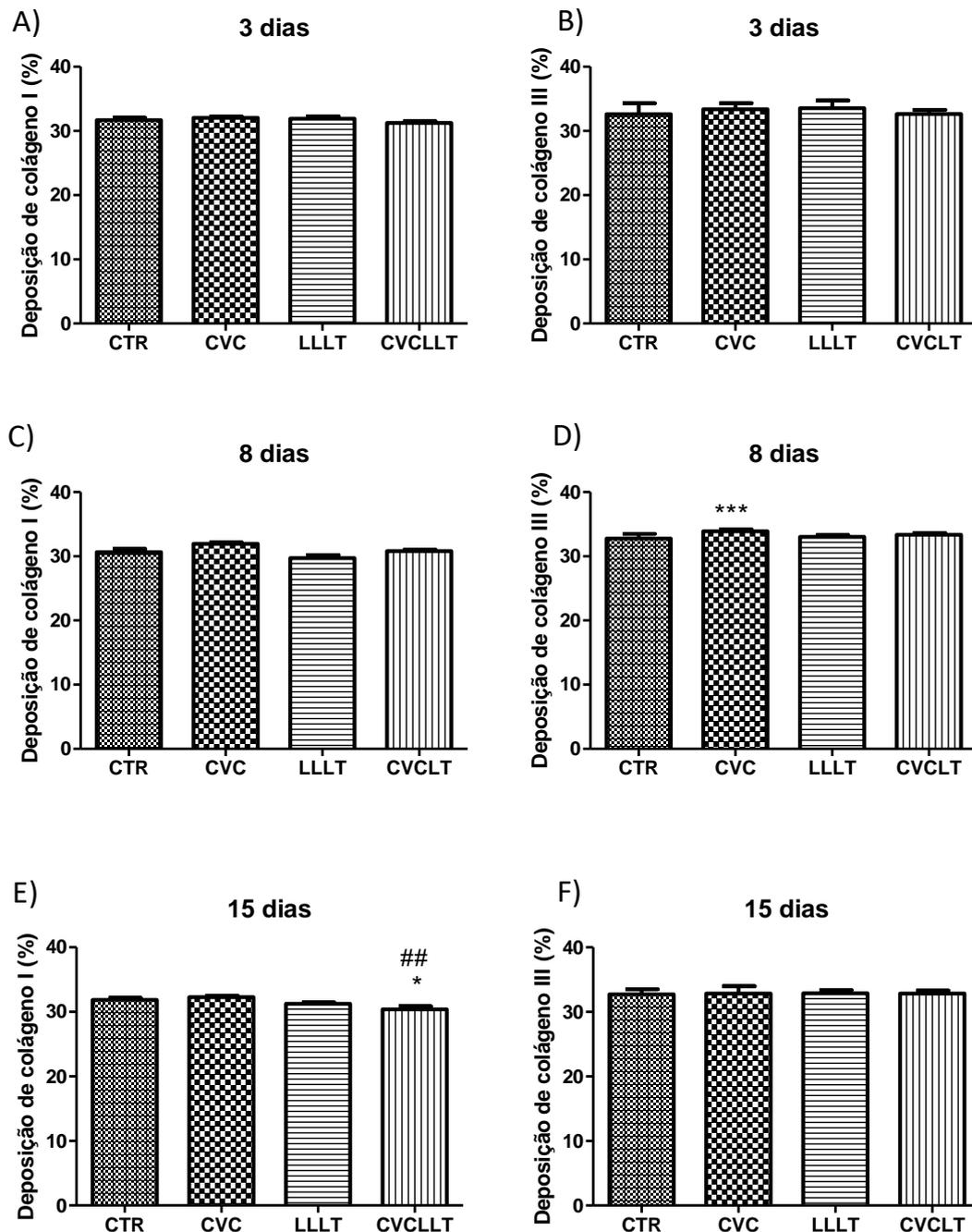


Figure 9. Mean percentage index of the type I and III collagen arrangement in the subcutaneous tissue repair of rats evaluated by sirius red (polarized light, 400x magnification) over the three (A and B), eight (C and D) and 15 experimental days (E and F): CTR (control); CVC (carvacrol); LLLT (laser photobiomodulation) and CVCLT (carvacrol + laser photobiomodulation). Significant difference between CVC and CTR group in the 8-day evaluation of type III collagen (*** $p < 0.001$). # Significant difference between CVCLT and CTR and between CVCLT and LLLT in the evaluation of type I collagen in the 15-day period (* $p < 0.05$). (One-way ANOVA followed by Tukey's test).

4 - Discussion

Research with biomaterials of natural origin has increased due to the search for new substances with higher pharmacological activity, greater biocompatibility and lower toxicity. The importance of knowing better the physical, chemical and biological properties for a correct clinical indication of the biomaterials raise, more and more, the interest in this subject. The objective of this study was to evaluate the tissue response caused by the carvacrol paste associated with or not to laser photobiomodulation (LPBM) at $\lambda 660\text{nm}$ in rat subcutaneous tissue.

Histological analyzes were performed by qualitative and quantitative methods. The qualitative analysis was essential for the understanding of the inflammatory and reparative phenomena, since the intensity of the reaction varies according to the field analyzed, especially in the regions of direct contact between the paste and the tissue, which could mask the results found only by the quantitative analysis. Previous studies have demonstrated this form of evaluation and also suggest the use of a descriptive analysis of observed events.

Carvacrol has anti-inflammatory and antihyperalgesic properties since it reduces the threshold of neuronal excitability and also inhibits the migration of neutrophils, thus reducing inflammatory pain [7,9-12,24,25]. In this study, it was possible to observe the significant reduction of the neutrophil infiltrate in the groups that used carvacrol (CVC and CVCLT), especially in the periods of 3 and 5 days.

The possibility of accelerating the healing and closure of cutaneous lesions, using chemical or physical resources, has been the object of numerous investigations [13,14,29,30]. Lasertherapy has been highlighted as a promoting agent of acceleration of the repair of cutaneous wounds by its biostimulatory effects. In vivo and in vitro studies have demonstrated that laser treatment accelerates biochemical reactions, fibroblast activity, collagen metabolism and neovascularization, as well as promoting the activation of lymphocytes and analgesic and anti-inflammatory effects [13,14,28,31]. These effects were observed in the two groups irradiated with laser light (LLLT and CVCLT) [32,33].

The effects of laser photobiomodulation on the wound healing process is one of the aspects studied in this study. This type of therapy seems to influence all phases of this complex process. Several factors are considered important for the results of the treatments involving the use of the laser and many of the protocols used generate conflicting results. Therefore, the

choice of appropriate parameters is essential for good results to be achieved. These parameters should include wavelength, power density, dose, duration, frequency of applications, among others [13].

The results obtained in the present study from the analysis of the histological grading of the cicatricial repair [27], was the one that better established relationship between the different histological parameters and the progress of the repair, and allowed a better distinction between the phases analyzed. Some adaptations were made to the gradation system, as previously recommended [28], such as the removal of the eosinophils parameter and adjustment of correction factors for chronic inflammation, in order to improve and facilitate the analysis of the data and to establish a better difference between the phases of the repair.

As for the fibroblastic proliferation evaluated in the present study, a higher activity of these cells was verified in the 8 and 15 days period in the LLLT and CVCLT groups compared to the CTR and CVC groups. These results demonstrated the photobiomodulatory effects of the laser in the proliferative phase of the repair, in agreement with other studies [11,13,14,15,28,37] that report the greater interaction of the laser with cells damaged by trauma. In the irradiated groups, in the period of 15 days, a higher proliferative intensity was also observed compared to the CTR and CVC groups.

Collagen showed a significant increase only in CVC (within 8 days) and CVCLT (within 15 days) groups when compared to the other groups at the three evaluation intervals. Studies using the sirius red staining technique, when analyzed by polarized light microscopy, observed collagen through birefringence, in which type I collagen is evident in yellow to red color, while type III collagen fibers are greenish, and the rest of the cells appear black [23,25,26].

The collagen analysis in sirius red staining is able to measure not only the red areas corresponding to collagens I and II, but also the other areas in yellow and green, such as type III collagen. Thus, this technique was shown to be sensitive to changes in the present study, since there were differences between the groups. There was no significant difference in the deposition and distribution of type I and III collagen fibers in the 3-day period, similar to the result of Albuquerque et al. [28].

Vascular neoformation at the beginning of the repair process is essential to carry oxygen and essential nutrients for tissue neoformation, with subsequent regression of these vessels in the remodeling stage. Newly formed vessels are responsible for the recruitment of inflammatory

cells that allow the continued release of proinflammatory cytokines responsible for the prolongation of inflammation. In this study, neoformed vessels were found with greater evidence in the CVC and CVCLT groups (3 and 8 days) differently from the other groups (CTR and LLLT), thus suggesting that carvacrol has angiogenesis capacity as reported in other studies [10-12, 24, 25].

5 - Conclusion

The results obtained in the present study suggest that laser photobiomodulation and carvacrol alone or associated promote biological events favoring the tissue repair of subcutaneous lesions on the dorsum of rats. It should be pointed out that the groups submitted to the combination of the two therapies (CVCLT) presented the best results, accelerating the repair process of the injured area, observed through the decrease of the inflammatory phase and fibroblastic maturation, which suggests better tissue repair.

6 - References

1. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(15): 28-42.
2. Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther.* 2012;133:189-204.
3. Williams DF. *Definitions in biomaterials.* Elsevier. 1987; 72 pp.
4. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JL. *An Introduction to Materials in Medicine,* Elsevier. 2004, 2^a Ed.
5. Pires ALR, Bierhalz ACK, Moreas AM. Biomaterials: Types, applications, and market. *Quim. Nova* 2015, Vol. 38, n.7.
6. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *J Ethnopharmacol.* 2005, 100:131-4.
7. Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcuoglu M, Baser KHC. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem.* 2005, 93:551-6.
8. Klein G, Ruben C, Upmann M. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Curr Microbiol.* 2013, 67:200-8.
9. Yanishlieva N, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999, 64: 59-66.
10. Beena N, Kumar D, Rawat DS. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013, 23:641-5.
11. Melo FHC, Rios ERV, Rocha NFM, Citó MCO, Fernandes ML, Sousa DP. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. *J. Pharm Pharmacol* 2012, 64:1722-9.
12. Landa P, Kokoska L, Pribylova M, Vanek T, Marsik P. In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: inhibitory effect on cox-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. *Arch Pharm Res.* 2009, 32:75-8.
13. Ribeiro MAG, Albuquerque RLC, Barreto ALS, Oliveira VGM, Santos TB, Dantas CDF. Morphological analysis of second- intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² lambda 660-nm laser irradiation. *Indian J Dent Res.* 2009, 20(3):390.

14. Matos FS, Soares AF, Albuquerque Junior RLC, Ribeiro SO, Lima GDN, Novais SMA, Ribeiro MAG. Effect of laser therapy on the inflammatory response induced by endodontic medications implanted into the subcutaneous tissue of rats. *Rev Odontol UNESP*. 2014 Sep.-Oct.; 43(5): 343-350.
15. Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, dosReisFA, Albertini R, de Almeida P, et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochemistry and photobiology*. 2012, 88:1546-1550.
16. Rocha-Junior AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol*. 2006, v.81, n.2, 150-156.
17. Oliveira FS, Pinfildi CE, Parizoto NA, Liebano RE, Bossini PS, Garcia EB, Ferreira LM. Effect of low level laser therapy (830nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg. Med*. 2009, v.41, n.4, 271-276.
18. Fiorio FB, Silveira L, Munin E, de Lima CJ, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, de Carvalho PT, Lopes-Martins RA, Aimbire F, Carvalho RA. Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. *J Cosmet Laser Ther*. 2011, 13(6):315-22.
19. Matos FS, Goldophim FJ, Albuquerque Junior RLC, Paranhos LR, Rode SM, Antonio CTC, Ribeiro MAG. Laser phototherapy induces angiogenesis in the periodontal tissue after delayed tooth replantation in rats. *Journal Of Clinical And Experimental Dentistry*. 2018, v. 10, p. e335-340.
20. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966, March; 21(3): 379-87.
21. Vanholder R, Misottena A, Roelsa H, Mattona G. Cyanoacrylate tissue adhesive for closing skin wounds: a double blind randomized comparison with sutures. *Biomaterials* 1993, 14:737-42.
22. Salka S, Gaspar AMM, Hochuli-Viera E. Adesivos à base de cianoacrilato para síntese de tecido mole. *An. Bras. Dermatol*. 2009, vol.84.
23. Kemper B, Farago EC F, Barca Junior FA, Okano W. Análise comparativa entre a cicatrização de ferida cutânea tratada com adesivo de éster de cianoacrilato (SuperBonder®) e sutura intradérmica com náilon em ratos da linhagem Wistar. *Revista. Rev. Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2015, v.9, n.2) 223-232.

24. Guimarães AG, Xavier MA, Santana MT, Camargo EA, Camargo CA, Santos FA, Brito EO, Barreto SC, Cavalcanti-Junior RLA, Antonioli RC, Quintans-Júnior LJ. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2012, 385(3): 253-263
25. Lima MS, Quintans-Junior LJ, De Santana WA, Martins Kaneto C, Pereira SMB, Villarreal CF. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur J Pharmacol* 2013; 699(1-3): 112-117.
26. Fraceto LF, Gonçalves MM, Moraes CM, de Araújo DR, Zanella L, de Paula E; Pertinhez TA. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. *Quim Nova* 2007, Vol. 30, No. 5, 1203-1207.
27. Myers AH, Postlethwait RW, Smith AG. Histologic grading of experimental healing wound. *Archives of Surgery Journal* 1961, 83, 147-150.
28. Albuquerque-Junior RLC, Barreto SAL, Pires AJ, Reis PF, Lima OS, Ribeiro MAG, Cardoso CJ. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int. J. Morphol.* 2009, 27(4):1105-1110.
29. Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, Duscher D, Walmsley GG, Hu M, Senarath- Yapa K, McArdle A, Tevlin R, Wearda T, Paik KJ, Duldulao C, Hong WX, Gurtner GC, Longaker MT. Wound healing: an update. *Regen Med.* 2014, 9(6): 817-30.
30. Childs DR, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am.* 2017;97(1):189-207.
31. Loreti EH, Pascoal VL, Nogueira BV, Silva IV, Pedrosa DF. Use of laser therapy in the healing process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2015, Feb; 33(2):104- 16
32. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005;31:334- 9.
33. Silveira PCL, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in na animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2011, 26:125-131.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de reparo de feridas é um fenômeno biológico fundamental e que envolve uma gama de eventos biológicos com o intuito de reparar o tecido lesado e qualquer interferência neste organizado processo pode levar ao prolongamento desta etapa. As pesquisas com o uso de biomateriais associados a fotobiomodulação a laser devem ser estimuladas, para que seus parâmetros sejam melhor compreendidos, padronizados e os seus benefícios possam ser ampliados as mais diversas indicações. Os resultados deste estudo evidenciaram que a associação da pasta de carvacrol e fotobiomodulação a laser mostrou-se eficiente quanto a diminuição do infiltrado inflamatório especialmente neutrofílico logo após a injúria ao tecido até a fase inicial do reparo tecidual.

6. COMUNICADO DE IMPRESSA

AVALIAÇÃO DO USO DE CARVACROL ASSOCIADO À FOTOBIMODULAÇÃO A LASER NA REAÇÃO TECIDUAL

A utilização de biomateriais extraídos de plantas medicinais e a resposta de cicatrização de feridas é uma constante evolução que apresenta cada vez mais um avanço técnico-científico. Outro recurso amplamente utilizado na Odontologia é a fotobiomodulação à laser (FTL), a qual apresenta efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e de reparação celular. Na dissertação apresentada pelo discente Ismário Silva de Meneses, orientada pela Prof.^a Dr.^a Maria Amália Gonzaga Ribeiro, avaliou-se a reação tecidual da utilização do biomaterial de origem natural, carvacrol, de forma isolada e associado a fotobiomodulação a laser de forma experimental, em subcutâneo de ratos. Conclui-se que, a associação do carvacrol e fotobiomodulação a laser, diminui o infiltrado inflamatório e acelerou o processo cicatricial através da maturação de células fibroblásticas indispensáveis na cicatrização.

Os autores agradecem à FAPITEC/SE (Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelos subsídios obtidos para a realização deste trabalho por meio do PROMOB.

7. REFERÊNCIAS

- Albuquerque-Junior RLC, Barreto SAL, Pires AJ, Reis PF, Lima OS, Ribeiro MAG, Cardoso CJ. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int. J. Morphol.* 2009, 27(4):1105-1110.
- Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther.* 2012, 133:189-204.
- Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New England Journal of Medicine.* 1978, v. 298, n. 12, p. 659–668.
- Beena N, Kumar D, Rawat DS. Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013, 23:641–5.
- Boateng J, Catanzano O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing-a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015, 104 (11): 3653 - 3680.
- Boschi ES, Leite CE, Saciura VC, Caberlon E, Lunardelli A, Bitencourt S, Melo DA, Oliveira JR. Anti-Inflammatory effects of low-level laser therapy (660 nm) in the early phase in carrageenan-induced pleurisy in rat. *Lasers Surg Med.* 2008, Sep;40(7):500-8.
- Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *J Ethnopharmacol.* 2005, 100:131-4.
- Chhabra S, Chhabra N, Kaur A, Gupta N. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. *Journal of maxillofacial and oral surgery* 2017, v. 16, n. 4, p. 403–423.
- Childs DR, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am.* 2017;97(1):189-207.
- Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med.* 2007, 39(9):706–715.
- Fiorio FB, Silveira L, Munin E, de Lima CJ, Fernandes KP, Mesquita-Ferrari RA, de Carvalho PT, Lopes-Martins RA, Aimbire F, Carvalho RA. Effect of incoherent LED radiation on third-degree burning wounds in rats. *J Cosmet Laser Ther.* 2011, 13(6):315-22.
- Fraceto LF, Gonçalves MM, Moraes CM, de Araújo DR, Zanella L, de Paula E; Pertinhez TA. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. *Quim Nova* 2007, Vol. 30, No. 5, 1203-1207.

Guimarães AG, Xavier MA, Santana MT, Camargo EA, Camargo CA, Santos FA, Brito EO, Barreto SC, Cavalcanti-Junior RLA, Antonioli RC, Quintans-Júnior LJ. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2012, 385(3): 253-263

Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010, 89: 219-229.

Ipek E, Zeytinoglu H, Okay S, Tuylu BA, Kurkcuoglu M, Baser KHC. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem*. 2005, 93:551-6.

Karu, TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation. *Lasers in the Life Sciences* 1988, 2:53–74.

Kemper B, Farago EC F, Barca Junior FA, Okano W. Análise comparativa entre a cicatrização de ferida cutânea tratada com adesivo de éster de cianocrilato (SuperBonder®) e sutura intradérmica com náilon em ratos da linhagem Wistar. *Revista. Rev. Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2015, v.9, n.2) 223-232.

Klein G, Ruben C, Upmann M. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Curr Microbiol*. 2013, 67:200-8.

Landa P, Kokoska L, Pribylova M, Vanek T, Marsik P. In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: inhibitory effect on cox-2 catalyzed prostaglandin E2 biosynthesis. *Arch Pharm Res*. 2009, 32:75-8.

Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, dosReisFA, Albertini R, de Almeida P, et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochemistry and photobiology*. 2012, 88:1546-1550.

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007, v. 25, n. 1, p. 9–18.

Lima MS, Quintans-Junior LJ, De Santana WA, Martins Kaneto C, Pereira SMB, Villarreal CF. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *Eur. J. Pharmacol* 2013, 699(1-3): 112-117.

Loreti EH, Pascoal VL, Nogueira BV, Silva IV, Pedrosa DF. Use of laser therapy in the healing process: a literature review. *Photomed Laser Surg*. 2015 Feb;33(2):104- 16.

- Maimone TJ, Baran PS. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nature Chemical Biology*. 2007, 3(7).
- Marchionni AMT, Medrado AP, Silva TMC, Fracassi LD, Pinheiro ALB, Reis SRA. Influence of Laser ($\lambda 670$ nm) and Dexamethasone on the Chronology of Cutaneous Repair. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010, v28; n5.
- Matos FS, Soares AF, Albuquerque Junior RLC, Ribeiro SO, Lima GDN, Novais SMA, Ribeiro MAG. Effect of laser therapy on the inflammatory response induced by endodontic medications implanted into the subcutaneous tissue of rats. *Rev Odontol UNESP*. 2014 Sep.-Oct.; 43(5): 343-350.
- Matos FS, Godolphim FJ, Correia AMO, Albuquerque Junior RLC, Paranhos LR, Rode SM, Ribeiro MAG. Effect of laser photobiomodulation on the periodontal repair process of replanted teeth. *Dental Traumatology*. 2016, v. 32, p. 402-408
- Matos FS, Goldophim FJ, Albuquerque Junior RLC, Paranhos LR, Rode SM, Antonio CTC, Ribeiro MAG. Laser phototherapy induces angiogenesis in the periodontal tissue after delayed tooth replantation in rats. *Journal Of Clinical And Experimental Dentistry*. 2018, v. 10, p. e335-340.
- Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SR. Effect of low-power Laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine* 2010, v. 31, n. 4, p. 263-267.
- Melo FHC, Rios ERV, Rocha NFM, Citó MCO, Fernandes ML, Sousa DP. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. *J. Pharm Pharmacol* 2012, 64:1722-9.
- Mura P, Faucci MT, Bermanti MG. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of binary systems of econazole with cyclodextrins 1999, 85–95.
- Myers AH, Postlethwait RW, Smith AG. Histologic grading of experimental healing wound. *Archives of Surgery Journal* 1961, 83, 147-150.
- Nes AG, Posso MB. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: Pain therapy using low intensity Lasers. *IntNurs Ver*. 2005, 52:68-72.

Oliveira FS, Pinfildi CE, Parizoto NA, Liebano RE, Bossini PS, Garcia EB, Ferreira LM. Effect of low level laser therapy (830nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneous tendon. *Lasers Surg. Med.* 2009, v.41, n.4, 271-276.

Ozturk H, Cetinkaya A, Duzcu SE, Tekce BK, Ozturk H. Carvacrol attenuates histopathologic and functional impairments induced by bilateral renal ischemia/reperfusion in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018, 98, 656–661.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moreas AM. Biomaterials: Types, applications, and market. *Quim. Nova* 2015, Vol. 38, n.7.

Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005;31:334- 9.

Ram M, Singh V, Kumawat S, Kant V, Tandan SK, Kumar D. Bilirubin modulated cytokines, growth factors and angiogenesis to improve cutaneous wound healing process in diabetic rats. *Int Immunopharmacol.* 2016, Jan; 30:137-49.

Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JL. *An Introduction to Materials in Medicine*, Elsevier. 2004, 2^a Ed.

Ribeiro MAG, Albuquerque RLC, Barreto ALS, Oliveira VGM, Santos TB, Dantas CDF. Morphological analysis of second- intention wound healing in rats submitted to 16 J/cm² lambda 660-nm laser irradiation. *Indian J Dent Res.* 2009, 20(3):390.

Ribeiro, MAG, Albuquerque RLC, Ramalho LM, Pinheiro AL, Bonjardim LR, Cunha SS. Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm. *Photomed. Laser Surg.* 2009, 27, 49-55.

Rocha-Junior AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol.* 2006, v.81, n.2, 150-156.

Salka S, Gaspar AMM, Hochuli-Viera E. Adesivos à base de cianoacrilato para síntese de tecido mole. *An. Bras. Dermatol.* 2009, vol.84.

Santos DR, Liebano RE, Baldan CS, Masson IB, Soares RP, Esteves Junior I. The low-level laser therapy on muscle injury recovery: literature review. *J. Health SciInst.* 2010, 28:286–288.

- Silveira PCL, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2011, 26:125-131.
- Smigiel KS, Parks WC. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. *Current rheumatology reports* 2018, v. 20, n. 4, p. 17.
- Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966, March; 21(3): 379-87.
- Turhani D, Scheriau M, Kapral D, Benesch T, Jonke E, Bantleon HP. Pain relief by single low-level laser irradiation in orthodontic patients undergoing fixed appliance therapy. *Am J Orthod. Dentofacial Orthop.* 2006, 130(3):371–377.
- Vanholder R, Misottena A, Roelsa H, Mattona G. Cyanoacrylate tissue adhesive for closing skin wounds: a double blind randomized comparison with sutures. *Biomaterials* 1993, 14:737-42.
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009, 37:15 28-42.
- Wang PH; Huang B.S; Horng HC; Yeh CC; Chen YJ. Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association* 2018, 94-101.
- Williams DF. *Definitions in biomaterials.* Elsevier. 1987, 72 pp.
- Wu Y, Chen S. Apoptotic cell: link age of inflammation and wound healing. *Frontiers in Pharmacology.* 2014 (1): 1-6.
- Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, Serhan CN, Ji RR. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature medicine.* 2010, 16:592-597.
- Yanishlieva N, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999, 64: 59-66.
- Young A, McNaught CE. *The physiology of wound healing.* Surgery (Oxford). 2011, v. 29, n. 10, p. 475–479.

Zielins ER, Atashroo DA, Maan ZN, Duscher D, Walmsley GG, Hu M, Senarath- Yapa K, McArdle A, Tevlin R, Wearda T, Paik KJ, Duldulao C, Hong WX, Gurtner GC, Longaker MT. Wound healing: an update. *Regen Med.* 2014, 9(6): 817-30.

Zhu W, Chen M, Shou Q, Li Y, Hu F. Biological activities of chinese propolis and brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011, 468529.