

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

**ELAINE PAIVA MORAES GONÇALVES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE  
CICATRIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO  
FRUTO DE AROEIRA-VERMELHA (*SCHINUS  
TEREBINTHIFOLIUS* RADDI) EM RATAS COM  
DIABETES MELLITUS**

Vitória  
2012

**ELAINE PAIVA MORAES GONÇALVES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CICATRIZAÇÃO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DO FRUTO DE AROEIRA-VERMELHA (*SCHINUS  
TEREBINTHIFOLIUS* RADDI) EM RATAS COM DIABETES  
MELLITUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa Dra Surama Freitas Zanini

Co-orientador: Profa Dra Ágata Lages Gava

Vitória  
2012

**ELAINE PAIVA MORAES GONÇALVES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CICATRIZAÇÃO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DO FRUTO DE AROEIRA-VERMELHA (*SCHINUS  
TEREBINTHIFOLIUS* RADDI) EM RATAS COM DIABETES  
MELLITUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Vitória, 13 de Abril de 2012.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profª Drª Ágata Lages Gava  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Co-orientadora

---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Membro Interno

---

Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira  
Instituto Federal de Ensino Superior (IFES-ES)  
Membro Externo

Vitória  
2012

Dedico

À Deus todo poderoso criador do Céu e da Terra,

À minha amada família: meu eterno Fabiano e inigualáveis filhos: João e Pedro.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a Deus por me conceder força e perseverança para concluir este trabalho

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo

A todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial as seguintes pessoas:

À professora Dra Surama Freitas Zanini pela amizade e oportunidade de realizar este trabalho

À professora Dra Ágata Lages Gava pela amizade, elaboração desta dissertação

À meu esposo Fabiano pela compreensão, incentivo, muita paciência e grande ajuda na execução deste

As colegas Liliane Bonella pela amizade e incentivo, Pós-Doutoranda Mariana Drummond pela colaboração, a graduanda Emanuelle Gabrielly pela ajuda e a Ms Mariana Lorenção por sua grande ajuda nas análises laboratoriais

À patologista Dra Nair Massako Katayama Ito pela leitura das lâminas

À professora Dra Neuza Maria Brunoro por disponibilizar o biotério

Ao Médico Veterinário Paulo Sérgio C. de Andrade pela ajuda no desenvolvimento deste projeto

À Prof.<sup>a</sup> Dra Lenir Cardoso pelos conselhos e ajuda durante este projeto

Ao meu cunhado professor Dr. Fabrício Gomes Gonçalves e à professora Dra Juliana Giannot pela ajuda nas análises estatísticas

À secretária do programa Lília Bastos

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro concedido para execução desta pesquisa

“Sábio é aquele que conhece os limites  
da própria ignorância.”

Sócrates

## RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica que decorre da ausência de insulina e/ou incapacidade da mesma em exercer adequadamente seus efeitos. Considerando que dentre as principais consequências do diabetes encontra-se a dificuldade de cicatrização e tendo em vista o potencial anti-inflamatório e cicatrizante da aroeira, objetivou-se avaliar o uso tópico de óleo essencial do fruto de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) sobre o processo de cicatrização de lesões em ratas submetidas a um modelo experimental de diabetes aloxânico tipo I. Após a confirmação do diabetes, as ratas foram submetidas à retirada de tecido subcutâneo e divididas de acordo com o tratamento tópico (21 dias) recebido em grupo controle (CT), óleo comercial (OC) e aroeira vermelha (AV). A lesão foi avaliada macroscopicamente e microscopicamente no período 7, 14 e 21 dias pós-operatório. A análise macroscópica mostrou irritação local no grupo AV, entretanto a análise microscópica demonstrou um processo de cicatrização acelerado neste grupo em comparação ao grupo CT e OC ao 7º dia de tratamento, não havendo diferença no processo de cicatrização aos 14º e 21º dias de tratamento. Concluiu-se que após 7 dias de tratamento, o óleo essencial de aroeira vermelha mostrou efeito benéfico na cicatrização de lesões em animais diabéticos.

**Palavras-chaves:** Diabetes Mellitus, Cicatrização, aroeira-vermelha, *Schinus terebinthifolius* Raddi

## ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disease that arises from the absence of insulin and/or an inability to exhibit in a proper manner their effects. Considering that the difficulty in healing is one of the major diabetes consequences and that the pink pepper has anti-inflammatory and healing potential, we aimed to evaluate the topical use of essential oil of Brazilian red-pepper fruit (*Schinus terebinthifolius* Raddi) on the healing process of lesions in rats subjected to an experimental model of diabetes type I Aloxanic. After the confirmation of diabetes, the rats were subjected to the removal of subcutaneous tissue in the dorsal region of the animal and divided n groups to the received local treatment (21 days) in control (CT), commercial oil (OC) and Brazilian red-pepper (AV). After surgery, the lesion was macroscopically and microscopically evaluated in the period of 7, 14 and 21 days. The macroscopic analysis revealed a local irritation in PP group, however the microscopic analysis showed an accelerated healing process in this group in comparison with CT and CO animals at the 7<sup>th</sup> treatment day, with no differences at the 14<sup>th</sup> and 21<sup>st</sup> day. Therefore, we can conclude that after 7 days of treatment, the Brazilian red-pepper oil has a beneficial effect on the healing process of diabetic animals.

**Keywords:** Diabetes Mellitus, Healing, Brazilian red-pepper, *Schinus terebinthifolius* Raddi

## LISTA FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Anatomia da Pele (Baranoski, 2001).....	21
<b>Figura 2</b>	Esquema histológico do tecido conjuntivo e tecido epitelial de revestimento.....	22
<b>Figura 3</b>	Representação gráfica da resposta normal da pele a feridas, mostrando as principais células envolvidas durante cada fase do processo de cicatrização (adaptado de Gray <i>et al.</i> In:Isaac, <i>et al.</i> , 2010).....	24
<b>Figura 4</b>	A) Frutos e B) Árvore da <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi Fonte: <a href="http://www.saladeayurveda.com/2010/01/farmacia-na-cozinha-parte-ii.html">http://www.saladeayurveda.com/2010/01/farmacia-na-cozinha-parte-ii.html</a> .....	30
<b>Figura 5</b>	Fluxograma de distribuição dos grupos experimentais segundo o tratamento e tempo de observação.....	39
<b>Figura 6</b>	Valores plasmáticos de glicose dos animais diabéticos no período antes e pós indução ao DM e nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de tratamento. **p<0,01 vs. antes da indução.....	43
<b>Figura 7</b>	Média de peso corporal dos animais diabéticos no período antes e pós indução ao DM e nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de tratamento. *p<0,05 vs. antes da indução.....	45
<b>Figura 8</b>	Volume urinário de 24 horas dos animais diabéticos no período antes e pós indução ao DM e nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de tratamento. *p<0,05 todos os grupos vs antes da indução.....	46
<b>Figura 9</b>	Glicosúria em mg/dL dos animais antes e após indução ao DM e nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de tratamento. **p<0,01 todos os grupos vs. antes da indução.....	47

<b>Figura 10</b>	Níveis séricos de creatinina (A) e uréia (B) nos três grupos experimentais antes da indução ao DM e ao final do experimento. *p<0,05 e **p<0,01 vs. antes da indução ao DM.....	48
<b>Figura 11</b>	Níveis séricos Colesterol (A) e Triglicerídeos (B) nos grupos experimentais antes da indução ao DM e ao término do experimento. **p<0,01 vs. antes da indução ao DM, #p<0,01 vs. OC.....	50
<b>Figura 12</b>	Níveis séricos de AST (A) e ALT (B) nos grupos experimentais antes da indução ao DM e ao término do experimento. **p<0,01 vs. antes da indução ao DM, #p<0,01 vs. OC, &p<0,01 AV vs. CT.....	52
<b>Figura 13</b>	Evolução da cicatrização referente à presença de crosta nos três tratamentos: CT- A, OC - B e AV-C no 7º dia de avaliação.....	54
<b>Figura 14</b>	Evolução da cicatrização referente à presença de crosta nos três tratamentos: A = CT, B = OC e C = AV no 14º dia de avaliação....	55
<b>Figura 15</b>	Evolução da cicatrização referente à presença de crosta na avaliação macroscópica de lesão tratadas em três diferentes grupos A = CT, B = OC e C = AV, 21 º dia.....	55
<b>Figura 16</b>	Avaliação macroscópica de irritação tecidual ao redor da lesão nos diferentes grupos estudados. CT- Soro Fisiológico (A, D e G; tempo 7, 14 e 21 dias respectivamente), OC- Óleo comercial (B, E, e H; tempo 7, 14 e 21 dias respectivamente) e AV- Óleo essencial de Aroeira (C,F e I; tempo 7, 14 e 21 dias respectivamente).....	56
<b>Figura 17</b>	Avaliação macroscópica quanto à presença de reepitelização completa de lesão nos diferentes grupos estudados. CT-A, OC - B, e AV - C com 14 dias de tratamento e D, E e F ao 21º dia de tratamento nos grupos CT, OC e AV respectivamente.....	57

<b>Figura 18</b>	Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal CT apresentando proliferação de tecido de granulação, predominando macrófagos ativados, neutrófilos e hemácias (A), menos significativamente fibroblastos (B) e células endoteliais em proliferação (C).....	60
<b>Figura 19</b>	Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal OC apresentando tecido de granulação formado sob coágulo de sangue (seta), tecido conjuntivo neoformado de grande extensão (A), discreta infiltração de neutrófilos e predomínio de monócitos, colágeno, fibras elásticas, vasos neoformados e fibroblastos(B)...	60
<b>Figura 20</b>	Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal AV apresentando epiderme com aproximação das bordas coberta por crosta de exsudato plasmático com neutrófilos degenerados (seta) e a derme unida por novo tecido conjuntivo, proliferação predominante de fibroblastos (A), poucos vasos neoformados (B) e deposição de colágeno.....	61
<b>Figura 21</b>	Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal CT no 14º dia de tratamento apresentando tecido de granulação em pico de deposição de colágeno (A), poucos vasos neoformados(B) e fibroblastos (C).....	62
<b>Figura 22</b>	Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal OC no 14º dia de tratamento apresentando tecido de granulação com predomínio de colágeno (A) e menos significativamente fibroblastos e vasos neoformados (B).....	62
<b>Figura 23</b>	Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal OC no 14º dia de tratamento apresentando tecido de granulação colagenizado e com fibras elásticas esparsas (A).....	63

## LISTA TABELA

<b>Tabela 1</b>	Relação dos padrões de terpênicos e dos compostos encontrados na amostra de óleo essencial de aroeira-vermelha ( <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi), submetidos à cromatografia gasosa com detector espectrométrico de massas.....	36
<b>Tabela 2</b>	Avaliação histológica no 7º dia tratamento nos grupos CT, OC e AV.....	59
<b>Tabela 3</b>	Avaliação histológica no 14º dia tratamento nos grupos CT, OC e AV.....	61
<b>Tabela 4</b>	Avaliação histológica no 21º dia tratamento nos grupos CT, OC e AV.....	64

## LISTA DE SIGLAS

AGE	Advanced Glication Endproducts
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
AV	Grupo Tratado com Óleo de Aroeira
CT	Grupo Tratado com Solução NaCl 0.9%
DM	Diabetes Mellitus
GLUT	Transportador de Glicose
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL	Interleucina
IRS	Receptor de Insulina
MCP	Proteína Quimiotática de Macrófago
MEC	Matriz Extracelular
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófago
MMP	Matriz Metalloproteína
OC	Grupo Tratado com Óleo Comercial
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do Crescimento Beta

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
1.1	Diabetes Mellitus .....	15
1.2	Fisiopatologia do DM .....	15
1.3	Morfologia e Fisiologia da Pele Humana .....	20
1.4	Ferida e Cicatrização .....	22
1.5	Plantas Medicinais .....	28
1.5.1	<i>Caracterização da aroeira-vermelha (Schinus terebinthifolius Raddi)</i> .....	29
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVO .....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1	Extração do Óleo de aroeira .....	35
3.2	Animais Experimentais .....	36
3.3	Indução ao Diabetes Mellitus .....	37
3.4	Excisão cirúrgica .....	37
3.5	Avaliação Macroscópica .....	39
3.6	Análise Histológica .....	40
3.7	Análise Estatística .....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1	Glicemia, Peso Corporal, Volume Urinário de 24 horas e Glicosúria .....	42
4.2	Creatinina e Uréia .....	47
4.3	Colesterol e Triglicerídeos .....	49
4.4	AST e ALT .....	51
4.5	Avaliação Tecidual Macroscópica .....	53
4.6	Avaliação Tecidual Microscópica .....	59
5	CONCLUSÃO .....	67
6	REFERÊNCIAS .....	68
	ANEXO .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla que decorre da ausência de insulina e/ou incapacidade da mesma em exercer adequadamente seus efeitos e configura-se hoje como epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. O envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilos de vida pouco saudáveis, como sedentarismo e dieta inadequada, contribuem de maneira significativa para o aumento da incidência e prevalência do diabetes em todo o mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde, o número de portadores de DM no ano 2000 era 177 milhões, com expectativa de alcançar 350 milhões de pessoas em 2025. Na atualidade, estima-se que no Brasil esta doença atinge quase 12 milhões de indivíduos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Um indicador macroeconômico a ser considerado é que o diabetes cresce mais rapidamente em países pobres e em desenvolvimento, o que gera impacto negativo devido à morbimortalidade precoce que atinge pessoas ainda em plena vida produtiva, onerando a previdência social e contribuindo para a continuidade do ciclo vicioso da pobreza e da exclusão social (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

### 1.2 Fisiopatologia do DM

Em condições fisiológicas, a manutenção da glicemia é garantida principalmente pela secreção de insulina e glucagon sendo também hormônios hiperglicemiantes o hormônio de crescimento (Gh), cortisol e catecolaminas. A insulina é um importante

hormônio anabólico que desempenha um papel significativo na regulação do metabolismo de carboidratos, no armazenamento de glicogênio, na síntese de ácidos graxos, no transporte de aminoácidos e síntese de DNA, RNA e proteínas (ANDERSON *et al.* 1974).

Este hormônio é produzido pelas células das “Ilhotas de Langherans”, a porção endócrina do pâncreas. As ilhotas são agrupamentos de diferentes tipos celulares, dos quais a maioria é de células beta ( $\beta$ ), responsáveis pela síntese e secreção de insulina, estimuladas pela concentração de glicose no sangue (NATTRAS & HALLES 1988). Sua síntese ocorre a partir da transcrição e tradução do gene da insulina, com a formação da pré e pró-insulina no retículo endoplasmático. Posteriormente pela remoção da sequência contendo 24 resíduos de aminoácidos, formam a pré-insulina. No complexo de Golgi, esta é armazenada nos grânulos de secreção, onde por clivagem forma o peptídeo C inativo e a insulina, sendo esta última à forma com potencial biológico (ELIASSON *et al.*, 2008).

A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula B pancreática, sendo a glicose o mais importante. A glicose é transportada para o interior da célula pancreática por uma proteína de membrana, denominada Transportador de glicose (GLUT-2). Após entrar na célula a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato pela glicoquinase, esta enzima é caracterizada como o sensor da glicose nas células secretoras de insulina. O piruvato formado no citoplasma é transportado para a mitocôndria e convertido a acetilCoA pela piruvato desidrogenase (PDH). Subsequentemente, a acetilCoA entra no ciclo de Krebs levando a um aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH<sub>2</sub>), este metabolismo gera Adenosina Trifosfato (ATP) e a relação ATP/ADP aumenta no citoplasma (MATSCHINSKY, 1995). Com essa relação ATP/ADP aumentada resulta na inibição dos canais  $K_{ATP}$  e na despolarização da célula, levando a abertura dos canais de cálcio, e conseqüentemente aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular desencadeando o processo de exocitose da insulina pela célula  $\beta$  pancreática (PRENTKI & CORKEY, 1996).

A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor glicoproteico de membrana plasmática, composto por duas subunidades  $\alpha$  voltadas para o meio extracelular e ligadas por pontes dissulfetos a duas subunidades  $\beta$

transmembrânicas. Assim este receptor é composto por dois dímeros  $\alpha$ - $\beta$  unidos entre si por outra ponte dissulfídica. A ligação da insulina com o seu receptor leva a ativação tirosina quinase, que reside na porção citoplasmática da subunidade  $\beta$ , levando a autofosforilação do receptor em quatro substratos do receptor de insulina homólogos e específicos (IRS). Cada uma destas IRS-fosfotirosinas serve como local de ancoragem e ativação para outras proteínas quinases, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que incluem ativação ou inibição de enzimas envolvidas no metabolismo de glicose e translocação de GLUTs para a membrana plasmática (KOEPPEN & STANTON, 2004).

A carência de insulina não afeta a captação de glicose pelo cérebro, eritrócitos, rins, ilhotas de Langerhans e células hepáticas. Assim, o fornecimento de glicose para o cérebro é garantido mesmo quando há redução da glicemia para as ilhotas de Langerhans, que através da entrada de glicose proporcional à glicemia, respondem com a liberação de insulina e glucagon para as hemácias que obtêm energia exclusivamente através da glicose. O fígado é permeável à glicose sem a intervenção da insulina, mas depende desta para que a glicoquinase seja sintetizada e esta, por sua vez, atua na glicogênese. Somente os GLUTs que atuam nos músculos e adipócitos são sensíveis à insulina (MARZZOCO & TORRES, 1999).

Baseando-se na fisiopatologia da DM, em 1997, a American Diabetes Association propôs uma classificação que foi posteriormente aceita pela OMS e pela Sociedade Brasileira de Diabetes: DM tipo 1, DM tipo 2 e outros tipos específicos de diabetes, como DM gestacional, DM decorrente pancreatite e DM induzida por fármacos, dentre outras (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; OLIVEIRA, 2004).

O DM tipo 1 acomete 5-10% dos pacientes e resulta de destruição auto-imune das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006). Esse tipo da doença é diagnosticado principalmente na infância e juventude e os pacientes têm como características a necessidade diária de insulina, a grande oscilação na glicemia e a tendência a desenvolver cetoacidose diabética. No momento do diagnóstico a maioria dos pacientes já tem cerca de 85% das células  $\beta$  pancreáticas destruídas (OLIVEIRA, 2004).

O DM tipo 2 manifesta-se em 90-95 % dos pacientes e é caracterizada por resistência à insulina e/ou deficiência relativa na sua secreção. Possui forte predisposição genética, porém esse fator ainda não está bem definido devido à sua complexidade. Fatores de risco como obesidade também estão envolvidos no desenvolvimento deste tipo de DM (GABBAY *et al.*, 2003; VELLOZO & PIMAZONI NETTO, 2008; MAUVAIS-JARVIS *et al.*, 2000).

O DM é caracterizado por hiperglicemia crônica, polidipsia, perda de peso, poliúria, glicosúria. Em longo prazo podem gerar conseqüências irreversíveis ou falência em vários órgãos, especificamente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos (GUYTON & HALL, 2006). Segundo Misawa *et al.* (2004), a hiperglicemia, também tem sua origem na deficiência insulínica que acarreta maior produção hepática de glicose por inibição da glicogênese (deficiência na regulação da glicoquinase e inibição da glicogênio sintetase), ativação da glicogenólise (ativação da fosforilase) e ativação da neoglicogênese (maior oferta de substratos e ativação de enzimas chaves como piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), frutose 1,6-difosfatase, glicose 6 fosfatase); inibição da captação de glicose pelos tecidos insulina – dependentes (tecido adiposo e muscular).

Para Tepperman & Tepperman (1987) e Felig *et al.* (1995), a perda de peso ou falta de crescimento corporal é explicada pela diminuição de insulina, e conseqüente aumento de glucagon e hormônios antagonistas da insulina que causam ativação da lipase hormônio sensível por fosforilação, a qual acarreta lipólise com perda de tecido adiposo; ativação da proteólise muscular com perda de massa muscular; inibição da captação de aminoácidos pelo tecido muscular assim como também queda na síntese protéica e com isso redução na massa muscular; inibição na captação de glicose pelo tecido adiposo e inibição da síntese e deslocamento da lipase lipoprotéica, o que inibe a captação de gordura.

De acordo com Felig *et al.* (1995), a maior ingestão de alimentos dá-se em função do centro da saciedade localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial necessitar de insulina para a captação de glicose, e assim inibir o centro da fome. A insuficiência de insulina e a não inibição do centro de saciedade induz a uma maior ingestão de alimentos. Na ausência de insulina, a glicose não entra no hipotálamo ventro-medial, que por sua vez deixa de inibir o hipotálamo ventro-lateral

responsável pela sinalização da fome. A área ventro-lateral livre de inibição, sinaliza falta de glicose e fome, com conseqüente estímulo para maior ingestão de alimentos.

Quando a hiperglicemia atinge valores acima de 180mg/dL, que é o limiar de absorção renal, a glicose excedente é eliminada do organismo pela urina, sendo este processo denominado glicosúria (GUYTON & HALL, 2006). Soskolne & Klinger (2001), afirmam que a perda de água (poliúria) que acompanha o quadro diabético levando o indivíduo à desidratação, decorre em função da perda de glicose, uréia e corpos cetônicos, os quais são eliminados do organismo pela urina. A desidratação propiciada pela poliúria e aumento da osmolaridade do sangue promovido pela hiperglicemia faz passar água do meio intracelular para o extracelular a fim de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é percebida por osmorreceptores cerebrais, desencadeando sede intensa. Este mecanismo é provavelmente o responsável pelo aumento da ingestão de água (polidipsia) presente no estado diabético.

Indivíduos diabéticos apresentam maior propensão a distúrbios circulatórios devido a uma desordem generalizada por causa de danos aos vasos sanguíneos de grande e médio calibre ocorrido pelo acúmulo de ateromas na parede do lúmen dos mesmos (BENDER & BENDER, 2003). As células especialmente afetadas pela hiperglicemia são as células endoteliais dos capilares da retina, as células mesangiais do glomérulo renal, os neurônios e as células de Schwann nos nervos periféricos. Isso se deve à incapacidade desses tipos celulares regularem o transporte de glicose para o meio interno (BARBOSA *et al.*, 2008).

O aumento da espessura da parede de pequenas artérias, veias e capilares é causada pelo acúmulo de glicoproteínas anômalas como resultado do processo de glicação não enzimático irreversível (*advanced glycation endproducts* – AGEs), que associado com diminuição do catabolismo de colágeno, aparentemente reduzem a absorção de nutrientes e oxigênio pelos tecidos e leva ao acúmulo de metabólitos (PONTE *et al.*, 2001).

Para Barbosa *et al* (2008), os AGEs são considerados importantes mediadores patogênicos das complicações do diabetes a longo prazo, convencionalmente

classificadas em micro ou macroangiopatias. A microangiopatia diabética é termo geral utilizado para denominar as modificações funcionais dos leitos microvasculares, nos quais o endotélio e as células associadas são progressivamente danificados pela hiperglicemia, resultando na oclusão capilar, isquemia e falência de órgãos. Já o termo macroangiopatia diabética refere-se às complicações cardiovasculares, que constituem a principal causa de morbimortalidade em pacientes com DM.

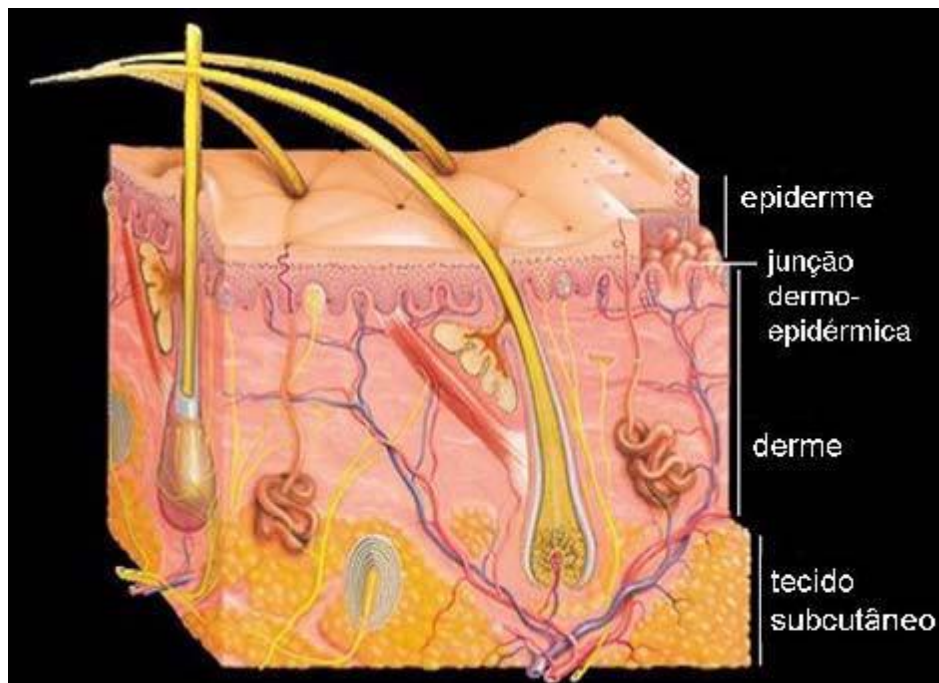
Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos em modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (BARBOSA *et al*, 2008).

Em adição, há prejuízo da resposta leucocitária, isso leva a uma diminuição da habilidade microbicida de leucócitos polimorfonucleares e falência na entrega de componentes do sistema imune humoral e celular, favorecendo as infecções oportunistas (BENDER & BENDER, 2003).

### **1.3 Morfologia e Fisiologia da Pele Humana**

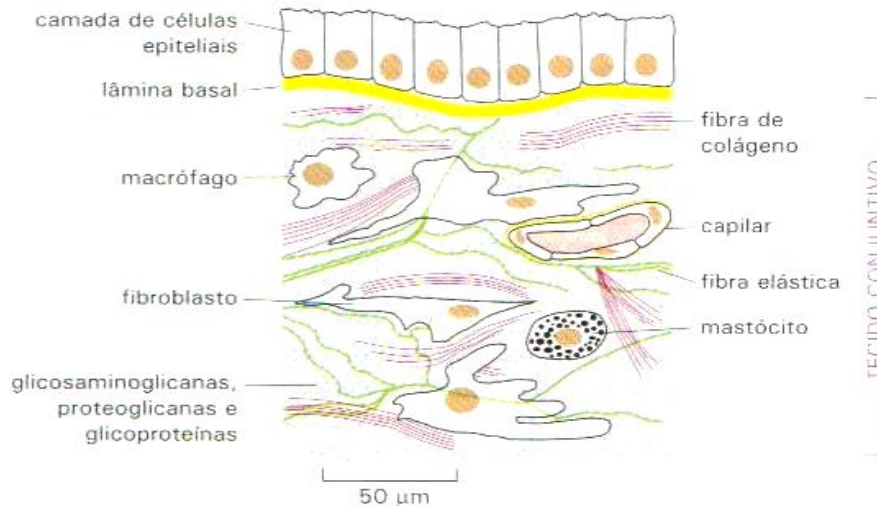
A pele é o maior órgão do corpo, correspondendo a 16 % do seu peso, e serve como barreira de agentes externos. É constituída por duas camadas denominadas epiderme e derme (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa constituída por tecido epitelial tendo como principais tipos celulares os melanócitos, as células de *Langerhans* e os queranócitos. Sob a epiderme, localiza-se a derme que é constituída por tecido conjuntivo. Esse tecido conjuntivo é firme, flexível e elástico, e tem como função nutrir e sustentar a epiderme devido à presença de vasos sanguíneos, terminações nervosas e vasos linfáticos. A hipoderme é formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos

subjacentes e é responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apóia. Dependendo da região em estudo e do grau de nutrição do organismo a hipoderme poderá ter uma camada variável de tecido adiposo. A pele apresenta apêndices dérmicos como unhas, pêlos, cabelos e glândulas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).



**Figura 1-** Anatomia da Pele (Baranoski, 2001)

O tecido conjuntivo é composto por diversos tipos celulares incluindo, células cartilaginosas, células ósseas e fibroblastos, os quais são especializados na secreção da matriz extracelular rica em fibras de colágeno e fibra elástica, responsáveis pela arquitetura estrutural do corpo (Figura 2). As células do tecido adiposo e as musculares lisas também fazem parte das células do tecido conjuntivo (ALBERTS *et al.*, 2004).



**Figura 2-** Esquema histológico do tecido conjuntivo e tecido epitelial de revestimento. Fonte: Alberts *et al.*, (2004)

Os Fibroblastos e fibrócitos são células presentes na derme e formadoras de fibras colágenas, elásticas e reticulares, substância fundamental na matriz extracelular do tecido conjuntivo. O colágeno é o principal tipo de proteína fibrilar insolúvel na matriz extracelular do tecido conjuntivo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). As células do tecido conjuntivo desempenham papel central no suporte e no reparo de quase todo tecido e órgão, a capacidade de adaptação de seu estado diferenciado é uma característica importante das respostas a muitos tipos de lesão (ALBERTS *et al.*, 2004).

#### 1.4 Ferida e Cicatrização

Ferida é a separação dos tecidos do corpo ou qualquer lesão tecidual, seja epitelial, de mucosas ou órgãos, com prejuízo de suas funções básicas. As feridas podem ser produzidas por fatores extrínsecos como a incisão cirúrgica, lesões acidentais, corte e trauma, ou por fatores intrínsecos, como aquelas produzidas por infecção, e as úlceras crônicas causadas por alterações vasculares, defeitos metabólicos ou neoplasias (WENDT, 2005; BLANES, 2004).

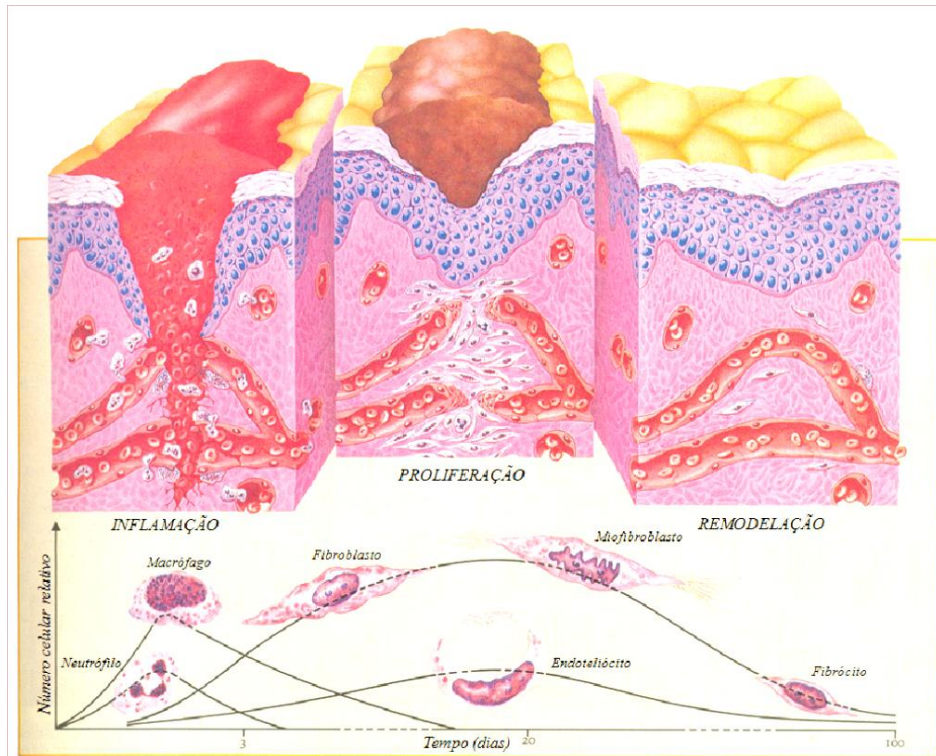
Os cuidados com as feridas são conhecidos desde a antigüidade, como é relatado no papiro cirúrgico de Edwin Smith, datado de 1.700 a.C., onde este documento descreve o tratamento que cirurgiões egípcios aplicavam em feridas, que consistia na combinação de mel e unguento aplicados diariamente na lesão com ataduras de pano fino (HADDAD *et al.*, 1983).

Utyama (2003), relata que Hipócrates (460-377 a.C) criou a base da medicina científica com ênfase na observação cuidadosa e preconizava a manutenção das feridas limpas e secas. Para o tratamento das feridas, a civilização egípcia utilizava óleos vegetais (rícino, oliva), erva medicinais, mel, acrescidos de leite, banhas, secreção de caramujo e vinho. Recomendava água tépida, vinho para limpar a ferida e para assepsia o vinagre. Sugeria a aplicação de emplastos ou cataplasmas em feridas com indício de inflamação para amaciar os tecidos e permitir a drenagem de pus.

Na atualidade sabe-se que o processo de cicatrização consiste numa perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares, que atuando em conjunto, levam à repavimentação e à reconstituição do tecido (IRION, 2005). Tal fenômeno é um processo dinâmico que envolve eventos bioquímicos e fisiológicos, a fim de garantir a restauração tissular (MANDELBAUM *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2004).

Este complexo processo de resposta à lesão tecidual envolve hemostasia, migração de células inflamatórias, síntese de tecido de granulação, deposição de colágeno, de proteoglicanos e maturação da cicatriz, seguida da regeneração do tecido conjuntivo e da remodelagem da ferida (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008) e são realizados por grande número e diferentes tipos de células, como queratinócitos, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais. As interações entre células, matriz intersticial e fatores de crescimento são eventos que atuam de maneira coordenada de modo a reparar os tecidos danificados. Alterações em uma destas fases levam a uma lentidão no processo cicatrização ou até mesmo a não cicatrização (MAVIOSO, 2003; TENIUS *et al.*, 2007).

De acordo com Mandelbaum *et al.* (2003) o processo de cicatrização pode ser dividido nas fases de coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação, como demonstrado na Figura 3.



**Figura 3** - Representação gráfica da resposta normal da pele a feridas, mostrando as principais células envolvidas durante cada fase do processo de cicatrização (adaptado de Gray *et al.*; In: Isaac, *et al.*, 2010)

Após a ocorrência do ferimento, inicia-se o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microrganismos, organiza matriz provisória necessária para a migração celular. Essa matriz servirá também como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (MENDONÇA & COUTINHO, 2009).

A plaqueta ativada aumenta a ação da protrombinase que transforma a protrombina em trombina, aumentando a adesão plaquetária. Estas plaquetas liberam fatores de crescimento como o Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- $\beta$ ) e o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), que auxiliam na migração de células envolvidas na resposta inflamatória, com a vasodilatação causando dor, calor e rubor (BALBINO & CURI, 2005; MAEHATA *et al.*, 2007).

Esta resposta vascular é concomitante à resposta celular e algumas células são importantes nesta fase, como os neutrófilos, que são responsáveis pela digestão de

bactérias e tecidos desvitalizados e os monócitos, que se transformam em macrófagos e auxiliam na fagocitose de bactérias e resquícios celulares (BLANES, 2004, BALBINO & CURI, 2005).

A proliferação é a fase responsável pelo fechamento da lesão propriamente dito. Compreende: reepitelização que se iniciam horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; fibroplasia e angiogênese, que compõem o chamado tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (BALBINO & CURI, 2005; MENDONÇA & COUTINHO, 2009).

A ativação de fibroblastos é intensificada com a liberação de mediadores químicos, liberados por macrófagos. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação juntamente com as células endotelial fazendo a reparação do tecido conjuntivo (BALBINO & CURI, 2005). Para Carvalho (2002), a fibroplasia tem início pela formação de tecido de granulação no espaço da ferida, contendo uma matriz frouxa de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, rico em macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados.

A última fase da proliferação é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Inicialmente as células endoteliais migram para a área ferida, a seguir ocorre proliferação das células endoteliais, acesso para as células responsáveis pelas próximas fases (BALBINO & CURI, 2005; MANDELBAUM *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2004).

A próxima fase da cicatrização é a maturação ou remodelamento e ocorre após 14 dias. De acordo com Ozgen *et al.* (2006) esta é a fase final da cura de uma ulceração corresponde a maturação e remodelagem da matriz extracelular. É durante esta fase que a cicatriz adquire sua máxima resistência tênsil. Este processo envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. A ferida se torna menos celular e muitos capilares são ocluídos e, eventualmente, desaparecem. O tecido de granulação torna-se, gradualmente, uma

cicatriz densa e relativamente avascular, consistindo de fibras de colágeno organizadas junto às linhas de tensão com fibroblastos relativamente inativos (CAMPOS *et al.*, 2007).

A deposição de colágeno é feita de maneira aleatória e depende da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e resultam numa configuração mais regular da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanharem as forças mecânicas que o tecido está sujeito durante a atividade normal. Este processo ocorre lentamente, levando meses ou anos, uma cicatriz madura tem 70% da resistência da pele normal (BALBINO & CURI, 2005).

A cicatrização pode ser classificada como: primeira, segunda ou terceira intenção. A de primeira intenção ocorre em ferimentos com perdas mínimas de tecidos e cujas bordas são aproximadas (fechada com pontos de sutura) (AMORIN, 2005; DANTAS & JORGE, 2005).

Amorin (2005) descreve a cicatrização por segunda intenção quando as bordas da ferida não estão aproximadas, ou seja, não estão apostas, como nas queimaduras ou em ferimentos profundos que são deixados abertos para formação de tecido de granulação. Neste caso, o tecido de granulação preenche a ferida e esta se contrai e reepiteliza. A cicatrização de terceira intenção ocorre quando a ferida aberta é fechada secundariamente dias após a lesão, cicatrizando por primeira intenção tardia. Geralmente estas feridas são mantidas abertas para a resolução de edema e infecção (DANTAS & JORGE, 2005).

A importância em estudar o reparo tecidual em pacientes portadores de diabetes cresce a cada ano. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) não seria nenhum exagero descrever o diabetes como a principal causa de mortalidade prematura em todo o mundo. Sendo uma epidemia silenciosa, sem uma ação eficaz, conseguiu debilitar os serviços de saúde em toda a parte e especialmente nos países pobres nos últimos anos (MEIRELES *et al.*, 2009). O DM tem sido associado clinicamente e experimentalmente a um processo cicatricial mais demorado. Diversos estudos apoiam as evidências de disfunção dos leucócitos

polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos, com uma fase inflamatória prolongada, decréscimo na biossíntese de colágeno e glicosaminoglicanas, resultando no retardo da formação do tecido de granulação (ALMEIDA *et al.*, 2002).

De acordo com Ladeira (2011), as Matrix Metalloproteínas (MMPs) que degradam matriz extracelular (MEC) estão sob controle fino de inibidores plasmáticos como a macroglobulina ou inibidores teciduais de metaloproteinases, nas feridas crônicas de diabéticos e um há aumento na concentração de MMP-2, MMP-8 e MMP-9, juntamente com diminuição de Tecido inibidor de Metalloproteases (TIMPs). Esse desbalanço leva à destruição de proteínas e fatores de crescimento necessários para iniciar a fase proliferativa, contribuindo para estacionar a ferida na fase inflamatória da cicatrização. A explicação para esse fenômeno evidenciado na literatura é que macrófagos de diabéticos secretam exageradamente metaloproteinases e que as citocinas Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) estão em níveis elevados nas feridas e estes sinalizadores têm como uma de suas funções aumentarem secreção de proteases e diminuir os inibidores delas.

Desta maneira para combater uma carga bacteriana aumentada seria esperado, fisiologicamente, que houvesse aumento na razão entre linfócitos CD4 e CD8. Entretanto, em uma análise das margens de feridas e úlceras de diabéticos verificou-se diminuição nesta relação, com aumento no número de células CD8 e diminuição das CD4. Esses resultados sugerem que células CD8 possam ter papel ativo na cicatrização deficiente do diabético, já que evidências as levantam como atuantes na alteração prejudicial do reparo tissular fisiológico (SIBBALD e WOO, 2008).

Graves *et al* (2005), obeservaram um aumento da expressão de mediadores inflamatórios mais prolongadaem animais diabéticos quando comparados a animais normoglicêmicos, pela ação das quimiocinas, Proteínas Quimiotáticas de Macrófagos (MCP-1) e Proteína Inflamatória de Macrófago (MIP-2) que atraem macrófagos e células polimorfnucleares, como também estimulam a liberação de TNF- $\alpha$ .

Verificou-se que nas úlceras diabéticas ocorre a diminuição de fatores de crescimento e expressão de: PDGF, FGF, fator de crescimento semelhante à insulina-1(IGF-1), IL-8, IL-10, esteopontina e Fator Transformador do Crescimento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). Por outro lado, constatou-se supra-regulação de: IL-1, TNF- $\alpha$  e angiopoietina-2, concentrações diminuídas de esteopontina e aumentadas de angiopoietina-2 condizem com o atraso na angiogênese, já que a primeira induz o processo e a segunda o inibe (BLAKYTNY e JUDE, 2006).

Sabe-se que úlceras de diabéticos apresentam fenótipos diferentes dos de feridas de pessoas saudáveis, os queratinócitos têm habilidades alteradas de migração, proliferação, diferenciação e secreção de fatores de crescimento e fibroblastos alterações na morfologia, senescência, diferenciação deficiente em miofibroblasto, baixas capacidades migratória e proliferativa, e função secretora exarcebada (PEPPA *et al*, 2009; BREM e TOMIC-CANIC, 2007)

### **1.5 Plantas Medicinais**

As plantas constituem uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas e, portanto, devem ser consideradas como matéria prima e ponto de partida para a descoberta de novas moléculas e para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SIMÕES *et al.*, 2001).

As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica e, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais. Isto se deve em parte, à grande variedade de espécies (250-500 mil) de plantas existentes na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas. Nos últimos anos, tem-se verificado um grande aumento nos estudos que comprovam o que se conhece empiricamente, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica. Acredita-se que cerca de

80% da população mundial use as plantas como primeiro recurso terapêutico (SILVA & FILHO, 2001).

O tratamento medicamentoso na cicatrização também acompanha a história. O uso de extratos de plantas ou parte na cicatrização de feridas é relatado desde a pré-história. Com o avanço da tecnologia passou a ser substituído por soluções de iodo e cloro, no século XIX, e por pomadas contendo enzimas ou princípios ativos, como a alantoína, que é encontrada em diversas espécies vegetais e já pode ser obtida por síntese orgânica (BLANES, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

### **1.5.1 Caracterização da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**

As aroeiras são espécies muito comuns da flora brasileira. Pertencem à família das Anacardiaceae e são caracterizadas por plantas floríferas que englobam árvores e arbustos, ocorrentes nos países tropicais e temperados. No Brasil, além das aroeiras, essas espécies são representadas também pela mirueira ou gonçalo-alves (*Astronium macrocalyx*); pelo caju (*Anacardium occidentale*); pela manga (*Mangifera indica*) e pelo cajá (*Spondias lutea*). As plantas apresentam condutos resiníferos, cujo conteúdo lhes confere um aroma peculiar (FERREIRA, 1986).

Dentre as mais de 500 espécies de Anacardiaceae conhecidas, a que se destaca pela sua importância para o objetivo deste trabalho é, especificamente a *Schinus terebinthifolius* Raddi ou popularmente conhecida como aroeira-vermelha. É uma árvore de folhas perenes, originária na América do Sul, especialmente no Brasil, Paraguai e Argentina. Na Flórida, onde foi introduzida como ornamento no final de 1800 e começou a se espalhar na década de 60, é considerada uma das mais agressivas e invasoras de ambientes como a região denominada de *Everglades* nos Estados Unidos. Seu nome científico se deve à semelhança com as folhas pertencentes ao gênero *Terebinthus*. A palavra *terebinthifolius* é uma combinação de *terebinthus* e *folia*, que em latim significa folha (BORNHAUSEN, 2002; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2002).

São muitas as plantas conhecidas com o nome de aroeira. Pela vasta quantidade de nomes populares que carregam como aderno, almecega, arendeúva, arendiuva, arindeúva, aroeira legítima, aroeira-d'água, aroeira-de-capoeira, aroeira-de-mato-grosso, aroeira-do-campo, aroeira-do-ceará, aroeira-do-cerrado, aroeira-do-sertão, aroeira-mansa, aroeira-preta, aruiva, árvore-da-arara, chibatan, gibatão, itapicurus, orindeúva, orindiuva, pandeiro, ubatan, ubatani, urindeúva, urinduba, urunday, urundéuva (BORNHAUSEN, 2002), deixam transparecer que se trata de diferentes espécies espalhadas pelo país.

O nome popular, aroeira, é uma corruptela de araroeira, que vem de arara, dando a idéia de que esta árvore seria de propriedade da ave, já que nela a arara pousa e vive com freqüência, fazendo dela seu hábitat (BORNHAUSEN, 2002).

A *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma árvore de médio porte, atinge a altura de 5 a 10 metros com tronco curto, normalmente escondido pelos galhos entrelaçados. Suas folhas são verde-escuras, compostas, oblongas a elípticas e com nervura proeminentes na parte de cima do limbo. As flores brancas ou de cor amarelo-pálido possuem sexos separados, na mesma árvore. São pequenas e agrupadas em inflorescências do tipo cacho. Os frutos são do tipo drupa e têm coloração verde no início e depois se tornam vermelhos (Figura 4). Essa casca vermelha seca se transforma em uma espécie de concha de papel que envolve a semente. A semente é única, marrom escura e mede cerca de 0,3 milímetros de diâmetro (BORNHAUSEN, 2002).

A)



B)



**Figura 4** – A) Frutos e B) Árvore da *Schinus terebinthifolius* Raddi Fonte: <http://www.saladeayurveda.com/2010/01/farmacia-na-cozinha-parte-ii.html>

Seu fruto, pequeno de cor vermelha bem forte e brilhante é conhecido também por pimenta-rosa e é muito procurado pelas aves. Este pequeno fruto destaca-se dentre as muitas especiarias existentes que são utilizadas essencialmente para acrescentar sabor e refinamento aos pratos da culinária universal. O sabor suave e levemente apimentado do fruto da aroeira-vermelha permite seu emprego em diversas preparações, podendo ser utilizado na forma de grãos inteiros ou moídos. No entanto, o fruto da aroeira é especialmente apropriado para a confecção de molhos que acompanham as carnes brancas, de aves e peixes, por não abafar o seu gosto sutil (DEGÁSPARI, 2004).

O uso medicinal da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é descrito há muitos anos e referido desde a primeira edição da Farmacopéia Brasileira em 1926, segundo Lucena *et al.* (2006). Inúmeras potencialidades medicinais e fitoquímicas estão atribuídas a compostos secundários que são substâncias ausentes de função relacionada a processos bioquímicos primários dos vegetais (GUERRA *et al.*, 2000). A finalidade destes compostos é promover proteção contra predadores, microrganismos patogênicos, também conferem odor e cor aos vegetais, atuando como mensageiros químicos entre a planta e o ambiente, os principais exemplos desses compostos são óleos essenciais, saponinas e taninos (TAIZ & ZIEGER, 2004).

Os óleos essenciais são substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis obtidas dos mais variados vegetais, em geral via extração ocorre a vapor ou por solventes. Seus compostos mais importantes são incluídos em dois grupos: terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanoídes (ARAÚJO, 2010).

De acordo com Barbosa *et al.* (2007), o óleo essencial de aroeira-vermelha é constituído principalmente de monoterpenos (90,00%), com uma maior concentração de  $\alpha$ -3-careno (29,22%),  $\alpha$ -pineno (12,94%),  $\alpha$ -felandreno (13,04%) e  $\beta$ -felandreno (18,08%), embora também tenha sido observada a ocorrência de sesquiterpenos, como o D-germacreno (3,09%).

Estudos fitoquímicos identificaram flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas, saponinas e fenóis incluindo taninos na espécie *Schinus terebinthifolius* (LIMA *et al.*, 2006). Apresenta atividade anti-inflamatória

(GAZZANEO *et al.*, 2005) e antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas - *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (MARTINEZ *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2006), provavelmente atribuída à presença de substâncias fenólicas, contra uma série de microorganismos.

A presença de taninos nesta espécie está relacionada, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarréico e anti-séptico; por via externa impermeabilizam as camadas mais expostas da pele e mucosas, protegendo assim as camadas subjacentes. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Os taninos são hemostáticos e, como precipitam alcalóides, podem servir de antídoto em casos de intoxicações. Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os flavonoides podem prevenir injúrias oxidativas de diferentes formas como diminuindo a formação de radicais livres, quelando íons metálicos e inibindo a atividade de diversas enzimas: lipoxigenase, cicloxigenase, xantina oxidase, fosfolipase A2 e proteína quinase que são importantes nas reações inflamatórias (RATTY; DAS, 1988).

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

O Diabetes Mellitus é um problema de saúde pública com alto potencial de morbidade e mortalidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 245 milhões de pessoas têm diabetes e outros 140 milhões poderão desenvolver a doença nos próximos 20 anos, sendo que no Brasil, estima-se que esta doença atinge quase 12 milhões de indivíduos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). A hiperglicemia crônica, presente em quadros de diabetes, está associada com perda da função e falência de vários órgãos, resultando em cardiopatias, acidente vascular cerebral e má circulação. Estas disfunções podem ocasionar um processo de cicatrização deficiente das lesões e gangrena dos pés e mãos. Aproximadamente 15% dos pacientes diabéticos terão em algum momento de sua vida dificuldade no processo de cicatrização de eventuais lesões (LERCO, 2003).

Em quadros de diabetes a cicatrização ocorre de maneira diferenciada em função de lesões vasculares (hipóxia) e de alterações nas células fagocitárias que favorecem o desenvolvimento de infecções. A neuropatia também prejudica a cicatrização, devido à redução de estímulos (mediadores) da inflamação liberados por terminações nervosas (BOGLIOLO, 2006).

Frente a essa realidade, torna-se imprescindível a procura de novas alternativas para o tratamento de feridas decorrentes de complicações do diabetes. Atualmente o desenvolvimento de práticas de saúde que incluem a utilização de plantas medicinais tem crescido em decorrência da biodiversidade do bioma brasileiro assim como em função de fatores econômicos e sociais, como o baixo custo e a cultura relacionada ao seu uso (GUIMARÃES, 2005).

Segundo Simões (2003), desde o início da humanidade o homem busca nas plantas efeitos terapêuticos. Neste panorama podemos destacar a *Schinus terebinthifolius* Raddi que, como medicamento, pode ser utilizada no tratamento de inflamações uterinas e cicatrização de feridas, tendo sido comprovada cientificamente sua ação antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (MARTINEZ *et al.*, 1996) e antiinflamatória (GAZZEANO *et al.*, 2005), não sendo demonstrado nenhuma toxicidade em animais e humanos

(BARBOSA *et al.*, 2007). Dentre as partes utilizadas que apresentam propriedades medicinais estão incluídas as cascas, folhas e frutos. Devido à composição de seu óleo essencial, é usada no tratamento de distúrbios respiratórios, em tumores e doenças da córnea (BORNHAUSEN, 2002). Popularmente, também é empregada no tratamento da diarreia e inflamações.

Considerando que dentre as principais consequências do diabetes encontra-se a dificuldade de cicatrização e tendo em vista o potencial anti-inflamatório e cicatrizante da aroeira, objetivou-se avaliar o uso tópico de óleo essencial do fruto de aroeira-vermelha (*Schinus terebintifolius* Raddi) sobre o processo de cicatrização de lesões em ratos submetidos a um modelo experimental de diabetes aloxânico tipo I.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Extração do Óleo de aroeira

As amostras do fruto de Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) foram coletadas no município de São Mateus, Espírito Santo/Brasil em latitude 18°42'58" sul e a uma longitude 39°51'21", o óleo essencial foi obtido pela técnica de destilação por arraste a vapor. Para esse método, foi utilizado o aparelho de Clevenger. A amostra foi colocada em um balão volumétrico com 500 mL de água e após o tempo de destilação, o óleo junto com a água, que teve a função de arrastar o óleo, foi recolhido em um funil de separação, onde foram adicionados 30 mL de diclorometano (RADUNZ et al., 2001), por três vezes. É este o solvente que separa os óleos essenciais da amostra da aroeira da água. O óleo junto com o solvente foi recolhido em um béquer, e foi adicionado sulfato de magnésio anidro para retirar a água que, eventualmente, passou do funil de separação para o béquer. Depois, procedeu-se a filtração e o filtrado foi colocado em rotavapor para retirada do diclorometano.

A amostra do óleo essencial de aroeira-vermelha foi submetida à análise por Cromatografia Gasosa acoplado com Espectrometria de Massa (CG-MS), em um equipamento GC-MS (Schimadzu, modelo 5050 A) equipado com uma coluna de sílica OV-05 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m), nas seguintes condições cromatográficas: a temperatura inicial foi de 60°C, aumentando a temperatura em 4°C/min até atingir 280°C, permanecendo nesta temperatura por 10 min; Temperatura do detector = 280°C; T Temperatura do injetor = 280°C; T Temperatura da coluna = 60°C; Split = 1:50; E = 2,0 kV; fluxo = 1,0 mL/m; modo = SCAN.

Foram injetadas 1  $\mu$ L das soluções do óleo essencial (1000 mg/L em hexano) e dos 15 padrões cromatográficos  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno,  $p$ -cimeno, limoneno, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, linalol, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, timol e carvacrol (40 mg/L em hexano), e os constituintes foram identificados por comparação com os espectros de massa da biblioteca Wiley do equipamento e o tempo de retenção dos padrões. A relação dos compostos identificados na amostra

estão apresentados na Tabela 1. A concentração dos monoterpenos encontrados nas amostras de óleo essencial dos frutos de aroeira-vermelha foi calculada em relação à área normalizada dos picos, cujos tempos de retenção foram iguais aos tempos dos padrões. Essa concentração não foi expressa em massa, mas sim porcentagem em área.

**Tabela 1** Relação dos padrões de terpênicos e dos compostos encontrados na amostra de óleo essencial de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), submetidos à cromatografia gasosa com detector espectrométrico de massas.

Pico	Tempo retenção (min)	Fórmula Molecular	Peso Molecular	Composto	C** (%) AV
1	5,64	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	α-tujeno	0,67
2	5,85	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	α-pineno*	29,39
3	5,69	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	Canfeno*	0,31
4	6,84	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	t-butilbenzeno	n/d
5	6,94	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	Sabineno	3,99
6	7,06	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	β-pineno*	7,71
7	7,43	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	Mirceno*	6,18
8	7,9	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	α-felandreno	9,39
9	8,12	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	δ-Χαρενο	19,69
10	8,3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	α-terpineno*	0,25
11	8,56	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134	p-cimeno*	4,27
12	8,74	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	Limoneno*	18,15

\* compostos identificados com base nos padrões cromatográficos

\*\* concentração calculada em relação à área normalizada dos picos

n/d: não detectado

AV: óleo essencial

obs: demais compostos foram identificados com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley do GC/MS, com probabilidades acima de 92%, em média 96%

### 3.2 Animais Experimentais

Foram utilizadas 62 ratas (*Ratus norvegicus albinus* Wistar), adultas, sadias ao exame clínico, pesando entre 200 e 300g, com aproximadamente três meses de idade, fornecidos pelo Biotério do Campus Maruípe/UFES. As ratas foram mantidas em caixas plásticas em sala com temperatura ambiente controlada (22°), com ciclos

de claro-escuro de 12 horas e alimentados com ração Labina (Purina) e água *ad libitum*.

### **3.3 Indução ao Diabetes Mellitus**

Para indução do Diabetes Mellitus, a droga diabetogênica de escolha foi o aloxano, por apresentar citotoxicidade específica para as células beta pancreáticas e por ter um amplo uso no desenvolvimento de protocolos experimentais envolvendo indução do diabetes (LERCO, 2003). O aloxano (Aloxan-Sigma. St. Louis. USA) foi diluído em tampão de citrato (0,01M pH 4,5), e injetada por via intraperitoneal, na dosagem de 100mg/kg de peso corporal após jejum alimentar de 12 horas. A alimentação foi restituída aos animais 1 hora após a administração da droga. Uma vez que somente esta dose de aloxano não foi capaz de promover a indução do diabetes, este procedimento foi repetido 14 dias após a primeira administração da droga.

Após 10 dias, foi coletada amostra de sangue por via intra-cardíaca para verificação da glicemia e comprovação do estado diabético dos animais. Participaram do experimento animais que apresentaram glicemia superior a 200mg/dL (LERCO, 2003; KISS *et al.*, 2005).

### **3.4 Excisão cirúrgica**

Sete dias após a confirmação do diabetes (dia zero), foi realizada a excisão cirúrgica de tecido cutâneo na região dorsal (formato triangular com faces de 1,0 cm), com retirada da pele e tela subcutânea, e exposição da fáscia muscular dorsal (SANTOS, 2006). Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com Ketamina (6mg/Kg) e Xilazina (25mg/Kg). A Ketamina (6mg/kg) foi o anestésico de escolha para este experimento por não causar disfunção e toxicidade no tecido hepático,

promovendo anestesia por ação depressora do sistema nervoso central (GUIMARÃES, 2005).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas metabólicas e tratados por via tópica durante 21 dias (100 µl), constituindo 3 grupos experimentais com 10 animais:

Tratamento I (controle) solução NaCl 0,9 % - Grupo CT

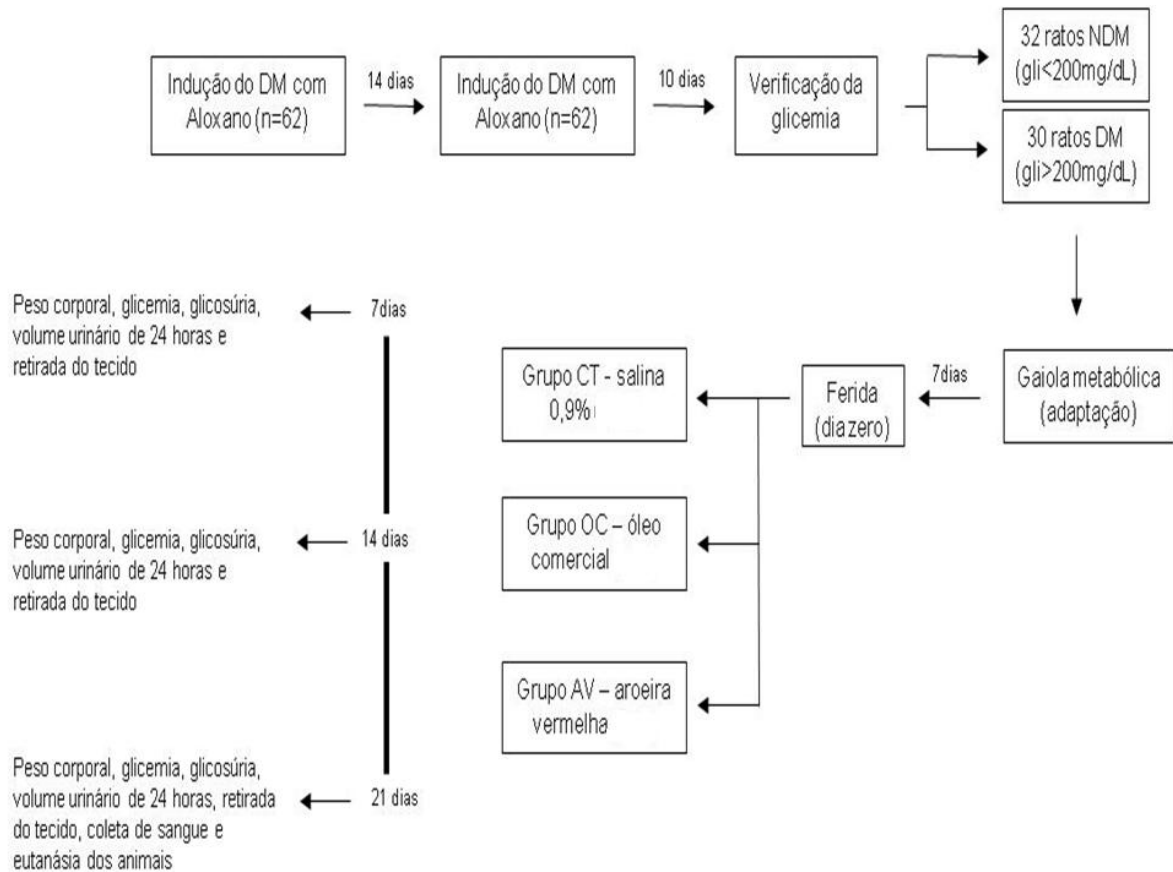
Tratamento II óleo comercial (contendo: ácido cáprico, ácido caprílico, ácido capróico, ácido láurico, ácido linoléico, lecitina, palmitato de retinol, acetato de tocoferol e alfa-tocoferol ) - Grupo OC

Tratamento III óleo essencial de aroeira-vermelha - Grupo AV

Os animais foram avaliados ao 7º, 14º e 21º dias após o dia zero, sendo que a cada período foram avaliados: glicemia (realizada com aparelho Accu-Chek, Roche), peso corporal, glicosúria (Uri-test, Alamar Tecno Científica Ltda/SP) e análise macroscópica das lesões e retirada de tecido para análise histológica de cada animal. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados utilizando uma dose de anestésico tiopental 100 mg/Kg via endovenosa.

Foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca para verificação de níveis glicose, Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), colesterol, triglicerídeos, uréia e creatinina ao início e ao término do período experimental. As amostras foram imediatamente centrifugadas para obtenção de soro com a utilização de centrífuga da marca Excelsa, modelo Fanem® a 2000g durante 10 min. As amostras de soro foram congeladas a -20°C até o momento da realização das análises, com o auxílio de um analisador semi-automático (TP Analyzer Plus®, Thermoplate) através de kit comercial (Labtest® Diagnóstica S.A., Lagoa Santa/ MG, Brasil). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Na Figura 5 encontra-se o fluxograma ilustrando os grupos e protocolos experimentais desenvolvidos neste estudo.



**Figura 5-** Fluxograma de distribuição dos grupos experimentais segundo o tratamento e tempo de observação

### 3.5 Avaliação Macroscópica

Na análise macroscópica das lesões operatórias, foi verificadas a ocorrência de hemorragia (presente ou ausente), presença de crostas cobrindo a lesão (presente ou ausente), presença de secreção (presente ou ausente), lesões avermelhadas ao redor da lesão (presente ou ausente) e reepitalização completa (presente ou ausente).

### 3.6 Análise Histológica

Para análise histológica cada peça cirúrgica foi retirada com um punch Keyes 3 mm e colocada em recipiente plástico com formol a 10%. No laboratório de Anatomia Patológica do Centro de Ciências Agrárias-CCA-UFES as peças passaram por desidratação gradativa em álcool (2 álcoois a 95% e 3 absoluto por 1h cada um), diafenização em xilol, com três trocas de uma hora cada, impregnação e inclusão em parafina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados utilizando-se micrótomo modelo “820” Spence, obtendo-se seções de 6µm de espessura. As lâminas histológicas foram mantidas em estufa para secagem e os cortes posteriormente submetidos à coloração por hematoxilina e eosina para análise histológica e tricrômio de Masson para observação de fibras colágenas. Nas observações de microscopia óptica de acordo com Garros, (2006), foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) Cicatrização por 2ª intenção: 7 dias (tecido de granulação, fibroblasto, vasos neoformados, colágeno), 14 dias (proliferação vascular diminuída, proliferação fibroblástica, fibras colágenas e reepitelização), 21 dias (tecido conjuntivo imaturo, fibras de colágenos extracelular, redução de fibroblasto e vasos sanguíneos)
- b) Processo de cicatrização consolidado, indicado pela reepitelização completa;
- c) Dermatite, indicada pela presença de colônias de bactérias;
- d) Cicatrização acelerada (tecido de granulação, macrófagos ativados, neutrófilos, hemácias e redução de fibroblastos e células endoteliais).

### 3.7 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Para análise estatística foi utilizada análise de variância de uma via para medidas repetidas, seguida pelo teste post hoc de Tuckey/Kramer para avaliação do peso corporal, volume urinário de 24 horas,

glicemia, glicosúria, creatinina, uréia, colesterol, triglicerídeos, AST e ALT. Para análise histológica foi utilizado o programa computacional R com teste qui-quadrado e correção de Yates ( $n > 20$  e  $< 40$ ). Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$  e  $p \leq 0,01$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Glicemia, Peso Corporal, Volume Urinário de 24 horas e Glicosúria

Dos 62 animais submetidos à dupla injeção intra-peritoneal de aloxano (100mg/Kg de peso corporal), 6 animais (9,7%) morreram após a indução, 5 animais (8,1%) apresentaram glicemia entre 130-160mg/dL e 21 animais (33,8%) não apresentaram alteração glicêmica (85-110mg/dL).

Lerco (2003) e Oliveira (2004) relatam em seus experimentos um índice de mortalidade de 39% e 51%, respectivamente, administrando o aloxano por via endovenosa. No presente experimento o índice de mortalidade foi menor (9,7%), porém o percentual de animais que não apresentaram o DM foi de 33,8%, que se iguala aos obtidos por Oliveira (2004) e diferem dos 21% encontrados por Lerco (2003).

Os 30 animais (48,4%) que apresentaram hiperglicemia superior a 200mg/dL foram incluídos no estudo experimental e evoluíram com parâmetros clínicos (polidipsia, polifagia, poliúria, glicosúria e perda de peso) e laboratorial (glicemia) compatíveis com o DM. Ao fim dos 21 dias de tratamento restaram nove animais do grupo CT, oito animais do grupo OC e 10 animais do grupo AV.

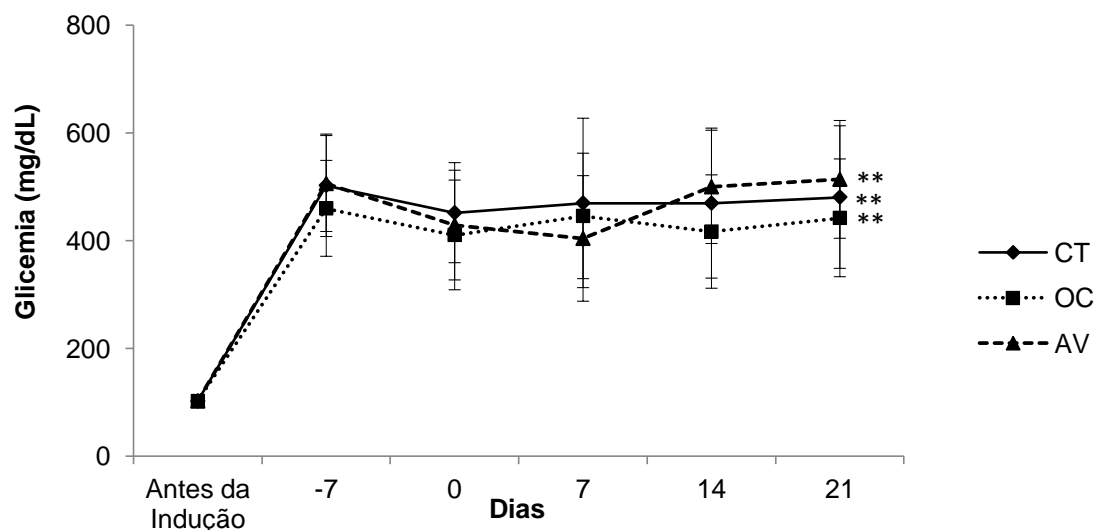
Antes da indução do DM os animais não apresentavam diferenças ( $p>0,05$ ) quanto à glicemia (Figura 7), peso corporal (Figura 8), volume urinário (Figura 9) e glicosúria (Figura 10), portanto, foram agrupados em um único grupo antes da indução.

Na Figura 6 encontram-se os resultados da glicemia nos diferentes grupos e tempos estudados. Antes da indução a média de glicemia de todos os animais analisados foi de  $102 \pm 10,14$  mg/dL, não apresentando diferenças ( $p>0,05$ ) entre os grupos. Este valores também foram semelhantes aos encontrados por Cavalli *et al.* (2007). Segundo Zanoello *et al.* (2002) os valores normais da glicemia em ratos variam entre 47,7 a 107 mg/dL. Após a indução ao diabetes este valor variou de 403mg/dL a 513mg/dL entre os grupos experimentais, sem diferenças ( $p>0,05$ ) entre os

tratamentos nos períodos avaliados. Estes valores foram maiores que os encontrados por Oliveira (2004), em média 362 mg/dL e próximo aos de Lerco, (2003) 380 a 600mg/dL. Kiss *et al.*, (2007) relataram uma média de 400 mg/dL em estudo com ratas induzidas ao diabetes por estreptozocina.

Modelos de animais experimentais são frequentemente utilizados em pesquisa sobre o diabetes mellitus, pois a indução do diabetes químico pela administração de tóxicos como o aloxano são específicos para células  $\beta$  pancreáticas devido a similaridade com a glicose o que permite que a mesma seja internalizada via transportadores e mimetizam de forma idêntica em humanos o DM tipo I, onde há a ausência de produção de insulina pelo pâncreas (DELFINO *et al.*, 2002).

A ausência de insulina no organismo acarreta um acúmulo de glicose sanguínea que não pode ser estocada, pois a insulina é responsável pelo armazenamento de glicose no fígado, músculo e tecido adiposo. Concomitantemente a ação deficiente da insulina diminui a utilização de glicose pelos tecidos insulino-dependentes e mantém um ritmo aumentado de produção endógena, determinando a hiperglicemia persistente (CARVALHO, 2002; SMELTTZER & BARE, 2009).

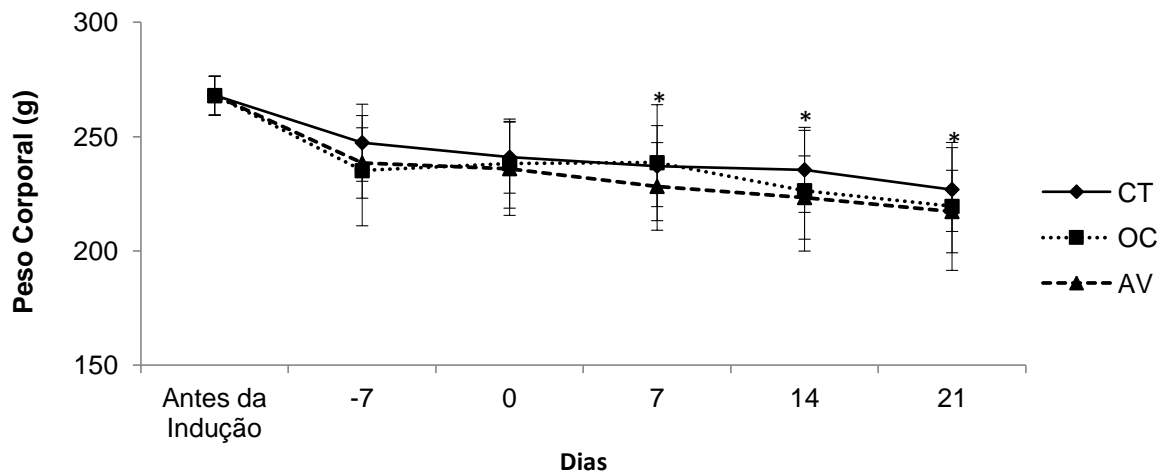


**Figura 6** – Valores plasmáticos de glicose dos animais diabéticos no período antes e pós (-7) indução ao DM e nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de tratamento. ANOVA \*\*p  $\leq$  0,01 vs. antes da indução.

O DM, se não tratado, leva à redução de peso corporal, fato observado durante esta pesquisa como demonstrado na Figura 7. Esta perda de peso foi observada por Zoanelo *et al.* (2002) e Delfino *et al.* (2002) em seus experimentos com animais induzidos ao DM. Cavalli (2007) observou que o peso corporal dos animais diabéticos está intimamente ligado a glicemia, durante sua pesquisa os animais que mantiveram glicemias superiores a 300 mg/dL perderam peso enquanto os que mantiveram glicemias inferiores a 300 mg/dL ganharam peso.

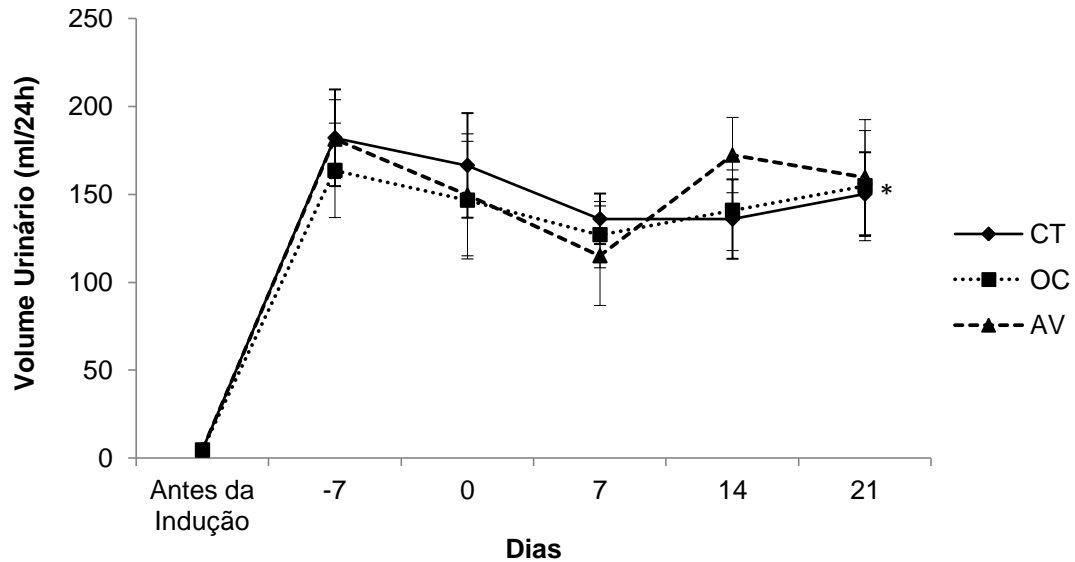
A perda de peso no indivíduo diabético sem tratamento é comum no DM 1 e está relacionada com a ausência de insulina no organismo. Consequentemente ocorre o aumento de hormônios contra reguladores (glucagon, catecolaminas, glicocorticoides e hormônio do crescimento), aumentando a mobilização lipídica, degradação protéica e associado às perdas hidroeletrólíticas, a mobilização deste tipo de energia leva a liberação de corpos cetônicos, sendo este a base fisiopatológica de uma complicação grave do DM denominada cetoacidose diabética (CAD), que apresenta manifestações típicas como hálito cetônico, alterações respiratórias, letargia e torpor (FREITAS & FOSS, 2003).

Esta perda de peso também pode estar associada com o processo inflamatório, que produz citocinas inflamatórias IL e TNF- $\alpha$  que agem como mediadores da inflamação e da imunidade, níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$  causam a perda de peso devido à estimulação do aumento dos níveis séricos de leptina, que é uma proteína relacionada com a sensação de saciedade, níveis aumentados desta proteína induzem o organismo ao gasto energético e a uma diminuição no consumo de alimento, causando falta de apetite e perda de peso (PASCHOALINI *et al.*, 2005; NERY *et al.*, 2006).



**Figura 7** – Média de peso corporal dos animais diabéticos no período antes e pós (-7) indução ao DM e nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de tratamento. ANOVA \* $p < 0,05$  vs. antes da indução, ANOVA.

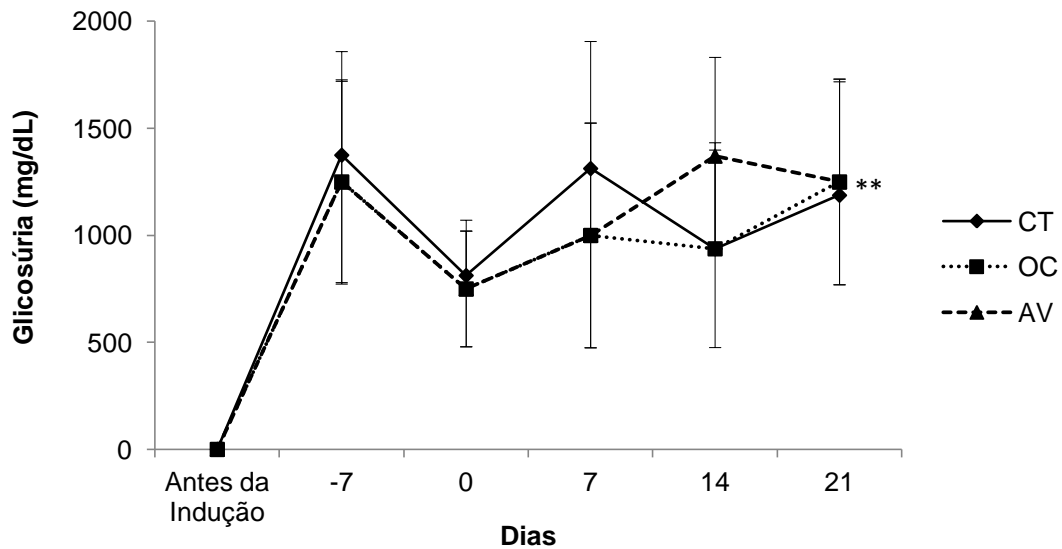
Na Figura 8 encontram-se os resultados do volume urinário em 24 horas dos animais avaliados antes e após a indução ao DM submetidos aos diferentes tratamentos. Antes da indução os animais apresentaram  $4,75 \pm 0,5$  ml de urina em 24 horas enquanto após a confirmação do DM este valor oscilou de 127 a 182 mL em 24 horas, porém não apresentaram diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos nos períodos avaliados. Os valores do volume da diurese encontrados por Lerco (2003) foram menores, uma média de 100 ml/24h.



**Figura 8** - Volume urinário de 24 horas dos animais diabéticos no período antes e pós (-7) indução ao DM e nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de tratamento. ANOVA \* $p < 0,05$  todos os grupos vs antes da indução

Todos os 30 animais apresentaram alterações na glicose urinária superior ou igual a 1000 mg/dL (+++), compatível com o estado diabético grave como demonstrado na Figura 9. De acordo com Miller & Gonçalves (1999) o DM representa a causa mais comum de glicosúria, todo indivíduo que apresente este sintoma deve ser diagnosticado como diabético seguido de estudo laboratorial, ou seja, glicemia em jejum e curva glicêmica. Os valores normais de excreção de substâncias redutoras em humanos, habitualmente glicose, variam de 0,5 a 1,5g por 24h, a glicose é substância dotada de limiar renal que corresponde na maioria das vezes a uma hiperglicemia de 160 a 180 mg/100ml (MILLER & GONÇALVES, 1999).

O aumento do volume de diurese é uma das características do estado hiperglicêmico devido ao aumento elevado da concentração de glicose no filtrado glomerular, excedendo a capacidade das células tubulares em reabsorvê-la e dando origem à diurese osmótica. Esse mecanismo tem sido descrito como o principal responsável pela produção de grande volume de urina com elevada osmolaridade (LERCO, 2003).



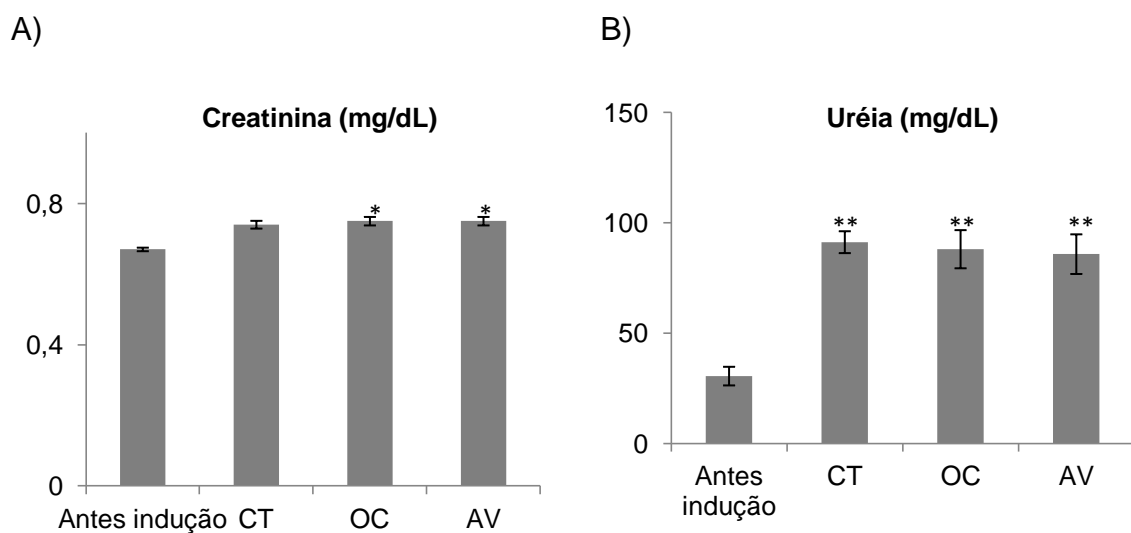
**Figura 9** - Glicosúria em mg/dL dos animais antes e após (-7) indução ao DM e nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de tratamento. ANOVA \*\* $p < 0,01$  todos os grupos vs. antes da indução

#### 4.2 Creatinina e Uréia

Sabe-se que o DM é uma das principais causas de insuficiência renal crônica a longo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Apesar da utilização do óleo de aroeira ter sido realizada topicamente, não se pode descartar a possibilidade que esta substância tenha atingido a corrente sanguínea, portanto avaliamos os possíveis efeitos nefrotóxicos do óleo essencial de aroeira.

Os valores plasmáticos de creatinina antes da indução do DM e ao término do período experimental dos animais avaliados estão demonstrados na Figura 10 (A). Observou-se que os grupos OC ( $0,75 \pm 0,012$  mg/dL) e AV ( $0,75 \pm 0,012$  mg/dL) apresentaram uma elevação dos níveis de creatinina plasmática quando comparados ao grupo antes da indução do DM ( $0,67 \pm 0,05$  mg/dL), e o grupo CT apresentou ( $0,74 \pm 0,011$  mg/dL). Em conjunto estes dados indicam que nenhum dos tratamentos influenciou neste parâmetro e as alterações encontradas devem-se aos efeitos do DM sobre a função renal.

A uréia é a principal forma excretora do nitrogênio proveniente do catabolismo protéico, forma-se no fígado a partir dos grupos amoníacos liberado pela desaminação dos aminoácidos e sua dosagem constitui o recurso mais utilizado para avaliação do funcionamento renal (MILLER & GONÇALVES, 1999). Em relação aos níveis plasmáticos de ureia apresentados na Figura 1B, observou-se que todos os tratamentos apresentaram uma elevação (CT:  $91,25 \pm 4,22$  mg/dL, OC:  $88,06 \pm 8,65$  mg/dL, AV:  $85,81 \pm 8,99$  mg/dL) em comparação ao grupo antes da indução do DM ( $30,54 \pm 4,22$  mg/dL), sem diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos avaliados. Estes dados corroboram aos achados da creatinina plasmática e indicam que a elevação apresentada pelos animais deve-se a proteólise ocasionada pelo DM.



**Figura 10-** Níveis séricos de creatinina (A) e uréia (B) nos três grupos experimentais antes da indução ao DM e ao final do experimento. ANOVA \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs. antes da indução ao DM

A hiperglicemia ocasiona aumento de filtração pelos rins, os glomérulos funcionam como filtros seletivos que com o passar dos anos e uma glicemia elevada a membrana basal se espessa, assim como a proporção de várias glicoproteínas de modo que a arquitetura molecular da membrana está modificada, esta membrana se torna mais espessa como mais permeável levando à perda de proteínas na urina (SMELTZER & BARE, 2009).

Almeida, (1997); Marzzoco & Torres (1999) relataram que como o organismo diabético não produz insulina ou tem redução na sensibilidade das células-alvo à ação deste hormônio, a deficiência de nível plasmático de insulina para atuar em níveis fisiológicos gera catabolismo protéico. Portanto, são comuns valores elevados de uréia, creatinina e ácido úrico em indivíduos diabéticos.

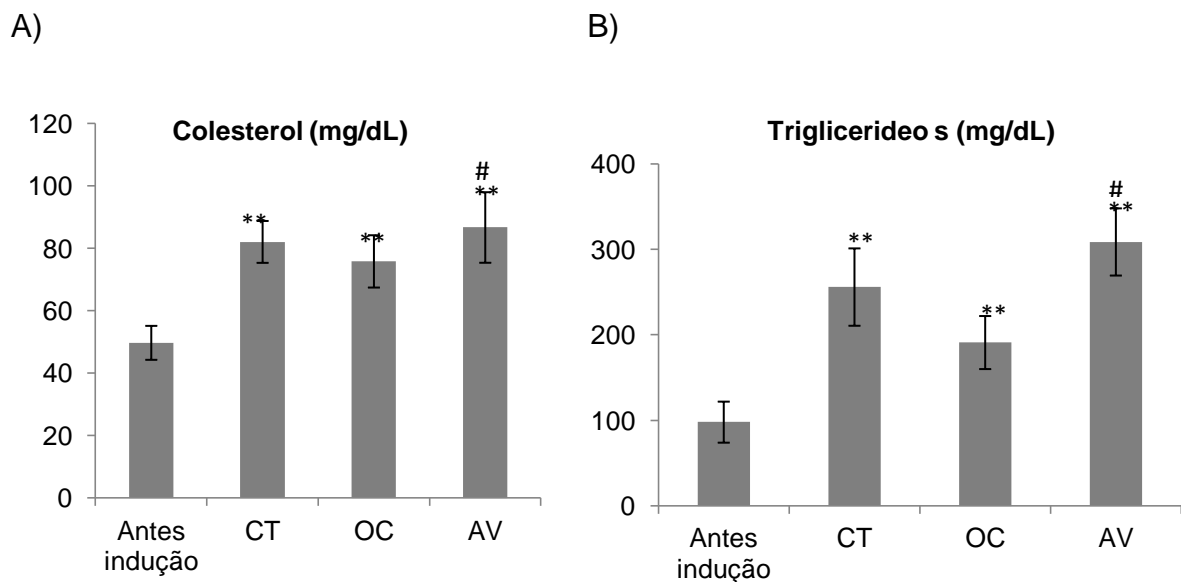
Embora a microalbuminúria seja o melhor marcador disponível para identificar insuficiência renal deve-se dosar em conjunto a creatinina em todos os indivíduos portadores de DM, com ou sem creatinina urinária ou em urina de 24 horas. Os valores para definição de nefropatia variam um pouco de acordo com o método. Para caracterizar a presença de nefropatia, algumas situações precisam ser descartadas antes do diagnóstico de nefropatia que podem elevar a excreção urinária de albumina incluem exercício físico intenso, febre, infecção, insuficiência cardíaca, piúria, hematúria, hiperglicemia e hipertensão arterial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

### 4.3 Colesterol e Triglicerídeos

Na Figura 11 encontram-se os valores plasmáticos de colesterol total (A) e triglicerídeos (B) nos animais experimentais antes da indução ao DM e ao término do período experimental. Observou-se aumento nos níveis de colesterol plasmático nos grupos CT ( $82,13 \pm 6,71$  mg/dL) e OC ( $75,88 \pm 8,38$  mg/dL) quando comparados com os níveis antes da indução do DM ( $49,77 \pm 5,44$  mg/dL). O grupo AV apresentou elevação maior deste parâmetro ( $86,75 \pm 11,31$  mg/dL) quando comparado ao grupo OC. Em contraste Kurowska *et al.* (1997) e Mcanlis *et al.* (1998), citados por Liberato (2001), não observaram alteração nos níveis séricos de colesterol em ratos ou camundongos com DM em seu experimento assim como encontrados por Lerco (2003) e Oliveira (2005).

Ao avaliar os níveis plasmáticos de triglicerídeos, observou-se o mesmo padrão de resultados. Os grupos CT ( $255,93 \pm 45,23$  mg/dL) e OC ( $191,06 \pm 31,01$  mg/dL) apresentaram hipertrigliceridemia quando comparados ao grupo antes da indução

( $98 \pm 24$  mg/dL), o grupo AV ( $308,69 \pm 39,28$  mg/dL) apresentou maior valor de triglicérides quando comparado ao grupo OC. Lerco (2003) encontrou valores para triglicérides de 350 mg/dL em ratos com diabetes, este valor difere da atual pesquisa onde os animais que foram induzidos apresentaram valores de 191 a 308,75 mg/dL. Por outro lado, Oliveira (2005) encontrou 220mg/dL de triglicérides ficando mais próximos dos resultados do presente estudo.



**Figura 11** - Níveis séricos Colesterol (A) e Triglicérides (B) nos grupos experimentais antes da indução ao DM e ao término do experimento. ANOVA \*\* $p \leq 0,01$  vs. antes da indução ao DM, # $p \leq 0,01$  vs. OC

Tanto para o colesterol quanto para os triglicérides, apesar de não apresentarem diferença estatística em relação ao grupo CT, observou-se uma pequena diminuição dos valores plasmáticos de ambas as substâncias no grupo OC. Esta redução do colesterol e triglicérides no grupo OC pode ter influenciado na análise estatística e indicado maior aumento destes parâmetros no grupo AV.

Armaganijan & Batlouni (2000); Rabelo & Martinez (1998) descrevem em seus estudos que a hipertrigliceridemia e a redução dos valores de HDL-colesterol representam as alterações mais comuns no diabetes, uma vez que a redução nos níveis de insulina ativa a lipase, fazendo com que esta enzima hidrolise os triglicérides armazenados em ácidos graxos e glicerol para a corrente sanguínea.

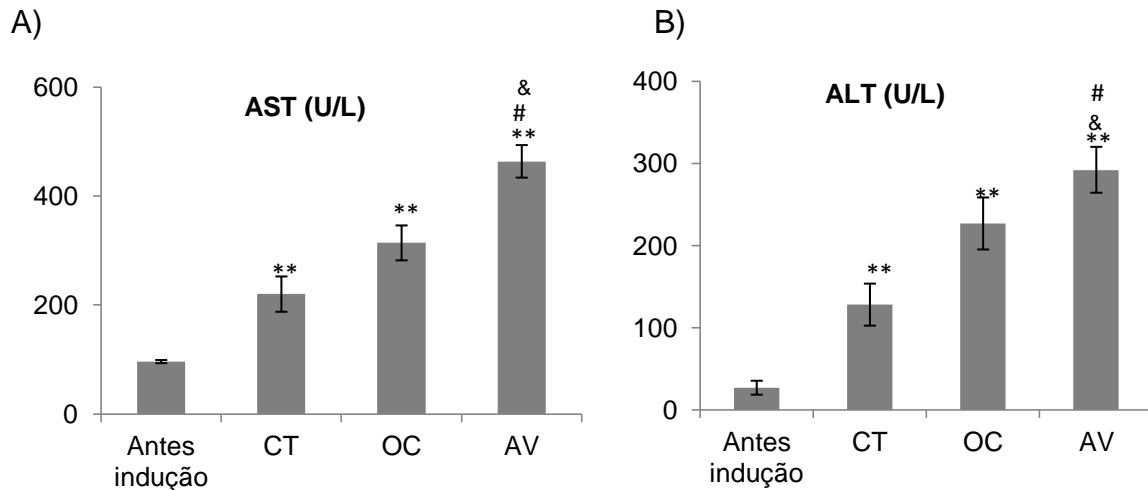
Como animais com diabetes induzido por Aloxano mimetizam o diabetes tipo 1 em humanos, ocorre a diminuição de insulina e aumento das taxas de triglicérides assim como em humanos (Umrani & Goyal, 2002; Blanco-Dolado et al., 2002; Campos et al., 2003).

#### 4.4 AST e ALT

A fim de verificar possíveis efeitos hepatotóxicos do óleo essencial da aroeira, avaliaram-se os valores plasmáticos de AST e ALT nos diferentes grupos. Estes resultados estão demonstrados na Figura 12.

Podem-se observar os grupos CT (AST  $220 \pm 32,4$ ; ALT  $128,1 \pm 25,6$  U/L) e OC (AST  $314,2 \pm 32,7$ ; ALT  $226 \pm 25,6$  U/L) apresentaram uma elevação dos níveis séricos desta enzimas quando comparados aos animais antes da indução ao DM (AST  $96,2 \pm 2,8$ ; ALT  $26,9 \pm 8,4$  U/L). Ao avaliar a toxicidade de um fitoterápico (Cassú Composto) por meio de estudos de toxicidade aguda, Rauber *et al.* (2006) encontraram níveis destas enzimas hepáticas em 126,6 e 64,6 U/L respectivamente para AST e ALT em ratas saudáveis o que diferem dos encontrados neste estudo .

O grupo AV (AST  $464 \pm 29,9$ ; ALT  $292,3 \pm 27,9$  U/L) apresentou maior elevação destes parâmetros quando comparados aos outros grupos, indicando possível efeito hepatotóxico do óleo essencial de aroeira. Miltersteiner *et al.* (2003) em sua pesquisa induziram ratos a cirrose biliar e relatam valores de AST 500 e ALT 140 U/L.



**Figura 12** - Níveis séricos de AST (A) e ALT (B) nos grupos experimentais antes da indução ao DM e ao término do experimento. ANOVA \*\* $p \leq 0,01$  vs. antes da indução ao DM, #  $p \leq 0,01$  vs. OC, &  $p \leq 0,01$  AV vs. CT

As transaminases são enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa-ceto-ácidos por transferência do grupo amino. Estão amplamente distribuídas nos tecidos, com predominância de AST no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e ALT no fígado, rim e coração. A ALT está presente no citosol enquanto AST na mitocôndria dos hepatócitos, a atividade plasmática destas enzimas é controlada por um mecanismo de liberação enzimática localizada na membrana do hepatócito (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Segundo Motta (2003) estas diferenças de localização auxiliam no diagnóstico e prognóstico de doenças hepáticas, pois em dano hepatocelular leve a forma predominante no soro é a citoplasmática enquanto em lesões graves há liberação de enzima mitocondrial elevando a relação AST/ALT. Este mesmo autor relatou que esta relação tem sido empregada para auxiliar no diagnóstico diferencial das hepatopatias em humanos, por exemplo, nos casos de hepatite viral tóxica a relação de AST/ALT é menor que 1, mas em casos de cirrose hepática é maior que 1.

Mincis & Mincis (2007) relatam que as transaminases também podem estar elevadas devido a doenças em outros órgãos ou tecidos, em especial o músculo estriado, tais como polimiosite e exercícios vigorosos, sendo que em condições relacionadas com lesões no músculo estriado estão também elevadas a creatina quinase (CK) e aldolase. A CK desempenha funções no músculo cardíaco, esquelético e cérebro. No músculo esquelético produz ATP para contração muscular através da

fosforilação da adenosina difosfato (HOCHLETHNER, 1994), e moderadas isquemias musculares transitórias resultam em aumento da concentração sanguínea de CK (LUMEIJ, 1997).

Motta (2003) descreve elevações de 4-8 vezes da AST e, ocasionalmente da ALT, em quadros de distrofia muscular e dermatomiosite em geral, entretanto os níveis plasmáticos destas enzimas estão dentro da faixa de normalidade em outras enfermidades musculares, especialmente as de origem neurogênica. Outro fato associado à elevação da relação AST/ALT é que em lesões hepáticas graves os valores de ALT podem declinar mais rapidamente por terem sido primeiramente lançadas na corrente circulatória permanecendo, portanto os valores de AST por mais tempo elevados, o que acaba elevando esta relação (LIMA, 2001).

Assim sendo, a elevação destas enzimas na presente pesquisa também pode estar associada a uma possível lesão muscular ocasionada pelo óleo essencial do fruto de aroeira, uma vez que os valores plasmáticos destas enzimas foram maiores no grupo AV em comparação aos outros grupos. Entretanto, os grupos diabéticos CT e OC também apresentaram, embora em menor intensidade, aumentos significativos dos níveis de AST e ALT, demonstrando um efeito do DM sobre estes parâmetros. Corroborando esses dados, Viana *et al.* (2004) demonstraram que a elevação na atividade dessas enzimas ocorre com maior frequência em pacientes diabéticos quando comparados a indivíduos normais e estão associadas a complicações como neuropatia e retinopatia, independente do consumo de álcool, índice de massa corporal e controle metabólico.

#### **4.5 Avaliação Tecidual Macroscópica**

A avaliação macroscópica das lesões visou observar hemorragias, presença de crosta, secreções e irritação tecidual ao redor da lesão. Durante o estudo não foi observada nenhuma ocorrência de hemorragia e secreção nos grupos experimentais nos tempos 0,7,14 e 21 dias.

As crostas estavam presentes com maior extensão nas lesões ao 7º dia de avaliação, em aproximadamente quatro animais do grupo CT, sete animais do grupo OC e sete animais do grupo AV, conforme demonstrado na Figura 13.



**Figura 13** - Evolução da cicatrização referente à presença de crosta nos três tratamentos: CT- A, OC - B e AV-C no 7º dia de avaliação.

Neto *et al.* (2006) observaram os efeitos do extrato hidroalcoólico de aroeira ao 7º dia e descreveram que a solução de continuidade causada pela retirada do fragmento de pele é inicialmente preenchida por coágulo, fibrina e exsudato inflamatório, originando a crosta fibrino-leucocitária. De acordo com Gabbini (1972) In: Neto *et al.* (2006) o processo de cicatrização por segunda intenção, como o presente neste estudo, possui características diferentes da cicatrização por primeira intenção embora as reações inflamatória, remodelação e maturação sejam idênticas para os dois processos. Na cicatrização por primeira intenção não há exposição da lesão ao meio externo sendo a fagocitose de coágulo e fibrina mais eficiente e, desta forma, não há a formação de crosta.

Ao 14º dia de tratamento as crostas estavam presentes com menor extensão, bom aspecto e secas descamantes em dois animais do grupo CT, um animal do grupo OC e três animais do grupo AV como demonstrado nas fotos A, B e C da figura 14.



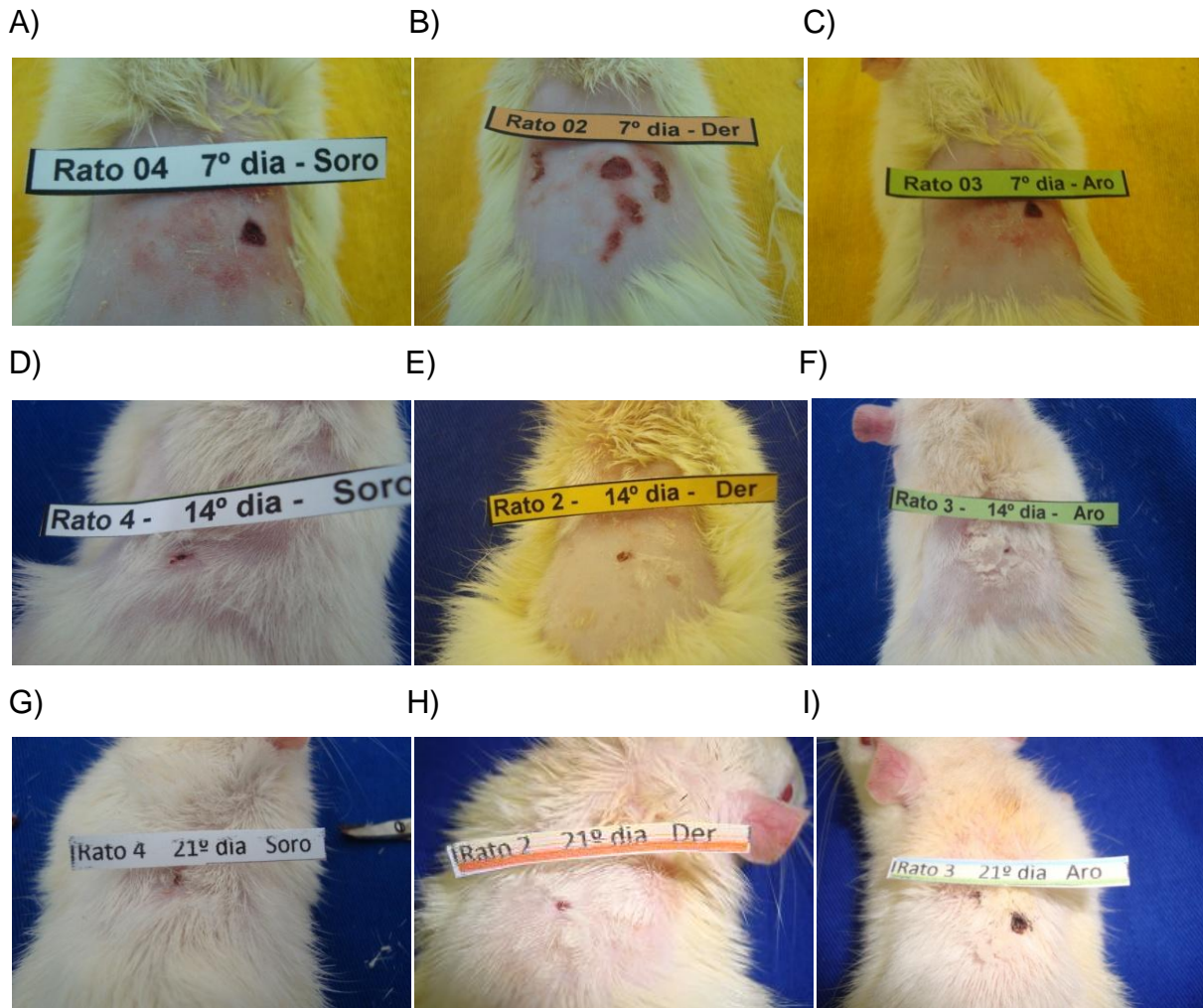
**Figura 14** - Evolução da cicatrização referente à presença de crosta nos três tratamentos: A = CT, B = OC e C = AV no 14º dia de avaliação.

Na figura 15 podemos observar fotos do processo de cicatrização com 21 dias nos diferentes grupos estudados. Apenas um animal de cada tratamento apresentou presença de crosta superficial sobre a lesão com bom aspecto e tecido cicatrizado abaixo, no grupo AV esta crosta era mais densa e apresentava-se em uma região maior da área da lesão.



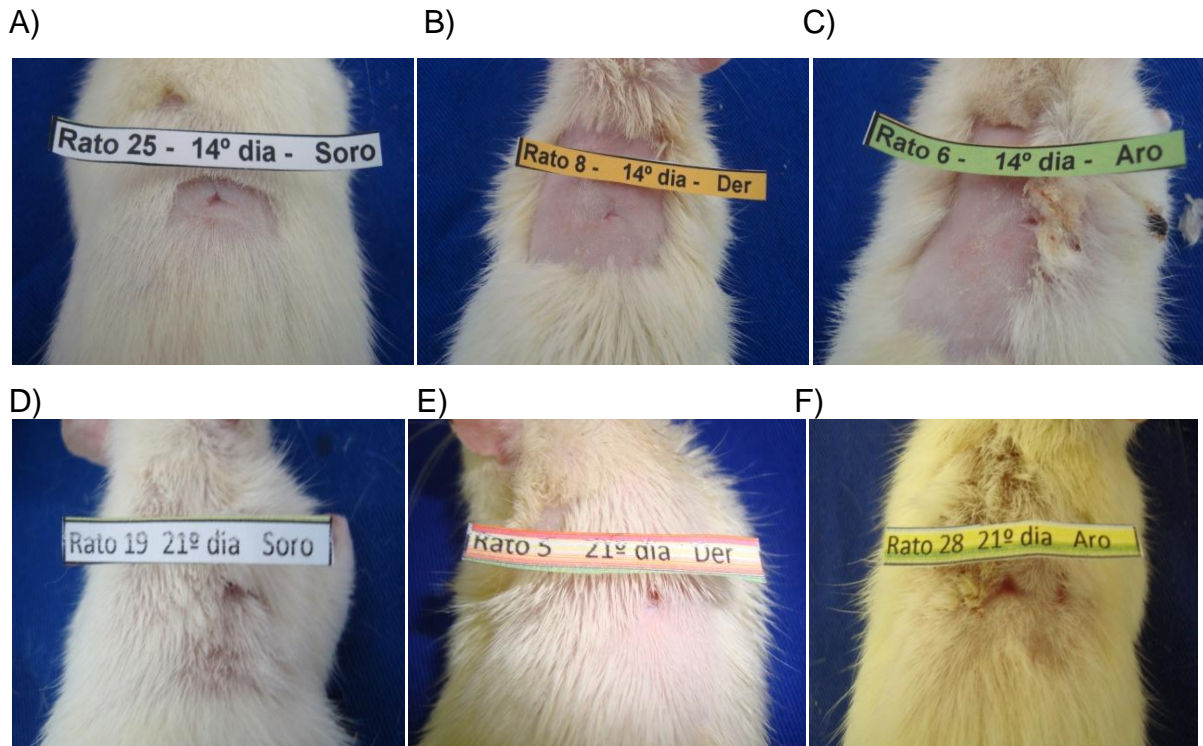
**Figura 15** - Evolução da cicatrização referente à presença de crosta na avaliação macroscópica de lesão tratadas em três diferentes grupos A = CT, B = OC e C = AV, 21º dia

Na avaliação macroscópica referente à eritema tecidual ao redor da lesão (Figura 16), esta foi observada em apenas 1 animal dos grupos CT e OC, enquanto que seis animais do grupo AV no período de 7 dias de tratamento. Após 14 e 21 dias somente o grupo AV apresentou irritação em seis e oito animais respectivamente.



**Figura 16** - Avaliação macroscópica de eritema tecidual ao redor da lesão nos diferentes grupos estudados. CT- Soro Fisiológico (A, D e G; tempo 7, 14 e 21 dias respectivamente), OC- Óleo comercial (B, E, e H; tempo 7, 14 e 21 dias respectivamente) e AV- Óleo essencial de Aroeira (C, F e I; tempo 7, 14 e 21 dias respectivamente)

Em relação à reepitelização (Figura 17) esta ocorreu de maneira completa após 14 dias em cinco ratos do grupo CT e em três animais do grupo OC e AV. Quatro animais do grupo CT, cinco do grupo OC e seis do grupo AV apresentavam reepitelização incompleta. Aos 21 dias, todos os ratos do grupo CT apresentaram reepitelização completa, assim como três animais do grupo OC e oito animais do grupo AV.



**Figura 17** - Avaliação macroscópica quanto à presença de reepitelização completa de lesão nos diferentes grupos estudados. CT-A, OC - B e AV - C com 14 dias de tratamento e D, E e F ao 21º dia de tratamento nos grupos CT, OC e AV respectivamente

Amorim e Santos (2003) utilizaram gel de aroeira consistindo de uma mistura de extrato hidro-alcoólico de aroeira com gel de carbono para o tratamento de vaginose bacteriana sintomática em mulheres, Neto *et al.* (2006) avaliaram o efeito cicatrizante da administração tópica do extrato hidro-alcoólico de aroeira em lesões na região dorso costal de ratos, Ribas *et al.*,(2006) utilizaram extrato hidro-alcoólico da folha de aroeira em ulcerações na mucosa de ratos. Estes autores não relataram qualquer tipo de eritema referente à utilização da aroeira o que difere do encontrado nesta pesquisa.

Verificou-se que o grupo AV apresentou ao redor das lesões uma área eritematosa, após a aplicação do óleo os animais tentavam morder e coçavam a região, logo este fato poderia ter contribuído para as alterações bioquímicas observadas neste grupo, pois um dos fatores mais importantes para a liberação de cortisol inclui o estresse (GUYTON & HALL, 2009). Este glicocorticóide altera o metabolismo da glicose promovendo aumento de sua concentração sanguínea, age sobre o metabolismo das proteínas promovendo sua degradação e mobiliza gordura de seus depósitos.

Em conjunto estes efeitos podem ter colaborado para o aumento da glicemia e dos níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides. Adicionalmente, as enzimas AST e ALT também se apresentaram alteradas no grupo AV. Sabe-se que uma maior síntese de glicocorticóides endógenos ocasiona um aumento de duas a cinco vezes dos níveis plasmáticos dessas enzimas. Entretanto, tal elevação não indica necessariamente uma lesão hepática, uma vez que em lesão hepática provocada por glicocorticóides estas enzimas podem apresentar uma elevação de até 40 vezes (THRALL, 2006).

Corroborando esses dados, Armario *et al.*, (1986) analisaram os níveis de glicose em ratos submetidos a intensidades gradualmente aumentadas de estresse e observaram que existia uma correlação positiva entre o nível de estresse e a glicemia. Brown & Grunberg (1995) em sua pesquisa observaram que as condições da gaiola afetam os níveis de estresse conforme o gênero; machos apresentam altos níveis de estresse sob condições de restrição e as fêmeas quando alojadas individualmente, desta forma viver sozinha parece ser a causa de estresse nas fêmeas, enquanto que os machos são mais afetados por um espaço restrito que pelo número de animais no ambiente. Na presente pesquisa este fator deve ser considerado como um estresse para as ratas utilizadas.

Padgett *et al.* (1998), estabeleceram um modelo de cicatrização para estudar os mecanismos de imunossupressão no estresse induzido em ratos, e concluíram que a função do macrófago é influenciada por glicocorticóides, que reduzem a ação pró-inflamatória na liberação de citocinas e quimiocinas. Esta redução na inflamação e cicatrização está correlacionada com os níveis de corticosterona no soro, uma vez que quanto maior o nível de corticosterona mais lenta a cicatrização. Em conjunto estes dados sugerem a homeostase neuroendócrina modula a cicatrização de feridas e a perturbação destes eixos por estressores exógenos pode ter conseqüências significativas para a homeostase e a saúde do hospedeiro.

#### 4.6 Avaliação Tecidual Microscópica

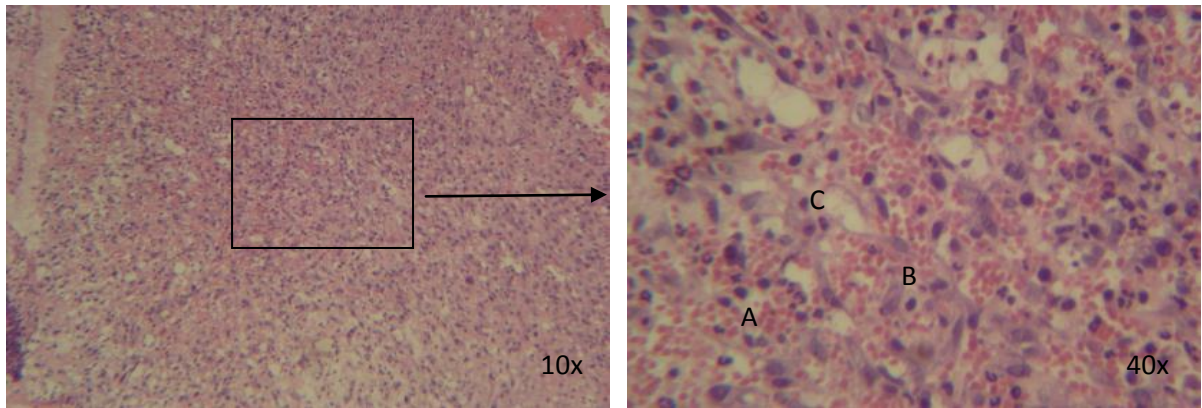
Na Tabela 2 encontram-se os resultados da avaliação histológica referente ao 7º dia de tratamento. O grupo CT apresentou cinco animais com indução da cicatrização por 2ª intenção, conforme demonstrado pela desunião da epiderme e crescimento do tecido de granulação a partir da crosta, fibroblastos, vasos neoformados e depósito de fibrina em reabsorção por neutrófilos e/ou macrófagos.

**Tabela 2-** Avaliação histológica no 7º dia tratamento nos grupos CT, OC e AV

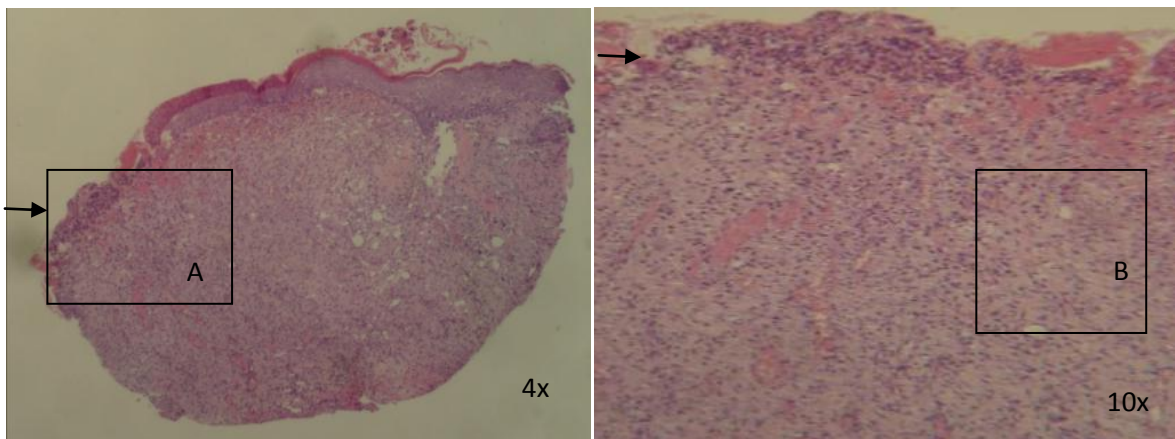
Variáveis histológicas 7 dias	Tratamentos						p
	CT		OC		AV		
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
Cicatrização por 2ª intenção	5	4	4	5	4	6	0,78
Cicatrização acelerada	0	9	0	9	4	6	0,02*
Dermatite séptica	1	8	1	8	0	10	0,55

\*p ≤ 0,05

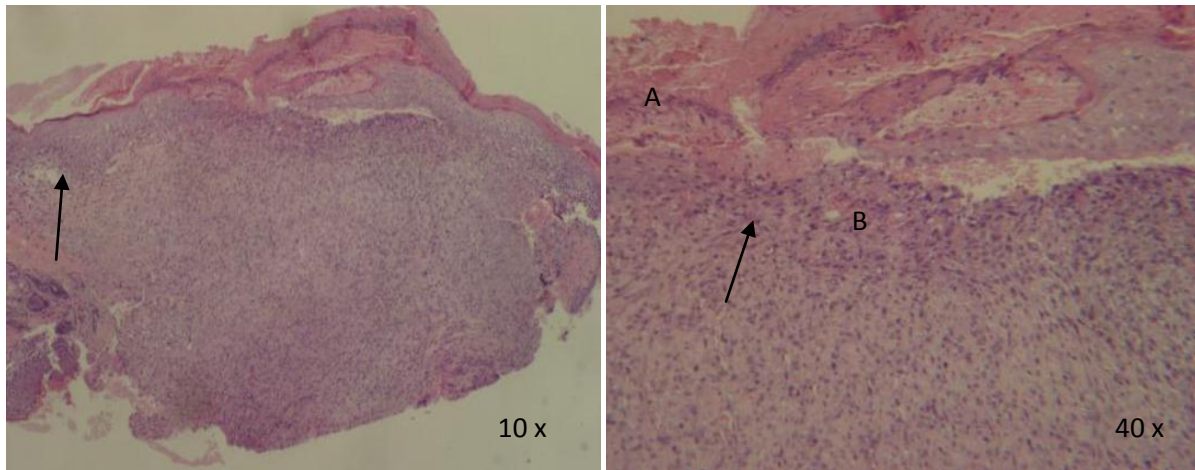
O grupo OC (Figura 18) apresentou quatro animais com cicatrização por 2ª intenção com persistente estímulo para formação de tecido de granulação e no grupo AV (Figura 19) quatro animais apresentaram tecido de granulação com predomínio de fibroblastos e de colágeno I e vasos neoformados diminuídos, sugerindo aceleração da cicatrização de 2ª intenção e fase de remodelação do tecido de granulação. O quadro de dermatite séptica ocorreu em um animal do CT e OC e nenhum animal do grupo AV, o que pode estar relacionado com ação antimicrobiana da aroeira (MARTINEZ *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2006).



**Figura 18** - Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal CT apresentando proliferação de tecido de granulação, predominando macrófagos ativados, neutrófilos e hemácias (A), menos significativamente fibroblastos (B) e células endoteliais em proliferação (C).



**Figura 19** - Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal OC apresentando tecido de granulação formado sob coágulo de sangue (seta), tecido conjuntivo neoformado de grande extensão (A), discreta infiltração de neutrófilos e predomínio de monócitos, colágeno, fibras elásticas, vasos neoformados e fibroblastos(B).



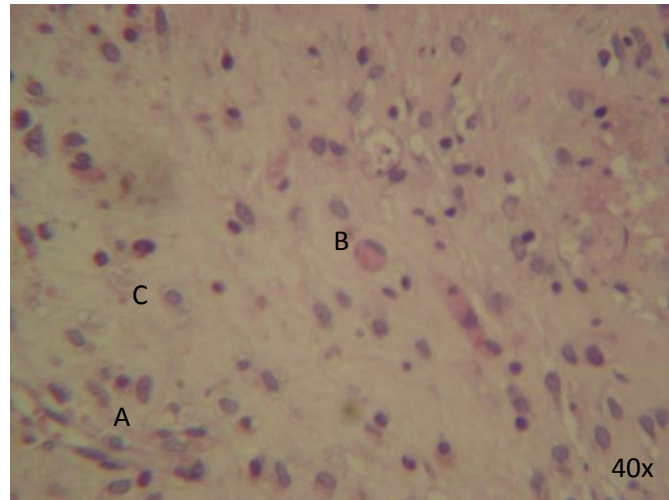
**Figura 20** - Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal AV apresentando epiderme quase que unida coberta por crosta de exsudato plasmático com neutrófilos degenerados (seta) e a derme unida por novo tecido conjuntivo, proliferação predominante de fibroblastos (A), poucos vasos neoformados (B) e deposição de colágeno

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da avaliação histológica referente ao 14<sup>o</sup> dia de tratamento. No grupo CT (Figura 21) em seis animais infere-se cicatrização por 2<sup>a</sup> intenção com formação de tecido de granulação em fase de colagenização e iniciando remodelação. No grupo OC (Figura 22) cinco animais apresentaram cicatrização por 2<sup>a</sup> intenção, com união e consolidação da ferida e formação de escara de tecido fibroso colagenizado sobre a ferida e no grupo AV (Figura 23) sete animais apresentaram tecido de granulação colagenizado depositado sobre a epiderme aproximada e regeneração, sem diferenças entre os grupos no processo de cicatrização neste período. O grupo AV apresentou 10 animais sem o processo de injúria ocasionado pela retirada do tecido ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo OC que apresentou três animais.

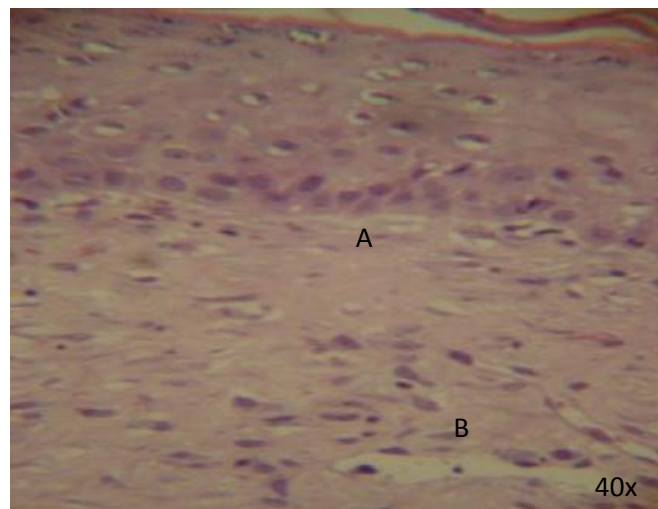
**Tabela 3-** Avaliação histológica no 14<sup>o</sup> dia tratamento nos grupos CT, OC e AV

Variáveis histológicas 14 dias	Tratamentos						p
	CT		OC		AV		
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
Cicatrização por 2 <sup>a</sup> intenção	6	3	5	3	7	3	0,95
Injúria	0	9	3	5	0	10	0,03*
Processo consolidado	5	4	3	5	3	7	0,51

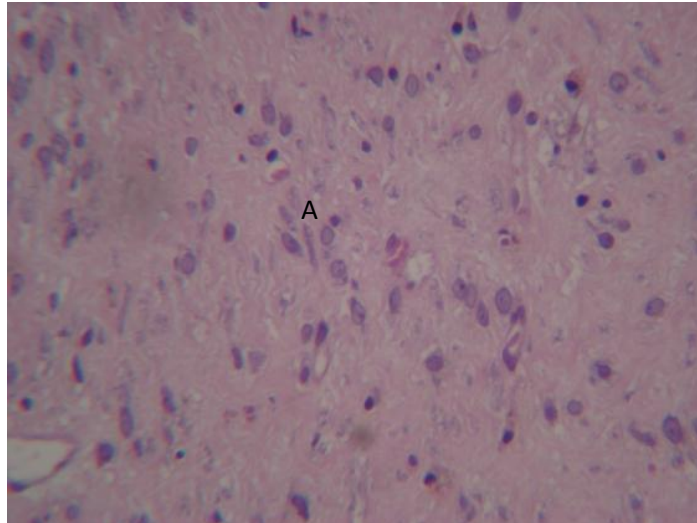
\* $p \leq 0,05$



**Figura 21** - Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal CT no 14<sup>o</sup> dia de tratamento apresentando tecido de granulação em pico de deposição de colágeno (A), poucos vasos neoformados(B) e fibroblastos (C)



**Figura 22** - Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal OC no 14<sup>o</sup> dia de tratamento apresentando tecido de granulação com predomínio de colágeno (A) e menos significativamente fibroblastos e vasos neoformados (B)



**Figura 23** - Fotomicrografia típica de tecido cutâneo de um animal OC no 14º dia de tratamento apresentando tecido de granulação colagenizado e com fibras elásticas esparsas (A)

Na Tabela 4 encontram-se os resultados da avaliação histológica referente ao 21º dia de tratamento. O grupo CT apresentou oito animais com tecido de granulação colagenizado pós-cicatrização de 2ª intenção iniciando retração da ferida com consolidação da ferida e um animal com retardo deste processo. No grupo OC, em cinco animais estavam presente cicatrização por 2ª intenção e três apresentaram tecido de granulação ainda não totalmente retraído e retardo neste processo. O grupo AV apresentou oito animais com cicatrização de 2ª intenção e tecido de granulação colagenizado pós-cicatrização iniciando retração da ferida com consolidação. Quando comparado o processo de cicatrização do grupo OC com AV este apresentou ( $p < 0,05$ ) uma cicatrização mais eficaz o que se iguala o grupo CT.

No grupo AV constatou-se três animais com dermatite séptica ( $p < 0,05$ ), os grupos CT e OC não apresentaram, este fato pode estar correlacionado ao fato de o grupo AV apresentar-se estressado com o tratamento realizado. Palma *et al.* (2007) relataram que os glicocorticoides atuam como moduladores do sistema imunológico, sendo que tanto a sua liberação excessiva como sua deficiência estão associados a enfermidade e qualquer distúrbio resulta em desequilíbrio imunológico, a hiperestimulação de glicocorticoides a longo prazo pode resultar em imunossupressão intensa e suscetibilidade aumentada a infecção.

**Tabela 4-** Avaliação histológica no 21<sup>o</sup> dia tratamento nos grupos CT, OC e AV.

Variáveis histológicas 21 dias	Tratamentos						p
	CT		OC		AV		
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
Cicatrização por 2 <sup>a</sup> intenção	1	8	3	5	2	8	0,75
Processo consolidado	8	1	5	3	8	2	0,02*
Dermatite séptica	0	9	0	8	3	7	0,04*
Cicatrização retardada	1	8	3	5	1	9	0,62

\* p &lt; 0,05

De acordo com, Robbins e Cotran (2004) e Mc Gavin e Zachary (2007), quando não há aproximação e alinhamento íntimo do epitélio, a cicatrização é de 2<sup>a</sup> intenção, e há formação do tecido de granulação de crescimento alongado e desordenado, preenchendo a área lesada e não epitelizada da derme, proliferando da camada subcutânea para o epitélio. No estroma de tecido conjuntivo danificado, observa-se macrófagos e/ou neutrófilos.

A proliferação endotelial é um processo fundamental no mecanismo de cicatrização e depende da presença de macrófagos, que promovem a neo-angiogênese devido as suas interações com prostaglandinas e tramboxanos. Dos capilares rompidos originam-se brotos endoteliais que proliferam rapidamente, formando cordões sólidos, entremeando-se com fibrobastos que se canalizam permitindo o fluxo sanguíneo para a lesão (ROBBINS & COTRAN, 2004). Este processo foi igual para o grupo CT e OC e diferenciado no grupo AV com uma menor intensidade ao 7<sup>o</sup> dia de avaliação demonstrando uma aceleração no processo de cicatrização. Este resultado provavelmente se deve ao fato do extrato de aroeira atuar no reparo do tecido conjuntivo, diminuindo rapidamente a intensidade do processo inflamatório crônico e da angiogênese e por acelerar a maturação do colágeno (RIBAS *et al.*, 2006).

O processo de aceleração da cicatrização desta pesquisa corroboram com os dados de Ribas *et al.* (2006) que relataram processo de cicatrização acelerado de lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal de ratos tratados com extrato das folhas de *Schinus terebentifolius* Raddi em relação ao grupo controle, além de uma maior proliferação vascular e fibroblástica. Hoffman *et al.* (2006) avaliaram o extrato

hidroalcoólico de aroeira em anastomoses de cólon em ratos observaram que a administração intraperitoneal favoreceu a cicatrização, em nível microscópico.

Em estudo realizado por Nunes *et al.* (2008), a ação cicatrizante do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi, injetado intraperitonealmente, foi evidenciada pelo aumento de fibroblastos na sutura da parede abdominal de ratos e por induzir um aumento da carga máxima de ruptura e deformação máxima da linha alba na análise tensiométrica. Em conjunto estes dados indicam o potencial cicatrizante e antiinflamatório da aroeira vermelha.

Dentre as possíveis substâncias capazes de provocar estes efeitos pode-se citar os taninos. Lima *et al.* (2006) relataram que altas concentrações de taninos foram detectadas em espécies vegetais, como o angico e a aroeira. Estes taninos têm sido associados às atividades cicatrizantes destas espécies e resultados semelhantes já haviam sido relatados em trabalhos anteriores com a utilização de extratos de plantas ricas em taninos.

Apesar dos estudos acima citados, outras investigações parecem contradizer os efeitos benéficos da utilização da aroeira vermelha em feridas. Lucena *et al.* (2006) avaliaram ação cicatrizante do extrato hidroalcoólico da aroeira em bexigas de ratos e microscopicamente o grupo aroeira mostrou processo inflamatório agudo mais severo. De acordo com os autores certo grau de inflamação é necessário, contudo uma reação inflamatória intensa é prejudicial, pois pode haver comprometimento da microcirculação e ainda inibir a proliferação celular na parede abdominal. Estes autores relataram que macroscopicamente não houve diferença em comparação ao grupo controle com 7 dias de tratamento.

Experimentos realizados por Santos *et al.* (2006) e por Branco Neto *et al.* (2006) não confirmam a atividade cicatrizante dos extratos hidroalcoólicos de aroeira. A utilização tópica do extrato hidroalcoólico de aroeira em feridas abertas na região dorso costal de ratos retardou a reepitelização das feridas da pele das cobaias (BRANCO NETO *et al.*, 2006). Esta divergência na avaliação da cicatrização da aroeira pode ter sido influenciada pela época da colheita, horário e modo de secagem atuando na composição do material utilizado (SILVA *et al.*, 2003).

A reepitelização, que é o recobrimento da ferida por novo epitélio e consiste tanto na migração quanto na proliferação dos queratinócitos a partir da periferia da lesão, também ocorre durante a fase proliferativa. Durante a fase inflamatória a liberação de fatores de crescimento por plasma, fibroblastos e macrófagos/neutrófilos ativa os queratinócitos localizados nas margens e no interior do leito da ferida. Dentre os fatores de crescimento destacam-se o PDGF, que induz a proliferação de fibroblastos com consequente produção da matriz extracelular durante a contração da ferida e reorganização da matriz, o KGF7, que é considerado o principal regulador da proliferação dos queratinócitos, assim como o TGF- $\beta$ , principal responsável pelo estímulo inicial da migração das células epiteliais (SANTORO & GUAIDINO, 2005).

A ativação de receptores de integrinas pelos queratinócitos permite a interação com uma variedade de proteínas da matriz extracelular na margem e no leito da ferida. Por outro lado, a expressão e ativação de metaloproteases promovem a degradação e modificação das proteínas da matriz extracelular no sítio da ferida, facilitando a migração celular. A própria atividade proteolítica dessas enzimas pode liberar fatores de crescimento ligados à matriz extracelular de forma a manter constante o estímulo à proliferação e migração dos queratinócitos, acelerando o processo de reepitelização (SANTORO & GUAIDINO, 2005).

Robbins & Cotran (2004) descrevem que após o pico de deposição de colágeno, aproximadamente aos 14 dias pós lesão, há remodelação do tecido de granulação para tecido conjuntivo imaturo, por dissolução do colágeno e reformação de fibras de colágeno extracelular, diminuição da quantidade de fibroblastos e de vasos sanguíneos que entram em trombose, degeneram e são reabsorvidos por macrófagos. Ribas *et al.* (2006) relataram encontrar maior proliferação fibroblástica ao 14º e não encontraram diferença histológica entre o grupo controle e aroeira ao 21º dia de tratamento com extrato hidroalcoólico de aroeira.

## 5 CONCLUSÃO

Considerando os resultados e a metodologia empregada pode-se concluir que o óleo essencial do fruto de aroeira utilizado isoladamente no processo de cicatrização por 2ª intenção em ratas Wistar induzidos ao Diabetes Melitus promoveu uma cicatrização acelerada ao 7º dia de avaliação histológica em comparação aos grupos controles e promoveu uma proteção contra infecções bacterianas, embora tenha ocasionado eritema nos animais que receberam este tratamento. Sugere-se que a utilização de um veículo e/ou diluição do mesmo possa diminuir este efeito adverso causado pelo óleo essencial do fruto de aroeira vermelha.

## 6 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. et al. **Biologia Molecular da célula**. 4ª edição, Artmed, Porto Alegre, 1300-1303. 2004.

ALMEIDA, S.M. de; FERREIRA, R.I.; BOSCOLO, F.N. Influência da irradiação sobre o conteúdo de colágeno, durante a cicatrização, em ratos diabéticos. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, [S.l.], v.16, n.4, p. 293-298, dez. 2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 29, p. 543-548, 2006.

AMORIM, M.M.R. de; SANTOS, L.C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v.25 n.2. Rio de Janeiro, mar. 2003.

AMORIN, P.C. **A Técnica de diafribólise percutânea no tratamento de aderências e cicatrizes**. TCC apresentado ao curso de fisioterapia da Universidade Severino Sombra. Vassouras/RJ, 2005.

ANDERSON, T.; SCHEIN, P.S.; McMENAMIN, M.G. et al. Streptozotocin diabete: correlation with extent of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide. **Journal Clin. Invest.**, v. 54, p. 672-677. 1974.

ARAÚJO, R.C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro**. 2010. 181 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicada. 2010.

ARMARIO, A; MONTERO, J.L; BALASCH, J. Sensitivity of corticosterona and some metabolic variables to graded levels of low intensity stress in adult male rats. **Physiology & Behavior**, v. 37, n. 4, p.559-561, 1986.

BALBINO, C.A; PEREIRA, L.M; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 41, p. 27-51. 2005.  
BARANOSKI, S. **Nursing Management**. 2001, v.32 n.8, p. 25-32, disponível em [www.nursingcenter.com](http://www.nursingcenter.com). Acesso em: 21 de março de 2011.

BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA L.T. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** p.52-6, 2008

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. et al. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Quimica Nova**. v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BENDER, I.B.; BENDER, A.B. 2003. Diabetes mellitus and the dental pulp. **Journal Endodon**, v.29, n.6, p. 383-389.

BLAKYTNY R; JUDE E. The molecular biology of chronic wounds and delayed

healing in diabetes. **Diabetic Med.** v.23, p.594-608, 2006.

BLANES, L. **Tratamento de feridas.** Cirurgia Vascular: guia ilustrado. São Paulo: Baptista-Silva J.C.C., 2004. Disponível em: <[www.bapbaptista.com](http://www.bapbaptista.com)> Acesso em: 21 de maio 2011.

BOGLIOLO, L. **Patologia Geral.** Editor Geraldo Brasileiro Filho. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BORNHAUSEN, R. **Ervas do Sítio.** Disponível em: <<http://www.ervasdositio.com.br/enciclopedia/enciclopedia.asp>>. Acesso em: 23 de abril 2011.

BRANCO NETO, M.L.C.; RIBAS FILHO, J.M.; MALAFAIA, O. et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira.** Supl., v.2, pág.15-20, 2006.

BRASIL, **Ministério da Saúde.** Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília : Ministério da Saúde, 2006. Cadernos de Atenção Básica, n. 16, Série A. Normas e Manuais Técnicos.

BRASIL, Portal da Saúde, **Ministério da Saúde,** 2011, Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=2.9944&janela=2](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=2.9944&janela=2) Acesso em: 20 de novembro de 2011

BREM H, TOMIC-CANIC M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **Journal Clinic Invest.** v.117, p. 1219-22, 2007.

BROWN, K.J; GRUNBERG, N.E. Effects of housing on male and female rats: crowding stresse males but calms femeles. **Physiology & Behavior,** v.58, n 6, p. 1085-1089, 1995.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arquivo Brasileiro Cirurgia Digestiva,** São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CARVALHO, P.T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria:Estudo experimental em ratos diabéticos.** 2002, 72f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia), Universidade de São Paulo, 2002.

CAVALLI, V.L. de L.O.; SORDI, C.; TONINI, K. et al. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. **Brazilian Journal of Pharmacognosy,** vol.17 n.1, p. 64-70, Jan./Mar. 2007.

DANTAS, S.R.P.E.; JORGE, S. A. **Feridas e Estomas.** 1 ed. São Paulo: Edição do Autor, 2005.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKY, J. N.; SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Visão Acadêmica.** v. 5, n.2 p. 83-90, 2004.

DELFINO, V.D.A.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T. et al. Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **Jornal Brasileiro Nefrologia**, v. 24 n.1, p. 31-6, 2002.

ELIASSON, L.; ABDULKADER, F.; BRAUN, M. et al. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. **Journal Physiologia**, v. 586, p. 3313-3324, 2008.

FELIG, P. et al. Endocrinology and metabolism. In: \_\_\_\_\_. **The endocrine pancreas: diabetes mellitus**. 3 rd. New York: Macgraw-Hill, Cap.19, p.1107-1250, 1995.

FERREIRA, A. B. H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986.

FOSS-FREITAS, M.C.; FOSS, M.C. Cetoacidose diabética e estado hiperglicêmico hiperosmolar. In Simpósio: urgências e emergências endócrinas, metabólicas e nutricionais, 36, 2003, São Paulo. **Anais...** Ribeirão Preto: USP, 2003. p. 389-393.

GABBAY, M.; CESARINI, P.R.; DIB, S.A. Diabetes melito tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. **Jornal de Pediatria**, v.79, n.3, p. 201-208, 2003.

GARROS, I. DE C.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA, E.M. *et al.* Extrato de *passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, p.55-66, 2006.

GAZZANEO, L.R.S. et al. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **J. Ethnobiol. Ethnomed. London**, v. 1, p. 1-9, 2005.

GRAVES, D.T.; NAGUIB, G.; LEONE, C.; HSUE, H.; KRALL E. Inflammation is more persistent in type I diabetic mice. **J. Dent. Res.** v 84, n 4, p. 324-328, 2005.

GRAY H, et al. Gray's anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery. Nova Iorque: Churchill Livingstone;. p.395-416.1995. In\_\_\_\_: ISAAC C, LADEIRA P.R.S, REGO F.M.P, *et al.* Physiological wound healing. **Ver. Med.** V. 89, n.3/4, p.125-31 jul.-dez. 2010

GUERRA, M. J. M.; BARREIRO, M. L.; RODRIGUEZ, Z. M.; RUBALCADA, Y. Actividade antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi. Inst. Superior de Ciências Médicas de La Habana. **Revista Cubana Plant. Med.**, v.5, n.1, p. 5-23, 2000.

GUIMARÃES, M.J. de A.R.. **Avaliação do efeito do extrato aquoso da Bauhinia forficata (Pata de Vaca) no perfil glicêmico e lipídico de ratos wistar machos em modelo de diabetes induzida por aloxano**. 2005. 71f. Dissertação (Mestrado em Biociências) Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. 2005.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115p.

GUYTON, G.P; SALTZMAN C.L. The diabetic foot. Basic mechanisms of disease. **J Bone Joint Surg**. v.83, p.1084-96,2001.

HADDAD, M. C.; VANNUCHI, M. T. O.; CHENSO, M. Z. B.; HAULY, M. C. O. Uso do açúcar em feridas contaminadas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 152-163,1983.

HOCHLEITHNE, M. BIOCHEMISTERIS. In\_\_ RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. Avian Medicine: principais and application, Florida: Wingers, 1994, p.229.

HOFFMAN, I.; COUTINHO, L. S.; TORRES, O. J. M. *et al.* **Efeito do extrato hidroalcoólico da Aroeira (*Schinus terebentifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas**. Estudo experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.* v.21, n.3, p. 49-54, 2006

IRION, G. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Tradução João Clemente Dantas do Rego Barros. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.390, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**, 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KISS, A.C.I.; TAKAKU, M.; DAMASCENO, D.C. *et al.* Efeito do extrato aquoso de *Allium sativum* L. sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabetes induzido por Streptozotocin. **Revista Brasileira PI. Medicina**, Botucatu, v.8, n.3, p.24-30, 2006.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne e Levy fisiologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

KUMAR, S.; WONG, P.F.; LEAPER, D.J. What's New in Wound Healing? **Turk Journal Medicina Science**, v. 34 p.147-160. 2004.

LADEIRA P.R.S; ISAAC C; PAGGIARO A.O; HOSAKA E.M; FERREIRA M.C. Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares/*Lower limb ulcers in diabetic patients: molecular and cellular mechanisms*. **Rev Med**. v. 90, n 3, p. 122-7, 2011.

LERCO, M.M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M. *et al.* Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n 2, p. 132-141, 2003.

LIMA, A.O. **Métodos de Laboratório Aplicados a Clínica**. 8ª Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, E.C.P.A.; LUNA, J.S. *et al.* The antibiotic activity of some

Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 300-306, 2006.

LIMA, C. R.; COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M.A. *et al* Atividade Cicatrizante e Estudo Toxicológico Pré-Clínico do Fitoterápico Sanativo®. **Acta Farm. Bonaerense** v.25 , n.4, p. 544-9, 2006.

LIBERATO, S.C. **Efeito do flavonóide narigenina em ratos e coelhos com diabetes induzida por aloxano**. 2001, 194f. Viçosa, Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2001.

LUCENA, P.L.H.; RIBAS-FILHO, J.M.; MAZZA, M. *et al*. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 21, Supl. 2. 2006.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5ª ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932p.

MAEHATA, Y.; TAKAMIZAWA, S.; OZAWA, S. *et al*. Type III collagen is essential for growth: acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. **Matrix Biology**. v. 26, p.371-38, 2007

MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, E.P., MANDELBAUM, M.H.S.A., 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Part I. **Anais... Brasileiro Dermatologia**, v.78, n.4, p. 393-410. 2003.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica / Basic Biochemistry**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999, 360 p.

MARTINEZ, M.J.; GONZALEZ, N.A.; BADELL, J.B. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Cubana Plantas Medicinai**s, n.3, p. 37-39, 1996.

MATSCHINSKY, F. M.; BANTING LECTURE. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**. v.45, p. 223-41, 1996.

MAUVAIS-JARVIS, F.; VIRKAMAKI, A.; MICHAEL, M. D. *et al*. A model to explore the interaction between muscle insulin resistance and cell dysfunction in the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, vol. 49, p. 2126-2134, 2000.

MAVIOSO, C., 2003. Noções Básicas sobre feridas e cicatrização <http://www.gaif.net/feridasecicatriz.pdf>. Acesso em: 8 out 2011.  
MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. Pathologic basis of Veterinary diseases. **Mosby Elsevier**, 4ª ed., p. 1476, 2007.

MEIRELES, G.C.S; OLIVEIRA, P.C.; MOURA, A.P. *et al*. A influência do diabetes mellitus tipo 1 na cronologia do reparo de queimaduras. **C&D-Revista Eletrônica da**

**Fainor**, Vitoria da Conquista, v.2, n.1, p.77-86, jan./dez. 2009. Disponível em: <http://srv02.fainor.com.br/revista/index.php/memorias/article/viewFile/64/38>. Acesso em: 20 dez 2011.

MENDONÇA, R. J. de; COUTINHO-NETTO J. Aspectos celulares da cicatrização **Anais.. Brasileiro Dermatologia**. 2009, v. 84, n.3, p.257-62.

MILLER, O; GONÇALVES, R.R. **Laboratório para o Clínico**. 8 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 609 p.

MILTERSTEINER A, MILTERSTEINER D, PEREIRA FILHO N *et al.* Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirurgica Brasileira** [serial online] Maio-Jun, v.18 n.3, 2003. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>. Acesso em 23 de outubro de 2011.

MINCIS, M.; MINCIS, R. Doenças hepáticas: Por que são importantes para o estudo de doenças do fígado. **Prática Hospitalar**. Ano IX. n. 51, 2007. Disponível em: <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2051/pdfs/mat%2007.pdf>. Acesso em: 25 janeiro 2012.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. DE L; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**, V. 28, N. 5, 892-896, 2005.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o Laboratório: Princípios e interpretações**. 4ªed. Porto Alegre: Médica Missau, 2003.

NATTRAS, M.; HALLES, P.F. Clinical endocrinology and diabetes. In: **Diabetes Mellitus**. Churchill Livingntim, 155-182, 1988.

NERY, J. A. C.; SALES, A. M.; ILLARRAMENDI, X.; DUPPRE, N. C.; JARDIM, M. R.; MACHADO, A. M. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais: uma abordagem prática. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 367-375, 2006.

NUNES, J.R.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA; O. *et al.* Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) no processo de cicatrização da linea Alba de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, n.3, p. 8-15, 2008.

OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; LEÃO, M.A. *et al.* Atividade antidiabética de *Bauhinia sacra*, corantes naturais, ácido cinâmico e 7-epiclusianona. **News Lab**, v. 72, p. 172-190, 2004.

OLIVEIRA, H.P; ALVES, G.E.S; RESENDE C.M. de F. **Eutanásia em Medicina Veterinária**, 2002. Disponível em: < <HTTP://www.vet.ufmg.br>> acesso em: 24 abril 2010.

OLIVEIRA, S.T.; LEME, M.C.; PIPPI, N.L. ET AL. Preparation of comfrey

(*Symphytum officinale* L.) on cutaneous wound healing in rats. **Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.** v. 7, n.8, p.61-65. 2001.

OLIVEIRA, H.G.F. **Efeitos da administração do óleo de copaíba sobre o desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos: aspectos morfológicos.** 2006, 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

OLIVER, R.C.; TERVONEN, T. Diabetes: a risk factor for periodontitis in adults? **Journal Periodontol**, v. 65, p.530-538, 1994.

OZGEN, U.; IKBAL, M.; HACIMUFTUOGLU, A. et al. Fibroblast growth stimulation by extracts and compounds of *Onosma argentatum* roots. **Journal of Ethnopharmacology.** v.104, p.100–103. 2006.

PALMA, B.D.; TIBA, P.A.; MACHADO, R.B. et al. Repercussões imunológicas dos distúrbios do sono: o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal como fator modulador. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 29 (Supl I), p. 33-8, 2007.

PADGETT, D.A.; MARUCHA, P.T.; SHERIDAN, J.F. Restraint Stress Slows Cutaneous Wound Healing in Mice brain. **Behavior and Immunity.** vol. 12, p.64–73, 1998.

PASCHOALINI, M. A.; RASCHCOWETZKI, A. M.; PEREIRA, I. S.; NOBRE, J. Q. C.; MARQUES, L. B.; SILVA, T. *Regulação do peso corporal.* In: SEMINÁRIOS DE INTERAÇÃO SOBRE OS ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS ORAIS DE CLINICA MEDICA E DE SAÚDE PUBLICA, Santa Catarina, 2005. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

PONTE, E.; TABAJ, D.; MAGLIONE, M. & MELATO, M. Diabetes mellitus and oral disease. **Acta Diabetol**, v. 38 p. 57-62. 2001.

PRENTKI, M.; CORKEY, B.E. Is tehe beta cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defedts of obesity and NIDDM. **Diabetes.** v.45, p. 273-83, 1996.

R. Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, diaponível em: URL <http://www.R-project.org/>.

RAUBER, C.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R.B. Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 34, n.1, p. 15-21, 2006.

RIBAS, M. de O.; SOUSA, M.H.; SARTORETTO, J.; et al. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUC RS,** v. 21, n. 53, p.245-53, 2006.

RIELLA, M.C. **Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólitos**. 5ª Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 661p.

ROBBINS, S.L.; COTRAN. Tecido de renovação e reparação: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. **Bases Patológicas das Doenças**. 7º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, p.91-124. 2004.

SANTOS, P. L.; SANTOS, A. C. A.; SERAFINI L.A et al . Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1011-1013, jul. 2007.

SANTOS, M.F. da S.; CZECHKO, N.G.; NASSIF, P.A.N. et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. V. 21 (Sup. 3), 2006.

SANTORO, M.M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Exp. Cell. Res.** v.304, p.274-86, 2005.

SIBBALD R.G, WOO K.Y. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v.24(Suppl 1):S25-S30, 2008.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: editora da UFRGS, 2003, p. 833.

SMELTZER, S. C; BARE, B. G. **Burnner/Suddarth Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 3, cap. 39, p. 873-913, 2009.

SOSKOLNE, W.A.; KLINGER, A. The relationship between periodontal diseases and diabetes:anoverview. **Ann. Periodontol.**, Copenhagen, v.6, n.1, p.91-98, Dec. 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TENIUS, F.P.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; IOSHII, S.O. Efeitos do uso cronico da dexametasona na cicatrizacao de feridas cutaneas em ratos. **Anais... Brasileiro de Dermatologia**, v.82, n.2, p.141-9, 2007.

TEPPERMAN, J.; TEPPERMAN, H.M. Endocrine function of the pancreas. In: \_\_\_\_\_. **Metabolic and endocrine physiology**. 4th. Chicago: Ybmp, 1987. Cap.14, p.249-295.

TRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1ª ed. São Paulo: Roca, cap. 23, p.336-53, 2006.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Biblioteca Virtual do Estudante Brasileiro - Aroeira**. Disponível em: <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br/acervo/paradidat/frutas/aroeira/aroeira.html>>. Acesso em: 24 jan.2011.

UTYAMA, I. K. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica do vinagre e ácido acético: perspectiva no tratamento de feridas**. Ribeirão Preto, 2003. 448 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

VASCONCELOS, T.H.C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M.F.F.M. et al. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 583-591, 2007.

VELLOZO, L.; PIMAZONI, N.A. Fisiologia e fisiopatologia das células beta: implicações clínicas e terapêuticas. In: ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI

NETTO, A. **Diabetes na Prática Clínica**. Sociedade Brasileira de Diabetes, 2008. Mod. 1, Cap. 3. Disponível em: <http://www.diabetesebook.org.br/capitulo/fisiologia-e-fisiopatologia-das-celulasbeta-implicacoes-clinicas-e-terapeuticas/>. Acesso em: 5 abril 2011.

VIANA, G.S.B.; MEDEIROS, A.C.; LACERDA, A.M.R. et al. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v.4, p.9-15, 2004.

WENDT, S. B. T. **Comparação da eficácia da calendula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos Animais**. 2005, 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná. Paraná

ZANOELLO, A.M; MELAZZO-MAZZANTI, C.; GINDRI, J.K. et al. Efeito Protetor do *Syzygium cumini* contra Diabetes Mellitus induzido por Aloxano em Ratos. **Acta Farm. Bonaerense**. v. 21, n.1, p. 31-6, 2002.

## **ANEXO**

### **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

O protocolo de experimentação animal está de acordo e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais-CEUA da Universidade Federal do Espírito Santo pelo protocolo N° 30/10.