



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIRURGIA

RENATO MOTTA NETO

***LIPPIA* AFF. *GRACILIS*, *LIPPIA GRACILIS* E L-GLUTAMINA E SUAS AÇÕES
ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA EM MODELOS
DE RATOS DIABÉTICOS**

FORTALEZA
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

RENATO MOTTA NETO

***LIPPIA* AFF. *GRACILIS*, *LIPPIA GRACILIS* E L-GLUTAMINA E SUAS AÇÕES
ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA EM MODELOS
DE RATOS DIABÉTICOS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof.Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

**FORTALEZA
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

M876a Motta Neto, Renato

Lippia aff gracilis, *Lippia gracilis* e L-glutamina e suas ações antibacteriana, antioxidante e imunomoduladora em modelos de ratos diabéticos/ Renato Motta Neto. 2007.
124 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2007.

1. Estresse Oxidativo. 2. Glutamina. 3. *Lippia*. 4. Diabetes Mellitus. 5. Ratos. 6. *Staphylococcus aureus*. 7. Lipídeos da Membrana. 8. Peroxidação de Lipídeos . 9. Malondialdeído. 10. Glutationa. 11. Linfócitos T CD4-Positivos. 12. Linfócitos T CD8-Positivos. I. Vasconcelos, Paulo Roberto Leitão (orient.). II. Título.

CDD 617.22

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Leitão de Vasconcelos, por ter acreditado no meu projeto e por sua disponibilidade e paciência no esclarecimento das muitas dúvidas que me afligiram, tanto no desenvolvimento do delineamento do estudo e na análise dos resultados como na resolução das dificuldades enfrentadas ao longo do trabalho.

Ao Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães, do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará pelo seu apoio incondicional na elaboração dos artigos. Às Professoras Doutoras Otilia Deusdênia Loiola Pessoa e Telma Lêda Lemos, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, por terem me ajudado na interpretação dos gráficos cromatográficos dos óleos essenciais. À Professora Doutora Cibele Barreto Mano de Carvalho, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, por ter ajudado nos ensaios microbiológicos deste estudo.

Ao Doutor José Napoleão da Cruz, Farmacêutico Bioquímico do Laboratório Central do Ceará, pela ajuda técnica na quantificação das populações linfocitárias.

Ao Professor Doutor Dalgimar Beserra de Menezes pela avaliação histopatológica deste estudo.

À Sra. Maria Luciene Vieira de Oliveira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, pela dedicação, competência e carinho dispensados a mim e aos alunos de pós-graduação.

Ao Sr. Francisco Evanir Gonçalves de Lima, técnico da Unidade de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelos esclarecimentos técnicos e presteza na preparação e execução dos ensaios laboratoriais. Ao Sr. Bento Francisco de Oliveira, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina (UFC), pelos cuidados prestados aos animais experimentais alojados no biotério. Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para execução deste trabalho.

À agência de fomento CAPES, pelo apoio na concessão da bolsa e financiamento da pesquisa.

RESUMO

LIPPIA AFF. GRACILIS, LIPPIA GRACILIS E L-GLUTAMINA E SUAS AÇÕES ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA EM MODELOS DE RATOS DIABÉTICOS. RENATO MOTTA NETO. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

O efeito antibacteriano de óleos essenciais extraídos de folhas das espécies de *Lippia aff. gracilis* e *Lippia gracilis* frente a cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de úlcera de paciente com pé diabético foi avaliado mediante experimentação *in vitro* e *in vivo*, utilizando-se o modelo experimental de ratos diabéticos aloxano induzidos. Cento e doze ratos machos Wistar diabéticos com peso médio de 180g foram distribuídos ao acaso em dois experimentos. Cada experimento foi dividido em dois procedimentos que avaliaram a atividade antibacteriana de soluções dos óleos essenciais a 5%, em dois diferentes procedimentos: um no ato da administração do inóculo bacteriano e outro após vinte e quatro horas de administração. A administração tanto do inóculo 10^8 ufc/ml quanto da suspensão dos óleos foi por via subcutânea no membro pélvico dos ratos diabéticos. Cinquenta e seis ratos Wistar foram utilizados para cada experimento, no qual os mesmos foram distribuídos ao acaso em 8 (oito) diferentes grupos: 4 grupos por experimento, apresentando 7 ratos por grupo (G1-Branco; G2-Controle negativo; G3-Controle positivo; G4-Teste). Foi verificado que no procedimento 1 (*S.aureus* sem *Lippia aff gracilis* $10^8 \pm 698$ versus *S.aureus* com *Lippia aff gracilis* $293,1 \pm 79,07$; *S.aureus* sem *Lippia gracilis* $10^8 \pm 873$ versus *S.aureus* com *Lippia gracilis* $302 \pm 57,2$) e no procedimento 2 (*S.aureus* sem *Lippia aff gracilis* $10^8 \pm 313$ versus *S.aureus* com *Lippia aff gracilis* $13,28 \pm 4,03$; *S.aureus* sem *Lippia gracilis* $10^8 \pm 818$ versus *S.aureus* com *Lippia gracilis* $13,14 \pm 4,27$); houve redução na contagem bacteriana tanto para *Lippia aff. gracilis* quanto para *Lippia gracilis*. Quando comparados os grupos G4 com G3, observou-se que esta suspensão a 5% não apresentou efeito pró-inflamatório. Para a validação destes resultados, foram utilizados os testes Mann-Whitney e Bartlett's & Newman-Keuls (Média \pm E.P.M) com nível de significância de ($p < 0,05$). Ainda neste estudo foi avaliado a ação antioxidante e imunomoduladora da L-glutamina em modelos de ratos Wistar diabéticos quando administrada por gavagem a uma concentração de 0,7g/kg em um período de 30 dias. Quarenta ratos Wistar machos foram distribuídos ao acaso em 5 grupos (G1-não diabético; GII-diabético; GIII-diabético com salina; GIV-diabético com L-glutamina; GV-diabético com Proteína do Soro do Leite). Passado este período, foram determinadas as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona reduzida (GSH) no soro e nos tecidos hepáticos, pancreáticos, músculo esquelético, rins e tecido adiposo. Para as comparações entre o grupo tratado com L-glutamina com os demais, utilizou-se a análise de variância (ANOVA-teste Tukey). As comparações entre grupos foram feitas utilizando-se o teste *t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. A suplementação com L-glutamina induziu ao aumento nas concentrações de GSH (Média \pm E.P.M) e redução significativa nas concentrações de TBARS (Média \pm E.P.M), quando comparadas com o grupo controle, nos espécimes analisados. A ação imunomoduladora foi avaliada através da quantificação de linfócitos CD⁴⁺ e CD⁸⁺ em sangue total. Vinte e quatro ratos Wistar machos diabéticos foram distribuídos igualmente em 3 grupos (G1-diabético com salina; G2-diabético com L-glutamina; G3- diabético com Proteína do Soro do Leite). Observou-se um aumento significativo nas populações de linfócitos CD⁴⁺ (Média \pm E.P.M) com redução nas populações de linfócitos CD⁸⁺ (Média \pm E.P.M) do grupo G2 quando comparado com o grupo controle, ressaltando a importância da L-glutamina como imunonutriente.

DESCRITORES: Antioxidante. Diabético. Ratos. *Staphylococcus aureus*. *Lippia aff. gracilis*. *Lippia gracilis*. L-Glutamina. Estresse oxidativo. Lipídios da membrana celular – Peroxidação. Malonaldeído. Glutaciona. Linfócitos CD⁴⁺ e CD⁸⁺.

ABSTRACT

LIPPIA AFF.GRACILIS, LIPPIA GRACILIS AND L-GLUTAMINE AND HERS ACTIONS ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT AND IMUNOMODULATING IN MODEL DIABETIC RATS. RENATO MOTTA NETO. Thesis (PhD). *Stricto Sensu* Post-Graduation Program in Surgery. Oriented by: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

The antibacterial effect of essential oils extracted from leaves of the species of *Lippia aff. gracilis* and *Lippia gracilis* against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with diabetic foot ulcers were evaluated *in vitro* and *in vivo* experimentation utilizing an experimental model of alloxan-induced diabetic rats. One hundred and twelve male diabetic Wistar rats with mean weight of 180g were distributed by chance into two experiments. Each experiment was divided in two procedures with evaluation of antibacterial activity of essential oils at 5% solutions; one procedure in the act of administration of bacterial inoculums and the other one 24 hours later. 10^8 CFU (Colony Forming Unit) /mL, as well as oils suspension inoculated in the subcutaneous tissue of the pelvic member of diabetic rats. Lower than 5% concentration of administered solution presented antibacterial effect in the *in vitro* experiment. Fifty-six Wistar rats were utilized in each experiment, randomly distributed in 08 different groups: 04 groups per experiment, each group with 07 rats (G1-White; G2-Negative Control; G3-Positive control; G4-Test). There was decrease in CFU/mL in procedure 1 (*S.aureus* without *Lippia aff gracilis* $10^8 \pm 698$ versus *S.aureus* with *Lippia aff gracilis* $293,1 \pm 79,07$; *S.aureus* without *Lippia gracilis* $10^8 \pm 873$ versus *S.aureus* with *Lippia gracilis* $302 \pm 57,2$), which evaluated antibacterial effect of oils concomitantly with the administration of inocula as well as in procedure 2 (*S.aureus* without *Lippia aff gracilis* $10^8 \pm 313$ versus *S.aureus* with *Lippia aff gracilis* $13,28 \pm 4,03$; *S.aureus* without *Lippia gracilis* $10^8 \pm 818$ versus *S.aureus* with *Lippia gracilis* $13,14 \pm 4,27$), which evaluated antibacterial effect of oils 24 hours after the administration of the inoculum. When comparing group G4 with G3, it was observed that 5% solution presented no pro-inflammatory effect, for analysis of these results, the tests of Mann-Whitney and Bartlett's & Newman-Keuls (X^2 S.E.M) with level of significance ($p < 0,05$) were used. Part of this study evaluated the antioxidant and immunomodulating effect of L-glutamine in models of Wistar diabetic rats when administered by gavages at a 0,7g/kg during 30 days. Forty Wistar male rats were randomly distributed in 5 groups (G1- non diabetic; GII-diabetic; GIII-diabetic with saline; GIV- diabetic with L-glutamine; GV- diabetic with Whey Protein). After 30 days concentrations of TBARS and GSH in serum and in hepatic, pancreatic, skeletal muscles, kidneys and fat tissues were determined. For comparisons between the group treated with L-glutamine with the others, the ANOVA – Tukey test was utilized and the comparisons between groups were done using Student's *t* test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The supplementation with L-glutamine induced an increase in the concentrations of GSH (Mean \pm S.E.M) and significant reduction in the TBARS (mean \pm S.E.M) concentrations, when compared to the control group, in the analyzed specimens. The immunomodulating effect was evaluated by quantification of CD⁴⁺ and CD⁸⁺ lymphocytes in total blood. Twenty-four Wistar male diabetic rats were distributed equally in 3 groups (G1-diabetic with saline; G2-diabetic with L-glutamine; G3- diabetic with Whey Protein). It was seen a significant increase of CD⁴⁺ (mean \pm S.E.M) lymphocytes with reduction of CD⁸⁺ (mean \pm S.E.M) lymphocytes in group G2 when compared to the control group, showing the importance of L-glutamine as an immunonutrient.

DESCRIPTORS: Antioxidant. Diabetic. Rats. *Staphylococcus aureus*. *Lippia aff. gracilis*. *Lippia gracilis*. L-Glutamine. Oxidative stress. Cellular membrane lipids – Peroxidation. Malonaldeide. Glutathione. CD4+ and CD8+ Lymphocytes.

SUMÁRIO

LISTA DAS ABREVIATURAS	7
LISTA DAS ABREVIATURAS	8
IMAGENS	8
QUADROS	8
TABELAS	8
FIGURAS	9
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Diabetes Mellitus e Aspectos Epidemiológicos	10
1.2 Pé diabético	11
1.3 Bacteriologia das úlceras de pé diabético	12
1.4 Modelo Experimental: Rato diabético	14
1.5 Lippia	15
1.6 Estresse Oxidativo	17
1.7 Glutamina	21
1.7.1 <i>Metabolismo da glutamina no músculo esquelético</i>	24
1.7.2 <i>Metabolismo da glutamina no rim</i>	24
1.7.3 <i>Metabolismo da glutamina no fígado</i>	25
1.7.4 <i>L-Glutamina, ação antioxidante e imunomoduladora</i>	26
1.8 Óleos essenciais, glutamina e diabetes	27
2 OBJETIVO	30
3 MÉTODO	31
3.1 A amostra	31
3.2 Indução do diabetes	32
3.3 O estudo	33
3.3.1 Desenho do estudo	34
3.4 Obtenção dos óleos essenciais	38
3.4.1 Espectrometria de massa (EM)	38
3.4.2 Determinação dos componentes voláteis dos óleos essenciais	38
3.5 Estudo <i>In vitro</i> da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de <i>Lippia aff. gracilis</i> e <i>Lippia gracilis</i> frente à cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de úlceras de pacientes com pé diabético	39

3.5.1	Preparo do inóculo bacteriano	39
3.5.2	Técnica de Difusão em Ágar	39
3.6	Estudo <i>In vivo</i> da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de <i>Lippia aff. gracilis</i> e <i>Lippia gracilis</i> em membro pélvico infectado de ratos diabéticos por <i>Staphylococcus aureus</i>	41
3.6.1	Avaliação do procedimento 1 (<i>Lippia aff. gracilis</i> e <i>Lippia gracilis</i>)	41
3.6.2	Avaliação do procedimento 2 (<i>Lippia aff. gracilis</i> e <i>Lippia gracilis</i>)	41
3.6.3	Estudo bacteriológico	43
3.6.4	Estudo histopatológico	45
3.7	Avaliação da ação antioxidante e imunomoduladora da L-glutamina	45
3.7.1	Avaliação da ação antioxidante	45
3.7.2	Avaliação da ação imunomoduladora	46
3.7.3	Técnica laboratorial realizada no experimento 3	46
3.7.3.1	Avaliação glicêmica	47
3.7.3.2	Contagem de células CD4+ e CD8+	48
3.7.3.3	Avaliação da peroxidação lipídica	48
3.7.3.4	Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathione-GSH)	50
3.8	Análise estatística	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Experimento 1: <i>Lippia aff. gracilis</i>	53
4.2	Experimento 2 : <i>Lippia gracilis</i>	55
4.3	Experimento 3: L-glutamina	58
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO	85
7	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE	103

LISTAS DE ABREVIATURAS

DMSO	Dimetil sulfóxido
BHI	Brain Heart Infusion ágar
UFC	Unidade Formadora de Colônia
GSH	Glutathiona reduzida
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
MDA	Malonaldeído
PSL	Proteína do Soro do Leite
L-Gln	L-glutamina
GOD	Glicose oxidase
POD	Peroxidase
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ATC	Ácido tricloroacético
DTNB	Ácido trinitrobenzóico
PL	Peroxidação lipídica
qsp	Quantidade suficiente para
SUS	Sistema Único de Saúde
IP	Intraperitoneal

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

IMAGENS

1	Cromatograma <i>Lippia</i> aff. <i>gracilis</i>	53
2	Cromatograma <i>Lippia gracilis</i>	55

QUADROS

1	Distribuição dos grupos na avaliação antibacteriana de óleos essenciais de <i>Lippia</i> aff. <i>gracilis</i> e <i>Lippia gracilis</i>	41
2	Constituição química do óleo de <i>Lippia</i> aff. <i>gracilis</i>	53
3	Constituição química do óleo de <i>Lippia gracilis</i>	56

TABELAS

1	Concentração Inibitória Mínima (MIC, µg/mL) do óleo essencial de <i>Lippia</i> aff. <i>gracilis</i> frente a cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> isolado de úlcera de pé diabético	54
2	Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias observadas com a administração concomitante do inóculo e solução de <i>Lippia</i> aff. <i>gracilis</i> 5%	54
3	Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias quando dado um intervalo de tempo de administração de 24h do inóculo para a solução de <i>Lippia</i> aff. <i>gracilis</i> 5%	55
4	Concentração Inibitória Mínima (MIC, µg/mL) do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> frente a cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> isolado de úlcera de pé diabético	56
5	Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias observadas com a administração concomitante do inóculo e solução de <i>Lippia gracilis</i> 5%	56
6	Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias quando dado um intervalo de tempo de administração de 24h do inóculo para a solução de <i>Lippia gracilis</i> 5%	57
7	Análise histopatológica tecidual dos representantes dos grupos	57

FIGURAS

1	Arbusto de <i>Lippia gracilis</i>	15
2	Principais interações da glutamina no organismo	22
3	Distribuição geral dos experimentos utilizados no estudo do modelo <i>in vivo</i>	34
4	Desenho do estudo <i>in vitro</i> utilizado para a avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais	35
5	Desenho do estudo <i>in vivo</i> utilizado para a avaliação da atividade antibacteriana e anti-inflamatória dos óleos essenciais	35
6	Desenho do ensaio bacteriológico utilizado para quantificação bacteriana	36
7	Desenho do estudo histopatológico utilizado para avaliação inflamatória	36
8	Desenho da avaliação antioxidante	37
9	Desenho do estudo utilizado na avaliação imunomoduladora	37
10	Avaliação do padrão de inibição do crescimento bacteriano teste <i>in vitro</i> , em placa de ágar Müeller Hinton (DIFCO) utilizando diferentes concentrações de soluções de óleos essenciais de <i>Lippia aff gracilis</i> e <i>Lippia gracilis</i>	40
11	Técnica de administração das soluções de óleo essencial e inóculo bacteriano utilizadas nos experimentos 1 e 2	42
12	Avaliação macroscópica do processo infeccioso dos respectivos grupos.	43
13	Avaliação macroscópica do crescimento em ágar sangue das unidades formadoras de colônia desenvolvidas nas culturas dos grupos 4 (teste) e grupo 3 (controle positivo)	44
14	Avaliação histopatológica do processo inflamatório dos grupos analisados.	58
15	Concentração glicêmica em mg/dL dos grupos no final do experimento	58
16	Gráficos das populações de linfócitos T nos diferentes grupos analisados por Citometria de Fluxo FACSCalibur(#0123456789)	59
17	Quantificação de células da linhagem linfocítica tipo CD4 ⁺ nos diferentes grupos	60
18	Quantificação de células da linhagem linfocítica tipo CD8 ⁺ nos diferentes grupos	60
19	Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺ em sangue total nos diferentes grupos	61
20	Relação na contagem de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ nos diferentes grupos	61
21	Concentração de Glutathione em Ug/mL no soro de ratos machos wistar	62
22	Concentração de Glutathione em Ug/g de tecido pancreático de ratos machos wistar	63
23	Concentração de Glutathione em Ug/g de tecido renal de ratos machos wistar	63
24	Concentração de Glutathione em Ug/g de tecido adiposo de ratos machos wistar	63
25	Concentração de Glutathione em Ug/g em tecido da musculatura esquelética de ratos machos wistar	64
26	Concentração de Glutathione em Ug/g de tecido hepático de ratos machos wistar	64
27	Concentração de TBARS (µmol/MDA/mL) no soro de ratos machos Wistar	65
28	Concentração de TBARS (µmol/MDA/g) em tecido pancreático de ratos machos wistar	65
29	Concentração de TBARS (µmol/MDA/g) em tecido renal de ratos machos wistar	66
30	Concentração de TBARS (µmol/MDA/g) em tecido adiposo de ratos machos wistar	66
31	Concentração de TBARS (µmol/MDA/g) em tecido da musculatura esquelética de ratos machos wistar	67
32	Concentração de TBARS (µmol/MDA/g) em tecido hepático de ratos machos wistar	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus e Aspectos Epidemiológicos

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico de etiologia múltipla, considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública na atualidade, tanto em termos do número de pessoas afetadas, incapacitações, mortalidade prematura, quanto em relação aos custos envolvidos no controle e tratamento de suas complicações (DINIZ, 2000). A classificação atual inclui estágios clínicos do diabetes e está dividida em diferentes categorias:

- Diabetes Mellitus tipo 1: resulta da destruição das células beta do pâncreas, levando a deficiência absoluta de insulina, de natureza auto-imune ou idiopática, com tendência a cetoacidose.
- Diabetes Mellitus tipo 2: forma mais prevalente de DM, a qual resulta de resistência à insulina e deficiência na sua secreção. A maioria dos pacientes é obesa e a cetoacidose só ocorre em situações especiais de infecção.
- Diabetes Gestacional: é a diminuição da tolerância à glicose, em qualquer grau, diagnosticada pela primeira vez durante a gestação.
- Outros tipos específicos: defeitos genéticos funcionais de células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidos por fármacos e agentes químicos, infecções, formas incomuns de diabetes imuno-mediado e outras síndromes genéticas geralmente associadas ao diabetes (DINIZ, 2000).

Do total de casos de diabetes, 90% são do tipo não-insulino-dependentes (tipo 2), 5% a 10% do tipo insulino-dependente (tipo 1) e 2% do tipo secundário ou associado a outras síndromes (DINIZ, 2000). Nos Estados Unidos, é de 14 milhões o número de pacientes com esta afecção e no Brasil estima-se que o número chegue a cinco milhões de diabéticos, dos quais metade desconhece o diagnóstico. A prevalência de diabetes no Brasil, na população urbana de 30 a 69 anos, é de 8%. Pacientes diabéticos com úlceras infectadas representam a maior parte dos pacientes diabéticos nos hospitais brasileiros (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2007).

1.2 Pé Diabético

Dentre as complicações do diabetes, a neuropatia periférica que pode levar a ulcerações nos pés com potencial evolução com infecção e amputação representa uma das mais importantes. Segundo o consenso internacional sobre pé diabético de 2003, o pé diabético é definido como qualquer infecção, ulceração e/ou destruição dos tecidos profundos, associadas a anormalidades neurológicas e a vários graus de doença vascular periférica dos membros inferiores (CONSENSO INTERNACIONAL SOBRE PÉ DIABÉTICO, 2003).

Os diabéticos apresentam maior propensão às ulcerações nos membros inferiores e infecções. Dentre todas as infecções que o paciente diabético possa apresentar, a que causa maior morbidade é a infecção do pé. Estima-se que cerca de 25% dos pacientes diabéticos sofram deste mal durante a vida (SAPICO *et. al.*, 1984). O Diabetes Mellitus pode dar origem aos problemas dos pés, já que pode predispor o paciente à aterosclerose periférica com isquemia associada ou pode causar uma neuropatia periférica com alterações proprioceptivas, assim como na sensibilidade ao choque ou à dor e atrofia secundária dos músculos esqueléticos nas pernas e nos pés. Os problemas comuns dos pés, que podem evoluir para infecção, atuando como porta de entrada, são: vesículas, calosidades, verrugas, fissuras, infecção fúngica interdigital, paroníquia, unhas encravadas, acidentes associados ao corte das unhas e queimaduras. As úlceras resultam de múltiplos mecanismos fisiopatológicos sendo a neuropatia sensório-motora, autonômica e a doença vascular periférica os principais fatores predisponentes. A neuropatia é de longe o motivo mais comum da formação de ulcerações no pé, levando à infecção (SOCIEDADE BRASILEIRA DIABETES, 2007). A patogênese pode ser escrita como: a distribuição desigual da pressão na superfície plantar do pé, possivelmente agravada, até certo ponto, pela redução da gordura do pé, leva ao microtrauma tecidual, que serve como porta de entrada para as bactérias que inicialmente colonizam as fissuras. As infecções fúngicas superficiais podem, da mesma forma, servir como porta de entrada. O paciente não apresenta resposta dolorosa ao trauma inicial, devido à neuropatia subjacente. Deste modo, o trauma continua e associa-se à necrose tecidual. Por fim, o movimento das estruturas dentro do pé promove a colonização bacteriana mais profunda e a disseminação com infecção

secundária, levando ao aumento da infecção local, à liberação de mediadores inflamatórios e ao maior comprometimento da capacidade de limitar a infecção inicial. Estes eventos resultam em infecção dos tecidos moles, ou óssea, associada à necrose, que, finalmente, pode levar à perda da extremidade inferior, associada ou não à bacteremia e sepse. Outros fatores, como peso, sexo, tabagismo, altura, diabetes de longa duração (acima de 10 anos), idade avançada (acima de 40 anos), hipertensão arterial, alterações biomecânicas, apresentam um sinergismo na presença de um quadro de neuropatia, favorecendo assim o surgimento de ulcerações (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

1.3 Bacteriologia das úlceras de pé diabético

A infecção do pé diabético pode ser monomicrobiana ou polimicrobiana, o que ocorre em 60% a 80% dos pacientes. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus epidermidis* são isoladas de cerca de 60% de todas as úlceras infectadas. Enterococos, estreptococos e enterobactérias são encontrados menos freqüentemente e 15% das úlceras infectadas têm a participação de bactérias anaeróbias estritas (ROUTH *et. al.*, 1996). Estudos, mostraram que o perfil bacteriológico de uma infecção de úlcera de pé diabético está diretamente ligado ao nível de comprometimento da infecção (LIPSKY; PECORARO; WHEAT, 1990). Infecções com leve comprometimento tecidual predominam organismos do tipo aeróbios. O perfil bacteriológico dos espécimes clínicos provenientes de infecções leves estudado por pesquisadores apresentam um predomínio de cocos Gram positivos, em especial o *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram negativos, destacando-se as espécies pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*. Apenas um pequeno percentual destes espécimes apresentou bactérias anaeróbias. Lipsky, Pecoraro e Wheat (1990), também destacaram a presença de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de uma forma ocasional em seus estudos (LIPSKY; PECORARO; WHEAT, 1990).

As infecções de úlceras de pé diabético que apresentam um severo comprometimento tecidual, isto é, presença de necrose, gangrena, intenso quadro de celulite, abscessos com ou sem osteomielite, são tipicamente polimicrobianas

com participação de bactérias anaeróbias estritas (LOUIE *et. al.*, 1976; SAPICO *et. al.*, 1984; WHEAT *et. al.*, 1986).

A participação de bactérias anaeróbias estritas em úlceras infectadas de pacientes diabéticos foi pela primeira vez documentada, por Louie *et. al.* (1976). Estes autores examinaram pacientes ambulatoriais e isolaram bactérias anaeróbias de 18 dos 20 pacientes acompanhados (LOUIE *et. al.*, 1976).

Sapico *et. al.*, em pesquisa publicada em 1984, com 32 pacientes submetidos posteriormente a amputações, constataram que 25 (78%) destes apresentavam infecções do tipo polimicrobiana e que as bactérias anaeróbias isoladas dos espécimes estavam associadas às lesões que apresentavam odor pútrido. Dos 154 isolados bacterianos deste estudo, 91 (59%) eram bactérias aeróbias e 63 (41%) eram anaeróbias. Dentre o grupo das bactérias aeróbias, a família que obteve uma maior freqüência de isolamento foi a das *Enterobacteriaceae*. Já no grupo dos anaeróbios, a espécie com maior freqüência de isolamento foi o *Bacterioides* sp (SAPICO *et. al.*, 1984).

Lawrence e Lawrence (1994) , descreveram o perfil de isolamento bacteriano de infecção de tecido mole e osteomielite em pacientes diabéticos com úlceras infectadas. Em estudo retrospectivo de 7 anos com pacientes hospitalizados, os autores avaliaram 22 casos de osteomielite e 44 casos de úlcera associada à infecção de tecidos moles. O *Staphylococcus aureus* foi isolado de 68% dos pacientes seguido de *Streptococcus* sp (43%) e *Enterococcus* sp (27%). *Pseudomonas* sp foi mais freqüentemente isolada de pacientes com osteomielite (38%) do que de pacientes com infecção de tecidos moles (18%). Bactérias anaeróbias estritas foram isoladas de 11% dos pacientes (LAWRENCE; LAWRENCE, 1994).

Goldstein, Citron e Nesbit (1996), em estudo prospectivo com pacientes diabéticos e não hospitalizados apresentando úlceras infectadas, isolaram predominantemente *Staphylococcus aureus* em 76% dos pacientes, incluindo cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) em 20% dos casos (GOLDSTEIN; CITRON; NESBIT, 1996).

Estudos realizados por Abdulrazak *et. al.* (2005), ao analisar 86 úlceras infectadas de pacientes diabéticos que faziam uso de agentes antimicrobianos a mais de 30 dias, mostraram que o *Staphylococcus aureus* foi o agente mais prevalente e mais resistente (ABDULRAZAK *et. al.*, 2005).

Shankar *et. al.* (2005), traçaram o perfil epidemiológico e de resistência de pacientes diabéticos com úlceras infectadas no sul da Índia e constataram que os agentes que apresentaram uma maior frequência foram os *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas* (SHANKAR *et. al.*, 2005).

Carvalho *et. al.* (2004), realizaram um estudo do perfil bacteriológico em 141 úlceras infectadas de pacientes diabéticos em um centro de referência no tratamento do diabetes e constataram que 83,7% apresentaram infecções por enterobactérias; 43,3% por *S.aureus*; 17% por bactérias anaeróbias estritas e 14,9% por *Pseudomonas aeruginosas* (CARVALHO *et. al.*, 2004). Já Motta Neto *et. al.* (2005) observaram que destas 141 úlceras infectadas, a bactéria mais prevalente foi o *Staphylococcus aureus* (MOTTA NETO *et. al.*, 2005). Baseados nos achados de Motta Neto *et. al.* (2005), é que optou-se por utilizar o *Staphylococcus aureus* como agente bacteriano neste estudo (experimentos 1 e 2).

1.4 Modelo Experimental: Rato diabético

Optou-se, neste estudo, por utilizar um modelo de rato diabético experimental. O diabetes mellitus em animais pode ser induzido por uma pancreatectomia parcial ou pela administração de drogas diabetogênicas como o aloxano e estreptazotocina por diferentes vias (subcutânea, intraperitonal e endovenosa) (CISTERNAS JUNIOR, 2000). Estes agentes seletivos destroem as células β -pancreáticas, produzindo um quadro de diabetes irreversível. Tanto o aloxano como a estreptazotocina provocam uma degranulação com conseqüente degeneração das células pancreáticas; estes agentes químicos produzem compostos intermediários como o ácido úrico e outras substâncias que de uma forma direta ou indiretamente são responsáveis por acarretar um dano irreversível as células β - pancreáticas (MACEDO *et. al.*, 2002). Alguns trabalhos têm mostrado que após 48 horas de inoculação (aloxano ou estreptazotocina) há um surgimento de um quadro

hiperglicêmico permanente em várias espécies; revelando também que após sete dias de inoculação tem-se um modelo experimental de diabetes crônico (HALPEN *et. al.*, 2000; CISTERNAS JUNIOR, 2000).

1.5 Lippia

Pequeno arbusto caducifólio, ramificado, com caule quebradiço, de até 2 metros de altura. Folhas aromáticas e picantes, simples, cartácea, com nervação impressa bem visível, de pouco mais de 1cm de comprimento. Flores pequenas, esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto. Frutos do tipo aquênio extremamente pequenos, cujas sementes raramente germinam.

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.

FIGURA 1 – Arbusto de *Lippia gracilis*

Pode ser multiplicada por estaquia usando-se, de preferência, os ramos mais finos. As mudas devem ser plantadas depois de bem enraizadas, geralmente 1-2 meses após o estaqueamento, no espaçamento de 3 a 4m entre plantas. Evitar excesso de água durante a rega. É uma espécie própria da vegetação do semi-árido nordestino de terrenos bem drenados, sendo comum sua presença no interior do Piauí, especialmente na região entre Piripiri e Piracuruca, no Parque Nacional de

Sete-Cidades. Uma outra espécie ou variedade desta espécie, com características morfológicas e uso muito semelhantes, aqui referida simplesmente como *Lippia* aff. *gracilis*, ocorre também no semi-árido nordestino, no interior da Bahia, especialmente na região entre Jacobina e Rui Barbosa (MATOS, 1998).

Existem várias espécies de plantas descritas na literatura científica que apresentam atividade hipoglicemiante (VERSPOHL, 2002; SOUSA; ZANATTA; PIZZOLATTI, 2004; COLCA, 2006).

Estudos realizados por Zanatta *et. al.* (2007), em extrato da folha de *Vitex megapotamica* (*Verbenaceae*), espécie de arbusto pertencente à mesma família das Lippias, mostraram um efeito hipoglicemiante quando administrados nas concentrações de 800mg/kg de peso em ratos diabéticos (ZANATTA *et. al.*, 2007).

Estudos realizados por Monteiro *et. al.* (2007), utilizando extratos de folhas de *Lippia sidoides* nas concentrações de 10, 50 e 100mg/kg, apresentaram efeitos antioxidantes e gastroprotetor quando administrados em modelo experimental de ratos com lesões gástricas (MONTEIRO *et. al.*, 2007).

Espécies de plantas pertencentes à família *Verbenaceae*, em especial o gênero *Lippia* sp, apresentam notáveis atividades antibacterianas. Esta atividade está associada a sua constituição química, que na grande maioria são ricas em constituintes de natureza fenólica (LEMOS *et. al.*, 1990).

Vários trabalhos relatam o potencial antimicrobiano das espécies de *Lippia*. Estudos realizados por Oliveira *et. al.* (2007) mostraram que o óleo essencial extraído das folhas e flores da espécie *Lippia origanoides* H.B.K apresentaram 38,6% de Carvacrol em sua constituição química e que o mesmo apresentou ação antibacteriana frente a diferentes espécies bacterianas (OLIVEIRA *et. al.*; 2007).

Já Lebert, Leroy e Talon (2007) mostraram que tanto o Timol como o Eugenol inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* em biofilmes (LEBERT; LEROY; TALON, 2007).

Vários autores atribuem o potencial antimicrobiano das espécies de *Lippia* à presença de constituintes químicos, como o Carvacrol e o Timol (LEMOS *et. al.*, 1990; OLIVEIRA *et. al.*, 2007; MONTEIRO *et. al.*, 2007; BURT *et. al.*, 2004).

Mevy *et. al.* (2007) relataram em seus estudos que a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas de *Lippia chevalieri* está associado à presença de Elemol e 1-8-Cineol em sua constituição (MEVY *et. al.*; 2007).

1.6 Estresse Oxidativo

A sobrevivência de qualquer órgão ou tecido depende, fundamentalmente, de três fatores: a disponibilidade de oxigênio, a existência de uma fonte sempre renovada de nutrientes básicos e a remoção dos produtos tóxicos oriundos do metabolismo celular. O funcionamento harmônico desses processos metabólicos é essencial para assegurar a manutenção da bioenergética celular e da homeostase iônica. A redução da oferta de substratos energéticos, de oxigênio e o acúmulo de resíduos tóxicos do metabolismo celular afetam esse delicado balanço homeostático, comprometendo a integridade celular. Os recentes avanços do conhecimento médico têm possibilitado a reversão do processo em seu estágio inicial, utilizando métodos cirúrgicos ou farmacológicos, em áreas críticas para a sobrevivência do indivíduo, tal como o coração, prevenindo o infarto e a necrose celular nos tecidos isquêmicos (MAXWELL; LIP, 1997).

Radical livre é um termo aplicado a toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron livre pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Duas substâncias abundantes na natureza podem gerar radicais livres: o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (ROVER JÚNIOR; HOEHR; VVELLASCO, 2001). Este último participa da formação de complexos nitrosílicos com heme-proteínas, compostos nitrosotiólicos (cisteína e glutatona) e de peroxinitrito. O peroxinitrito promove a oxidação de grupos tiólicos, em particular a glutatona, associado com o consumo de oxigênio e regulando sua ação radicalar nas células do organismo (QUIJANO *et. al.*, 1997; ARTEEL; BRIVIBA; SIES, 1999).

A molécula de oxigênio é um bi-radical (possui dois elétrons livres nos orbitais p antiligantes) e reage preferencialmente com moléculas de configuração eletrônica semelhante. Por outro lado, a maioria das biomoléculas não é bi-radical, possuindo grande número de ligações covalentes, ficando o oxigênio impedido (por restrição de "spin") de reagir com as mesmas, evitando assim que alvos celulares importantes sejam lesados. Apesar dessa restrição, o oxigênio possibilita a origem de diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Na forma de oxigênio singlete, a restrição de "spin" desaparece, resultando em um maior poder oxidante dessa substância (ROVER JÚNIOR; HOEHR; VELLASCO, 2001).

Uma outra via de formação de espécies reativas de oxigênio consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido ($O_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila ($OH\cdot$), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). O peróxido de hidrogênio atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron origina o radical hidroxila. Este último é, entre as espécies radicalares conhecidas, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar. Estas espécies radicalares devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula para se estabilizarem, tornando esta última uma espécie também radicalar. A consequência disto é a oxidação dos fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, do DNA, e das proteínas (GREENWALD, 1990).

Os efeitos deletérios do oxigênio sobre os organismos vivos variam consideravelmente, na dependência do tipo de organismo e de seu estado fisiológico. Nos mamíferos, no tecido oxigenado, o oxigênio sofre redução tetravalente, com a aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, de radicais superóxidos ($O_2\cdot^-$), hidroperoxila ($H_2O\cdot$), hidroxila ($OH\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A produção excessiva de radicais livres oxidantes e a capacidade do organismo de desativá-los representam o equilíbrio decisivo para a reversibilidade das lesões e a morte celular (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

A concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio é, em condições normais, extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que a removam ou impeçam a sua formação. Estes radicais tendem a ser eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e pela catalase (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). Assim, em condições fisiológicas, o balanço entre os agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando esse equilíbrio é rompido, quer por produção excessiva de radicais livres quer por redução das defesas antioxidantes, estabelece-se o “estresse oxidativo” (FERREIRA; MATSUBA, 1997), restando ao organismo três alternativas: 1) adaptação, por aumento da atividade dos sistemas antioxidantes; 2) dano tecidual, por agressão aos lipídios, carboidratos ou proteínas; 3) morte celular, por necrose ou apoptose (DRÖGE, 2002). Na peleja pela sobrevivência, o sistema de proteção contra a ação lesiva dos radicais livres atua em duas linhas diferentes: linha detoxificadora, constituída pela glutathione reduzida, vitamina E e as enzimas superóxido-dismutase, catalase, glutathione peroxidase; linha reparadora, constituída principalmente pelo ácido ascórbico e pelas enzimas glutathione-reductase e glutathione-peroxidase (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além dos antioxidantes endógenos, existem antioxidantes provenientes da natureza, principalmente os provenientes da dieta, e aqueles elaborados sinteticamente. Os antioxidantes sintéticos mais conhecidos são: acetilcisteína, coenzima Q, flavonóides, alopurinol, probucol, vitamina C e E, betacaroteno, selênio e zinco, entre outros (BONORDEN; PARIZA, 1994).

A Glutathione Reduzida (GSH) pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes, como íons ferro (GALLEANO; PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (DENEKE; FANBURG, 1989). A oxidação da glutathione a transforma em GSSG (glutathione oxidada), produto tóxico para o meio intracelular. Os sistemas de proteção são, mais uma vez, ativados e a GSSG é reduzida, retornando ao seu estado inicial (GSH) por ação enzimática da glutathione reductase. A relação ideal GSH/GSSG (100:1) é mantida através desse mecanismo (MEISTER, 1989). Sob condições fisiológicas, a taxa de consumo de GSH é determinada pela intensidade de sua utilização nos processos de detoxificação. A exposição aos agentes

oxidantes oriundos do meio exterior ou a presença de toxinas reativas aos tióis pode aumentar significativamente o consumo de GSH, resultando em queda temporária dos níveis de GSH intracelular. Entretanto, como a capacidade de recuperação das reservas de GSH está presente na maioria das células, a concentração do tripeptídeo intracelular é rapidamente recuperada, pela maior síntese e pela redução do GSSG, pelo mecanismo já descrito acima. Surpreendentemente, a maioria das células tolera, sem efeitos adversos, redução de até 90% dos níveis normais de GSH (HALL, 1999).

A lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (PL) pode ser definida como uma deterioração oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, detentores de ligações duplas carbono-carbono, presente em grande quantidade nas membranas e nas organelas intracelulares (mitocôndrias e peroxissomas). É um processo constituído por reações encadeiradas, seqüenciais, as quais podem ser divididas em três etapas: iniciação, propagação e término. A peroxidação lipídica tem início quando espécies reativas de oxigênio, dotadas de elétrons desemparelhados, promovem a remoção de um átomo de hidrogênio de um grupamento metileno (-CH₂-). Nesta etapa há produção de um novo radical (-CH-), que é centrado no carbono e que normalmente se estabiliza através de um novo arranjo molecular. Sob condições aeróbicas, esse radical centrado no carbono combina-se com o oxigênio (O₂), formando radicais peroxila (ROO.). Esses radicais peroxila podem extrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídio, estabelecendo assim a propagação da reação. O novo radical, ao reagir com o oxigênio, origina novo radical peroxila, permitindo que a reação da peroxidação lipídica se torne contínua, pela repetição dos ciclos oxidativos.

Quando o radical peroxila se combina com um átomo de hidrogênio, há geração de hidroxiperóxidos (ROOH). Uma alternativa é a formação de peróxidos cíclicos e epóxidos. Estas substâncias, altamente reativas, culminam por fragmentar os lipídios poliinsaturados, produzindo o malondialdeído (4-hidroxi-2-nonenal) e outros compostos contendo grupo carbonila. Um único evento de iniciação pode produzir várias moléculas de peróxidos. À medida que as reações em cadeia se processam, proteínas de transporte ou enzimas de membrana podem ser inativadas ou pode ocorrer aumento da permeabilidade da bicamada lipídica da membrana,

alterando a homeostase. Finalmente, na etapa de conclusão, ocorre a formação de um intermediário instável (tetróxido), a partir dos radicais peroxila (mecanismo de Russell), que sofre decomposição, originando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e grupos carbonila excitados, entre outros produtos (LLESUY, 2002).

Vários métodos são utilizados para a avaliação do estresse oxidativo. A lipoperoxidação é um marcador para lesão das membranas celulares, a qual, no método de TBARS, é aferida através da formação de um composto intermediário da lipoperoxidação, o malondialdeído (MDA). O teste com ácido tiobarbitúrico (TBA) foi introduzido por Kohn e Liversedge, em 1944, e ainda é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica (CHIRICO, 1994). O estresse oxidativo pode ser avaliado por dosagens de glutathiona reduzida (GSH) e/ou pelo cálculo da razão da glutathiona reduzida/glutathiona (FERREIRA; MATSUBURA, 1997). Através dessas dosagens *in vivo*, obtém-se, desta maneira, um cenário do delicado balanço entre as substâncias oxidantes e as antioxidantes (GHISELLI *et. al.*, 2000). Através das técnicas de quantificação de GSH e TBA; Guimarães *et. al.*; 2007, mostraram o potente efeito protetor do ácido α -lipóico em um modelo experimental de toção do cordão espermático (GUIMARÃES *et. al.*; 2007).

1.7 Glutamina

Nos idos de 1833, os pesquisadores Schultze e Bosshard descreveram uma substância extraída da beterraba, degradável quando aquecida em meio ácido em ácido glutâmico e amônia, denominando-a glutamina. Anos mais tarde, Ritthausen (1866) anunciou a descoberta de uma nova substância encontrada em proteínas do tremoço e da amêndoa, obtida da ebulição do glúten na presença do ácido sulfúrico e que seria um ácido monobásico contendo nitrogênio (MARINHO, 1995). A substância descoberta, consagrada como uma amina, é, na realidade, uma amida, sendo o seu nome correto glutamida (FELTRE, 1998). Todavia, o tempo e o uso consagraram a denominação equivocada.

A fórmula empírica da glutamina é $\text{C}_n\text{H}_n\text{O}_n\text{N}_n$, e a fórmula molecular é $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_3\text{N}_2$.

A fórmula estrutural mostra que a glutamina é um ácido carboxílico biaminado, característica que compartilha com asparagina e a lisina (ROSKOSKI, 1997), alinhando-se na categoria dos aminoácidos com grupos polares sem carga (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

Krebs (1935) demonstrou a capacidade de síntese da glutamina e sua degradação, por hidrólise, nos tecidos animais. A glutamina é um aminoácido com características únicas dentre os demais aminoácidos que compõem o corpo humano. Considerada um aminoácido não essencial, mercê de sua síntese no organismo vivo, a glutamina pode, em condições especiais, tornar-se aminoácido essencial, quando as disponibilidades se tornam inferiores às necessidades do organismo, exigindo um aporte externo.

A glutamina é abundantemente distribuída no organismo, sendo o aminoácido de maior concentração no sangue e tecidos sob a forma livre (L-glutamato), onde participa de inúmeros processos metabólicos. A importância específica da glutamina para a economia orgânica foi documentada por Krebs, que encontrou diferentes concentrações das enzimas fundamentais para o seu metabolismo: glutaminase, presente principalmente no fígado, e glutamina-sintetase, no tecido muscular esquelético (KREBS, 1935).

A glutamina, ou mais especificamente a L-glutamina, é importante como precursora da síntese de peptídios e proteínas, açúcares aminados, purina, pirimidina, ácido nucléico e nucleotídeos, além de fornecer o elemento carbono para processos oxidativos nas células, sob a ação da enzima glutaminase, encontrada em altas concentrações nas mitocôndrias das células que utilizam o metabólito com maior avidéz, notadamente o fígado (NEWSHOLME *et. al.*, 2003).

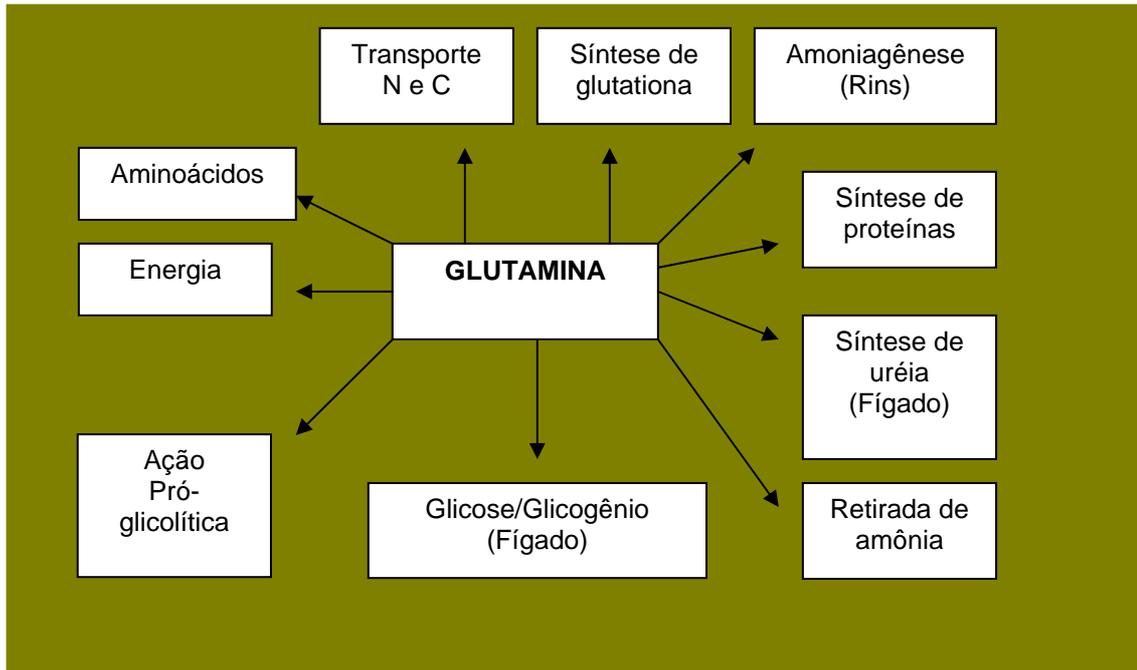


FIGURA 2 - Principais interações da glutamina no organismo

A L-glutamina não pode atravessar a barreira pela membrana celular, devido à carga elétrica total de (-1) em pH 7,4. Por outro lado, os aminoácidos capazes de realizar o transporte do L-glutamato para o interior das células apresentam reduzida concentração na membrana celular, exceto nas células especializadas na utilização desse substrato, localizadas no sistema nervoso central (PITHON-CURI *et. al.*, 2002).

A glutamina insere-se no ciclo do ácido cítrico através do ácido α -cetoglutárico, em que pode converte-se pela ação da glutaminase. É parcela constitutiva da glutathiona juntamente com a cisteína e a glicina, contribuindo para o importante processo de detoxicação dos radicais livres oxidantes (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996) e parte do complexo sistema carreador (lançadeira) malato-aspartato, que promove a produção de NAD intra-mitochondrial (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). Estudos recentes tem demonstrado a ação pró-glicolítica da glutamina após sua administração em condições de estresse (FILHO *et. al.*, 2002; TORRES *et. al.*, 2003; BARBOSA *et. al.*, 2003; ALVES *et. al.*, 2003; FILHO *et. al.*, 2004).

1.7.1 *Metabolismo da glutamina no músculo esquelético*

O tecido muscular desempenha função primordial na síntese de glutamina, respondendo por cerca de 90% da produção total deste metabólito no corpo humano. Suas reservas na musculatura esquelética exercem importante papel na homeostase, atuando como estoque lábil de nitrogênio que será mobilizado nessas situações de estresse (JEPSON, 1988). Estudos quantitativos demonstram, em humanos, que, nos estados pós-absortivos, 60% dos aminoácidos liberados no organismo são compostos de alanina e glutamina (NEWSHOLME; PARRY-BILLINGS, 1990; NEWSHOLME *et. al.*, 1999).

Estudos recentes mostraram que a L-alanil glutamina quando administrada por via intramuscular estimula a maior utilização da glicose, via glicólise, através da ativação do ciclo lactato-malato (TORRES *et. al.*; 2003).

No músculo em repouso, seis aminoácidos são metabolizados: leucina, isoleucina, valina, asparagina, aspartato e glutamato (WAGENMAKERS, 1998). Esses aminoácidos liberam os grupamentos amino e, possivelmente, a amônia necessária para a síntese de glutamina e alanina, aminoácidos utilizados em quantidades excessivas no estado pós-absortivo, no decurso de refeições ricas em proteínas e em outras condições, tais como o estresse, estimulam a liberação de glutamina muscular (NEWSHOLME *et. al.*, 1988; HAMMARQVIST; EJESSION; WERNERMAN, 2001).

Saliente-se que somente as moléculas de leucina e isoleucina podem ser oxidadas no tecido muscular após sua conversão em Acetil-CoA. Os átomos de carbono restantes são utilizados para a nova síntese de metabólitos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, também conhecido como ciclo de Krebs, e da glutamina. Esta etapa metabólica oxidativa é limitada pela disponibilidade de intermediários do ciclo de Krebs (NEWSHOLME *et. al.*, 2003).

1.7.2 *Metabolismo da glutamina no rim*

A glutamina é, quantitativamente, o maior fornecedor de nitrogênio ao rim, sob a forma de NH_3 , obtido pela degradação enzimática (glutaminase) do aminoácido.

No interior dos túbulos renais, o NH_3 se combina com H^+ , fornecido pelo ácido carbônico, para formar NH_4^+ , que é excretado na urina. O HCO_3^- resultante entra na circulação sangüínea, onde desempenha papel fundamental na manutenção do pH sangüíneo, o que torna a glutamina essencial para a manutenção do equilíbrio ácido-básico do sangue (GSTRAUNTHALER *et. al.*, 2000).

Por outro lado, o esqueleto carbônico resultante da ação da glutaminase sobre a glutamina é utilizado na gliconeogênese. Cerca de 25% da glicose circulante no sangue é obtida através desta via metabólica (STUMVOLL *et. al.*, 1999).

Nos longos períodos de hipoglicemia, acompanhados de acidose por aumento da cetonemia, a gliconeogênese renal desempenha um papel fundamental no fornecimento de matéria-prima (glicose) para a produção de energia (OWEN *et. al.*, 1969).

Estudos recentes mostraram que o pré-tratamento com L-alanil glutamina na isquemia renal produz elevações significantes, *in vivo*, da lactasemia e das concentrações de lactato no tecido renal devido à glicólise aumentada, possivelmente secundária a maior disponibilidade de glutamato, produzindo ativação da lançadeira malato-aspartato (FILHO *et. al.*; 2002).

1.7.3 Metabolismo da glutamina no fígado

O fígado pode ser considerado a grande central metabólica do organismo. O nitrogênio oriundo dos tecidos periféricos (principalmente do músculo e pulmão) é prontamente ofertado aos órgãos centrais sob a forma de glutamina, alanina e aspartato, desde que a captação e o metabolismo da glutamina no intestino se processem normalmente (YOUNG; AJAMI, 2001).

Como as células peri-portais do fígado são ricas em glutaminase, a degradação da glutamina desempenha papel importante no controle dos níveis de amônia no sangue venoso, pois a síntese e a hidrólise da glutamina são etapas intermediárias na formação de uréia. O fígado, por sua vez, utiliza a amônia sangüínea para formar glutamina (HAUSSINGER, 1986).

Estudos revelam que a oferta endovenosa de L-alanil-glutamina a animais hepatectomizados induz elevação da glicemia e da concentração hepática de glicose no período pós-operatório, possivelmente decorrente de aumento do turnover de glicose, por possível ativação do ciclo de Cori e aumento da atividade do ciclo malato-aspartato e regeneração de NAD⁺ no citosol (FILHO *et. al.*; 2004).

1.7.4 L-Glutamina, ação antioxidante e imunomoduladora

A relação entre disponibilidade de aminoácidos, ou de outros substratos metabólicos, e o bom funcionamento do sistema de defesa do organismo vem sendo estabelecida (CALDER; YAQOUB, 1999).

No hipercatabolismo a L-glutamina (L-Gln) é reconhecida como aminoácido “condicionalmente essencial” e tem despertado interesse dos pesquisadores por sua capacidade de interferir no funcionamento de células do sistema imune (CASTEL *et. al.*, 1998; KOYAMA *et. al.*, 1991; HEATH *et. al.*, 1991).

Estudos realizados por Leandro *et. al.* (2006) fortaleceram as evidências dos efeitos imunossupressores do estresse motivado por fatores psicológicos em animais de laboratório. Esses efeitos foram verificados tanto relativamente à concentração de células imunes quanto à função fagocitária de macrófagos. Se essas alterações são transitórias, simplesmente reflexo de uma automodulação das células imunes em busca da homeostase, ou se são permanentes, comprometendo, dessa forma, a atuação dos componentes do sistema imune, é um assunto a ser considerado. Todavia é bem provável que, mesmo de natureza transitória, essas alterações tenham conseqüências fisiopatológicas importantes e mereçam ser consideradas na etiologia de algumas doenças, como, por exemplo, o diabetes. Um dos fatores que podem influenciar a imunossupressão é a diminuição da disponibilidade de L-Gln no plasma (LEANDRO *et. al.*, 2006).

A L-Gln desempenha um importante papel imunomodulador, tanto no estímulo funcional como na proliferação de linfócitos T e macrófagos (XI *et. al.*, 2006). Estudos realizados por Johnson *et. al.* (2006) mostraram que grupos de porcos que tiveram uma suplementação com L-Gln em sua dieta por 21 dias apresentaram um

aumento considerável na proliferação das células T CD4+ quando comparados com o grupo controle (JOHNSON *et. al.*, 2006).

A L-Gln é o mais abundante aminoácido presente no plasma, atua no sistema antioxidante, através da síntese de glutamato, importante precursor de glutathione; situações de catabolismo protéico acelerado acarretam a diminuição dos seus níveis plasmáticos (MATÉS *et. al.*, 2002).

Estudos realizados por Ávila *et. al.* (2005), que avaliaram o estresse oxidativo de pacientes submetidos a um transplante de células pancreáticas seguidos de suplementação com L-Gln, mostraram que o grupo que recebeu L-Gln apresentou taxas elevadas de glutathione frente ao grupo placebo (AVILA *et. al.*, 2005).

Estudos envolvendo ratos intoxicados por cobalto mostraram que o grupo que recebeu suplementação diária de L-Gln apresentou taxas de glutathione (GSH) superiores, concluindo-se que a glutamina previne a depleção de glutathione nas situações de estresse, atuando como um nutriente com características antioxidantes (GONZALES *et. al.*, 2005).

Estudos recentes têm demonstrado o aumento da atividade glicolítica após administração de L-Gln em diferentes situações de estresse, isto se deve provavelmente à via de ativação do ciclo malato-aspartato, dada a maior oferta de glutamato (FILHO *et. al.*, 2002; TORRES *et. al.*, 2003; BARBOSA *et. al.*, 2003; ALVES *et. al.*, 2003).

Recentes trabalhos têm reforçado o importante papel da L-Gln como agente imunomodulador e antioxidante como suplemento nutricional nas situações de queimadura, diabetes, câncer, aids, etc (XI *et. al.*, 2006; MATÉS *et. al.*, 2002; MICKE *et. al.*, 2001). Por a L-Gln possuir baixa solubilidade em solução aquosa optou-se neste estudo em utilizar uma concentração de 0,7g/kg de peso, para assim evitar as perdas.

1.8 Óleos essenciais , glutamina e diabetes

O Brasil possui inúmeras vantagens e oportunidades para o desenvolvimento da fitoterapia, por ser a maior diversidade vegetal do mundo. O interesse popular e institucional vem crescendo no sentido de fortalecer a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) (MATOS, 1998). A partir da década de 80 vários documentos foram elaborados enfatizando a introdução de plantas medicinais e fitoterápicos na atenção básica no sistema público, entre os quais destaca -se o decreto nº 8188 que regulamenta a implantação da fitoterapia nos serviços de saúde e cria procedimentos e rotinas relativas a prática nas unidades assistenciais médicas (SIMÕES; SCHENKEL; GUSMANO, 1999).

O uso de óleos essenciais na fitoterapia já é uma prática experimental validada por inúmeros pesquisadores, principalmente no que se refere as suas características como potentes agentes antimicrobianos (MATOS, 1998).

A justificativa deste estudo vai além da avaliação fitoterápica, porquanto avalia também o potencial antioxidante e imunomodulador do aminoácido L-glutamina. Optou-se em avaliar a ação antibacteriana, antioxidante e imunomoduladora de óleos essenciais das espécies de *Lippia aff. gracilis*, *Lippia gracilis* e L-glutamina em modelos de diabetes experimental.

Estudos sobre o potencial antibacteriano de óleos essenciais, tais como os isolados de *Lippia aff. gracilis* e *Lippia gracilis* em hospedeiros com diabetes, precisam ser realizados.

Espécies reativas de oxigênio (ERO) contribuem tanto no surgimento, como na evolução de diferentes doenças como o câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares e diabetes (YILDEZ; MUSTAFA; YANDI, 1995). Estudos utilizando modelo experimental em diabetes sem infecção induzida mostraram que os ROS contribuem de uma forma significativa com a evolução destas enfermidades (SEIDEL *et. al.*, 2003).

O uso do aminoácido L-glutamina como antioxidante nas condições de estresse tem sido bem relatado, assim como sua ação no fornecimento energético para a proliferação de células mononucleares, especialmente linfócitos a partir da estimulação na produção de IL-2, sendo assim reportada como um imunonutriente.

(MATÉS *et. al.*, 2002; NEWSHOLME *et. al.*,1999; WILMORE; SHABERT, 1998). Baseados nestes estudos é que se optou, no terceiro experimento, por avaliar a ação imunomoduladora e antioxidante da L-glutamina em modelos de ratos diabéticos.

2 OBJETIVO

- 1) Verificar os efeitos antibacterianos *in vitro* e *in vivo* de *Lippia* aff. *gracilis* e *Lippia gracilis* em ratos diabéticos.
- 2) Estudar os efeitos antioxidantes e imunomodulador da L-glutamina em modelo experimental de diabetes.

3 MÉTODO

O projeto foi previamente aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa Animal-CEPA, da Universidade Federal do Ceará, em 11 de outubro de 2005, sob o número 46/04 (Ver Anexo I). Foram obedecidas as normas estabelecidas pelo *Council for International Organization of Medical Sciences* (CIOMS) e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

3.1 A amostra

Foram utilizados 152 ratos jovens (idade: 60 ± 5 dias), púberes, machos (*Rattus norvegicus*: Variedade *Albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), pesando de 180 a 200g, peso médio 190g, (APÊNDICE A) da linhagem Wistar, saudáveis e bem nutridos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Observou-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Guabi Nutrilabor, Mogiana Alimentos, São Paulo) foram ofertadas *ad libitum*. A higienização das gaiolas e o exame dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável e pelo pesquisador, respectivamente.

Os ratos foram previamente aclimatados por um período de 7 dias antes da realização dos experimentos. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará. Já os experimentos microbiológicos e histopatológico foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, respectivamente. Os ensaios bioquímicos foram realizados em parte no Laboratório Central do estado do Ceará e no Laboratório do Hospital Luísa Alcântara e Silva. Já os ensaios de obtenção, isolamento e identificação dos compostos químicos

presentes nos óleos essenciais foram realizados nos laboratórios de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Indução do diabetes

Todos os 152 ratos foram previamente distribuídos ao acaso em três diferentes experimentos, dos quais 144 foram submetidos à indução de diabetes antes de se iniciarem os experimentos, segundo (ZARROW, 1964), através da injeção intraperitoneal (IP) de solução de aloxano. Os mesmos foram mantidos em jejum por 24 horas antes da indução, a qual se deu com solução de aloxano (ACROS ORGANICS), LOT: A019654601 na concentração de 140mg/kg de peso corporal preparada em 50mM tampão citrato a um pH 3,0.

Todos os animais foram pesados individualmente, no início e final dos experimentos (APÊNDICE A), para permitir o cálculo do volume da droga administrada no curso do experimento. Uma vez realizado o cálculo, obteve-se o volume da solução de aloxano a ser administrada por via IP para cada animal, que variou em média de 1,5 a 2,0mL para cada animal.

Após receberem a solução por via IP, os animais foram acondicionados em gaiolas do tipo metabólicas, com ração e água potável *ad libitum*, facilitando assim a coleta diária de urina para a confirmação da glicosúria, que se iniciou 48 horas após a administração da solução que foi avaliada através da utilização de tiras reativas tipo Multistix (Bayer Diagnósticos).

A avaliação do quadro de glicosúria foi realizada diariamente de forma qualitativa através da visualização da tonalidade de mudança na cor da tira. Valores de glicosúria igual ou superior a 200mg/dL foram considerados positivos para a próxima etapa.

Confirmado o quadro de glicosúria por volta do quinto dia após a administração da solução de aloxano, todos os animais com resultados positivos foram submetidos a uma coleta de 5 μ L de sangue total da ponta da calda para a confirmação do quadro de diabetes (APÊNDICE B).

Após confirmação do diabetes (critério de inclusão) através da utilização de um aparelho glicosímetro one-touch Ultra (Johnson & Johnson), os animais foram separados em número de sete por grupo (experimento 1 e 2) e oito (experimento 3), em gaiolas de polipropileno, para assim dar início aos experimentos.

3.3 O estudo

Os ratos utilizados nos três experimentos deste estudo foram pesados individualmente, no início e no final, para permitir o cálculo dos volumes das diversas drogas administradas no curso dos experimentos. Uma vez realizado o cálculo, obteve-se a concentração das diferentes soluções.

Os animais permaneceram em jejum com oferta de água a partir de 24 horas antecedentes ao procedimento de indução do diabetes e coleta do material para os diferentes experimentos. Não houve nenhuma restrição alimentar antes e após os procedimentos de gavagem (experimento 3) e inoculação das suspensões em membro pélvico esquerdo (experimentos 1 e 2).

A técnica anestésica escolhida foi a inalação de vapores de éter dietílico sem intubação traqueal e sem o emprego de suporte ventilatório. A indução anestésica foi levada a efeito alojando-se o animal em campânula de acrílico contendo em seu interior uma camada de algodão umedecido em éter dietílico. Atingido o nível adequado de narcose, o animal era retirado da campânula e imobilizado sobre uma prancha de madeira revertida por uma lâmina de plástico fenólico, com extensão das quatro patas e em decúbito dorsal.

A anestesia foi mantida com máscara de éter dietílico e ar ambiente, em respiração espontânea. O nível anestésico foi avaliado por parâmetros clínicos, tais como frequência respiratória, profundidade e vigor dos movimentos respiratórios e ocorrência de abalos musculares.

Durante os experimentos foi realizada apenas uma intervenção cirúrgica para a retirada do material em estudo. Após o objetivo cirúrgico alcançado, os animais, ainda sob o efeito de narcose, foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.3.1 Desenho do estudo

In vitro

Foram avaliadas as atividades antibacterianas de óleos essenciais extraídos de folhas e flores de *Lippia aff gracilis* e *Lippia gracilis* em diferentes concentrações. Foram utilizados o dimetilsulfóxido (DMSO) e salina estéril como diluentes das soluções testadas. Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de úlceras de pé diabético humano (MOTTA NETO *et. al.*,2005).

In vivo

Tanto o experimento 1 quanto o experimento 2 foi composto de dois procedimentos, enquanto no experimento 3 foi realizado apenas um procedimento. Os experimentos 1 e 2 avaliaram a atividade antibacteriana de soluções a 5% dos óleos essenciais extraídos das espécies de *Lippia aff gracilis* e *lippia gracilis*. Foi utilizada a menor diluição que apresentou atividade antibacteriana. No experimento 3, avaliou-se a ação antioxidante e imunomoduladora de uma solução L-glutamina (L-Gln).

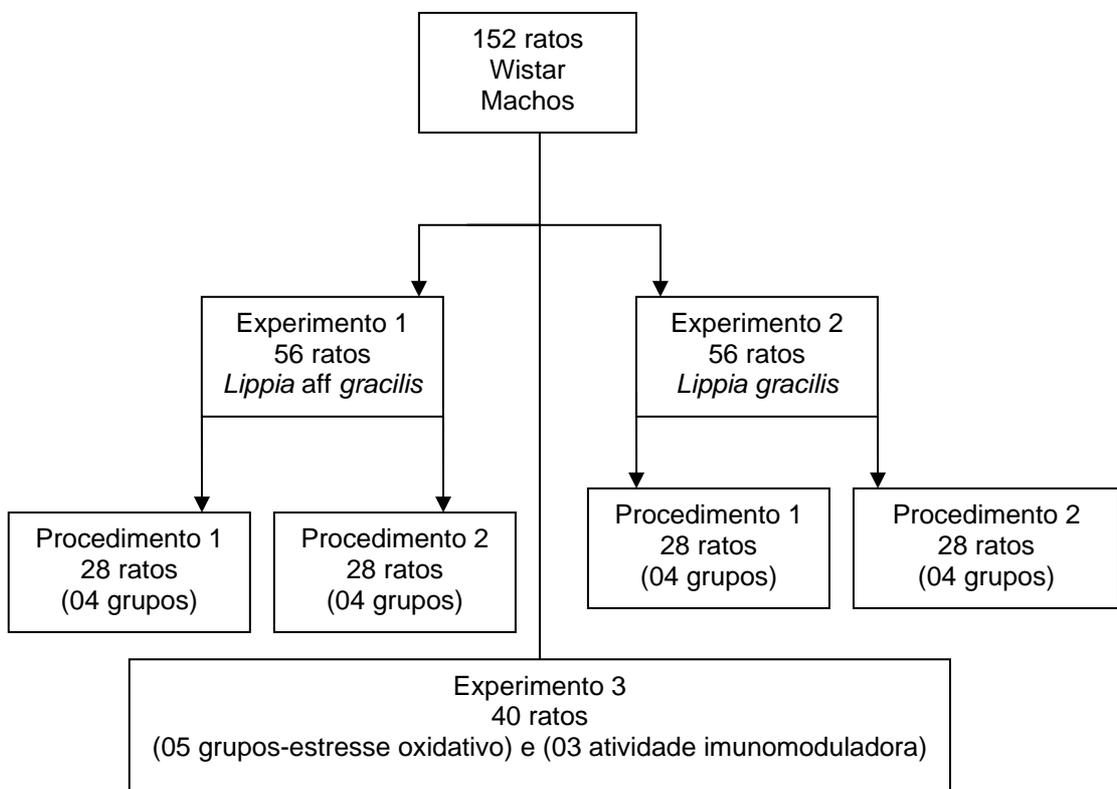


FIGURA 3 - Distribuição geral dos experimentos utilizados no estudo do modelo *in vivo*

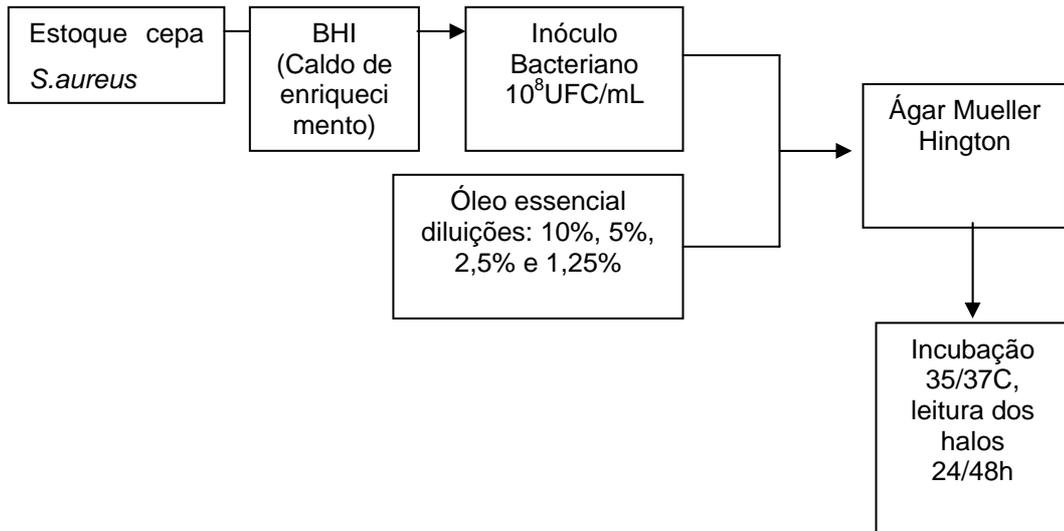


FIGURA 4 - Desenho do estudo *in vitro* utilizado para avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais.

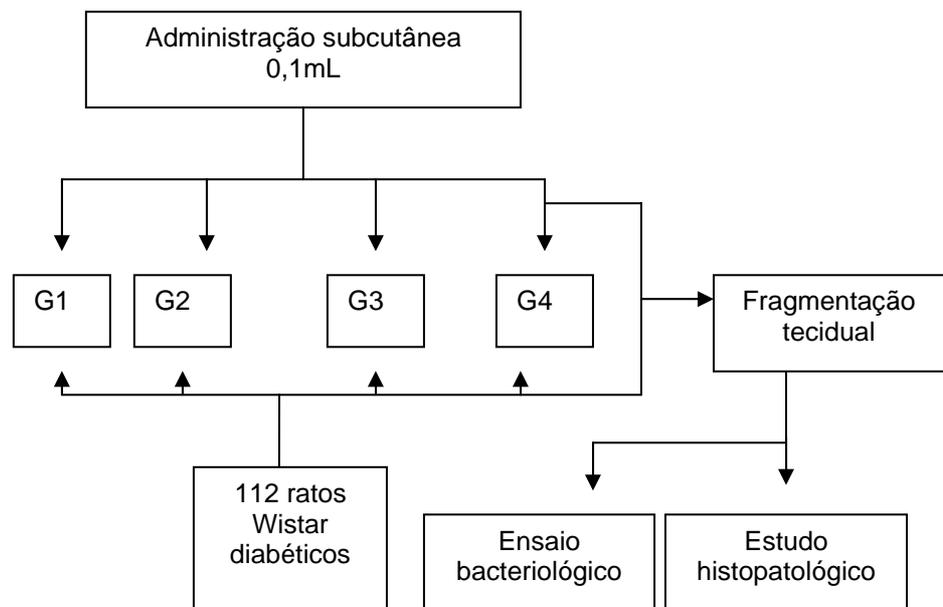


FIGURA 5 – Desenho do estudo *in vivo* utilizado para avaliação da atividade antibacteriana e anti-inflamatória dos óleos essenciais.

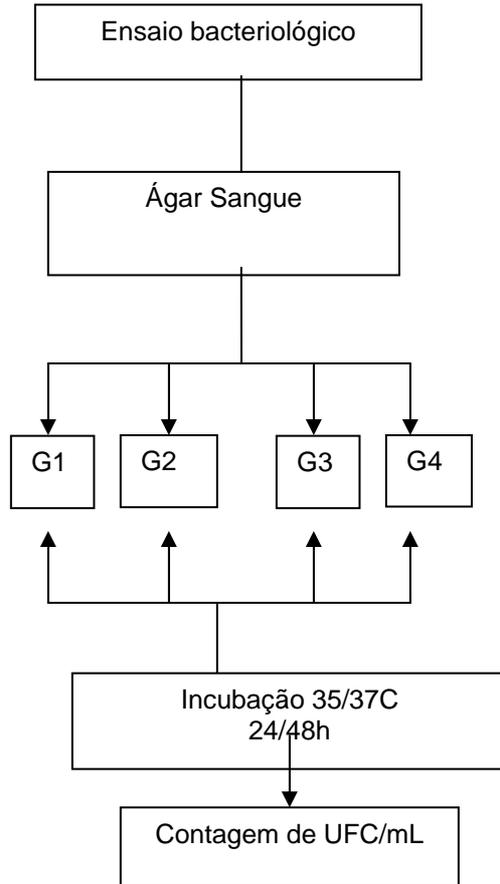


FIGURA 6 – Desenho do ensaio bacteriológico utilizado para quantificação bacteriana.

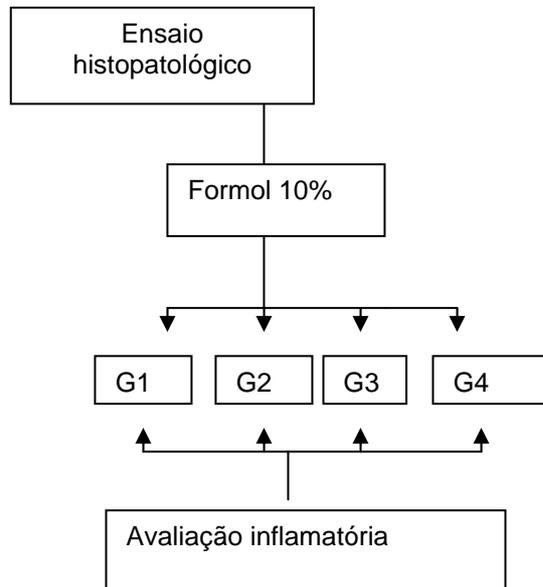


FIGURA 7 - Desenho estudo histopatológico utilizado para avaliação inflamatória

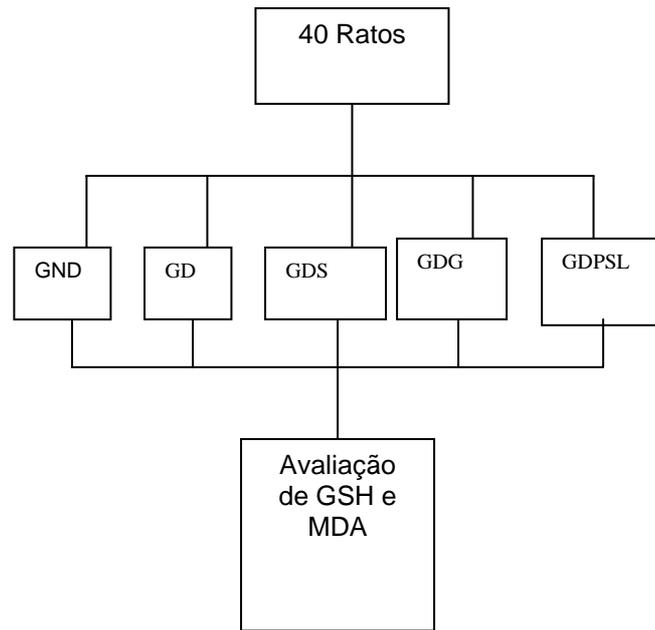


FIGURA 8 – Desenho da avaliação antioxidante

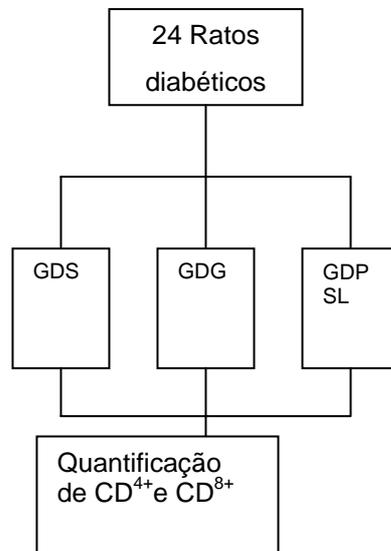


FIGURA 9 - Desenho do estudo utilizado na avaliação imunomoduladora

3.4 Obtenção dos óleos essenciais

Quinhentos gramas das folhas de cada espécie botânica foram coletados no horto de plantas medicinais da Universidade Federal do Ceará. Foram coletados em um balão de 5L, juntamente com 2L de água e mantidas em ebulição por duas horas. Após este período, a mistura água/óleo contida no doseador foi separada, em um funil de separação, através de partição com éter etílico. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo 0,3mL (150mg) de cada óleo essencial. O resultado da identificação dos componentes químicos destes óleos encontra-se nos Quadros 1 e 2 (Ver resultados).

3.4.1 Espectrometria de massa (EM)

Os espectros de massas dos óleos essenciais foram obtidos em espectrômetro de massa Hewlett-Psckard, modelo HP-5971 A, acoplado a cromatógrafo de gás líquido, modelo HP-5890 A série II(CGL/EM), provido de coluna capilar de metil-fenil silicone com 25,0m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro externo, utilizando um gradiente de aumento de temperatura de 4,0°C/min. De 50°C a 180°C e 20°C/min de 180°C a 280°C, sendo a temperatura do injetor de 250°C.

3.4.2 Determinação dos componentes voláteis dos óleos essenciais

A identificação da composição química volátil de *Lippia gracillis* e *Lippia* aff. *Gracilis* foi realizada com óleo essencial obtido de folhas.

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em aparelho doseador do tipo Cleavenger, modificado por Gottlieb (GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1960). A análise da composição química de cada óleo foi executada usando um equipamento CGL/EM HP – 5971, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m), tendo DB – 5 como fase estacionária. A identificação dos constituintes voláteis foi realizada por pesquisa biblioteca de padrões constantes de banco de dados de espectros de massa e banco de dados de índices de Kovat e ainda por

inspeção visual com espectros registrados na literatura (ALENCAR *et. al.*, 1990; ADAMS, 1989).

3.5 Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Lippia aff. gracilis* e *Lippia gracilis* frente à cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de úlcera de pacientes com pé diabético.

3.5.1 Preparo do inóculo bacteriano

Foi utilizada uma cepa de *Staphylococcus aureus* previamente identificada isolada de úlcera de pé diabético (MOTTA NETO *et. al.*, 2005), a qual foi retirada do estoque e semeada em caldo BHI (Brain Heart Infusion agar) (DIFCO). Após sementeio, este material foi incubado em estufa bacteriológica a 35/37°C durante 12 horas.

Passado o período de incubação, o inóculo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5mL de solução salina estéril ajustando a turvação para 0.5 da escala Mac.Farland (PROBAC), correspondente a uma quantidade de 10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) /mL.

3.5.2 Técnica de Difusão em Ágar

Foi então submergido a esta suspensão bacteriana previamente preparada um *Swab* de algodão estéril e, antes de retirá-lo, foi eliminado todo excesso de líquido, agitando-o contra a parede interna do tubo. Após este procedimento, o *swab* foi inoculado à superfície seca do meio de cultura ágar Müller-Hinton (DIFCO) contido em uma placa mantida à temperatura ambiente. Com o objetivo de distribuir uniformemente o inóculo, o ágar foi estriado com *swab* em pelo menos três direções, girando a placa em ângulos de aproximadamente 60 graus após cada estria. Passado este procedimento, foi recolocada a tampa na placa e deixada em repouso durante 5 minutos, para secagem do ágar Mueller-Hinton, antes da colocação dos discos.

Os discos (papel Waterman nº5) foram previamente umedecidos em diferentes concentrações dos óleos essenciais. As concentrações utilizadas no procedimento em questão foram: 10; 5; 2,5 e 1,25%. O diluente utilizado para o preparo das soluções foi uma solução de DMSO marca Aldrich a 2% preparado em

salina estéril. Os discos, após umedecidos, foram colocados manualmente sobre a superfície do meio, com auxílio de pinça estéril, e colocados aproximadamente 20mm um do outro e a 15mm da parede da placa, evitando assim que as zonas de inibição de crescimento se sobrepusessem ou se estendessem até a margem do ágar. Cada disco foi pressionado à superfície do ágar com a ponta da pinça. Após esta etapa, as placas foram incubadas a 35/37°C em estufa bacteriológica por aproximadamente 24/48 horas. Após este período, realizou-se a medição da zona de inibição do crescimento ao redor de cada disco, com auxílio de uma régua. Esta medição foi realizada utilizando-se uma fonte de luz refletida observada contra um fundo negro e opaco.

A cada lote e meio de cultura utilizado para realização deste experimento, foram feitos testes com a cepa ATCC *Staphylococcus aureus* 29213, utilizando-se discos de oxacilina (1µg) como controle positivo em cada experimento.

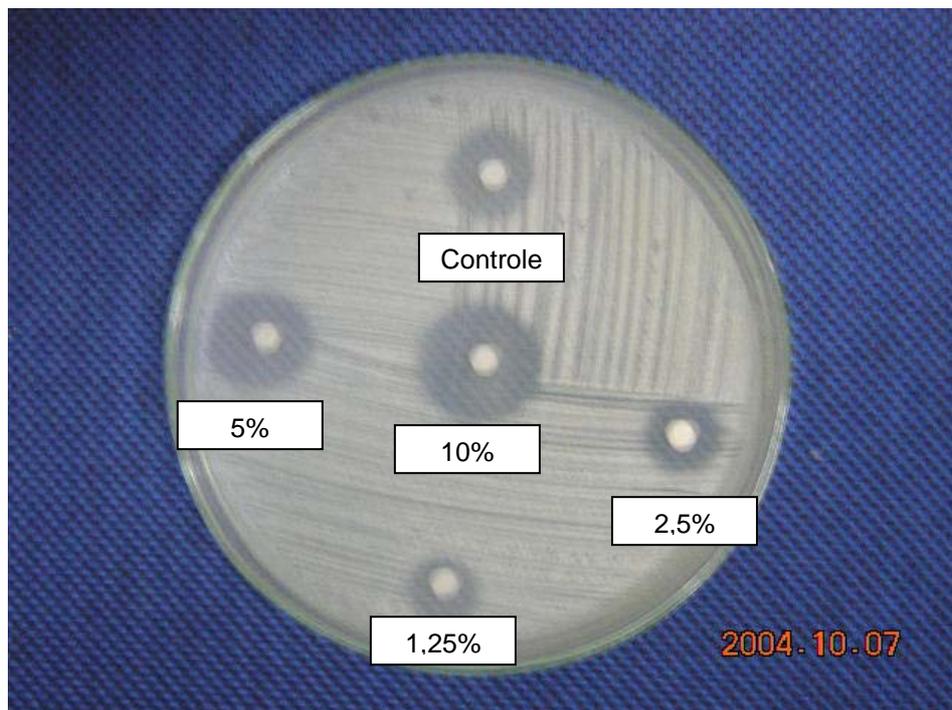


FIGURA 10 - Avaliação do padrão de inibição do crescimento bacteriano, teste *in vitro*, em placa de ágar Mueller Hinton (DIFCO), utilizando-se diferentes concentrações de soluções de óleos essenciais de *Lippia aff gracilis* e *Lippia gracilis*

3.6 Estudo *in vivo* da atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Lippia aff. gracilis* e *Lippia gracilis* em membro pélvico infectado de ratos diabéticos por *Staphylococcus aureus*

3.6.1 Avaliação do procedimento 1 (*Lippia aff. gracilis* e *Lippia gracilis*)

Consistiu na inoculação simultânea das soluções de óleos essenciais a uma concentração de 5% com o inóculo bacteriano em membro pélvico esquerdo.

Total de animais utilizados: 56

QUADRO 01 - DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA AFF. GRACILIS* E *LIPPIA GRACILIS*

GRUPOS	CATEGORIAS
G1	Branco (Sol de DMSO 2%)
G2	Controle Negativo (Solução de óleo essencial a 5%)
G3	Controle Positivo (Inóculo preparado com cepa de <i>S. Aureus</i>)
G4	Teste (Solução de óleo 5% + inóculo preparado com cepa de <i>S.aureus</i>)

- Grupo 1 (controle negativo): inoculação por via subcutânea na porção plantar do membro pélvico esquerdo de 0,1mL de uma solução salina preparada em solução de DMSO a 2% (dimetil sulfóxido - Aldrich).
- Grupo 2 (controle negativo): inoculação por via subcutânea de 0,1mL de uma solução a 5% de óleo essencial preparado em solução de DMSO 2%.
- Grupo 3 (controle positivo): inoculação por via subcutânea de 0,1mL do inóculo bacteriano (Caldo de *Staphylococcus aureus*), preparado de acordo com a escala 0.5 Mac Farland (10^8 ufc/mL) na porção plantar do membro pélvico esquerdo de cada representante deste grupo.
- Grupo 4 (teste): inoculação por via subcutânea na porção plantar do membro pélvico esquerdo de 0,05mL do inóculo bacteriano (Caldo de *Staphylococcus aureus*) escala 0.5 Mac Farland (10^8 ufc/mL). Passados 5 minutos da administração, foi inoculado no mesmo local 0,05mL da solução de óleo essencial a uma concentração de 5%, preparada em DMSO a 2%.

3.6.2 Avaliação do procedimento 2 (*Lippia aff gracilis* e *Lippia gracilis*)

Consistiu na avaliação anti-bacteriana *in vivo* das soluções de óleos essenciais a uma concentração de 5% administrada por via subcutânea em membro pélvico esquerdo após 24h da administração do inóculo bacteriano.

Total de animais utilizados: 56

Foram tomados quatro grupos para cada procedimento, utilizando-se 28 ratos machos Wistar para cada procedimento. Cada grupo foi composto de 7 ratos, similar ao experimento 1, diferenciando-se apenas no manuseio do grupo 4 (teste), para o qual foi administrado primeiro o inóculo bacteriano e, passados 24 horas, inoculou-se a solução de óleo a 5%, respeitando-se as concentrações e volumes padronizados nos procedimentos 1. O tempo de iniciação deste experimento até o seu término foi de 48 horas.

Passadas 24h do início dos procedimentos 1 e 48h dos procedimentos 2, todos os animais representantes dos diferentes grupos foram anestesiados, pesados, mensurados quanto à glicemia e colocados em decúbito dorsal, com os membros pélvicos anteriores e posteriores fixados à prancha por tiras de esparadrapo, onde, através de técnicas assépticas, foi retirada parte do fragmento tecidual tanto para o estudo bacteriológico como histopatológico. Após a realização destes experimentos, aproveitando ainda o estado de narcose desenvolvido, todos os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical.



FIGURA 11 - Técnica de administração das soluções de óleo essencial e inóculo bacteriano utilizada nos experimentos 1 e 2.

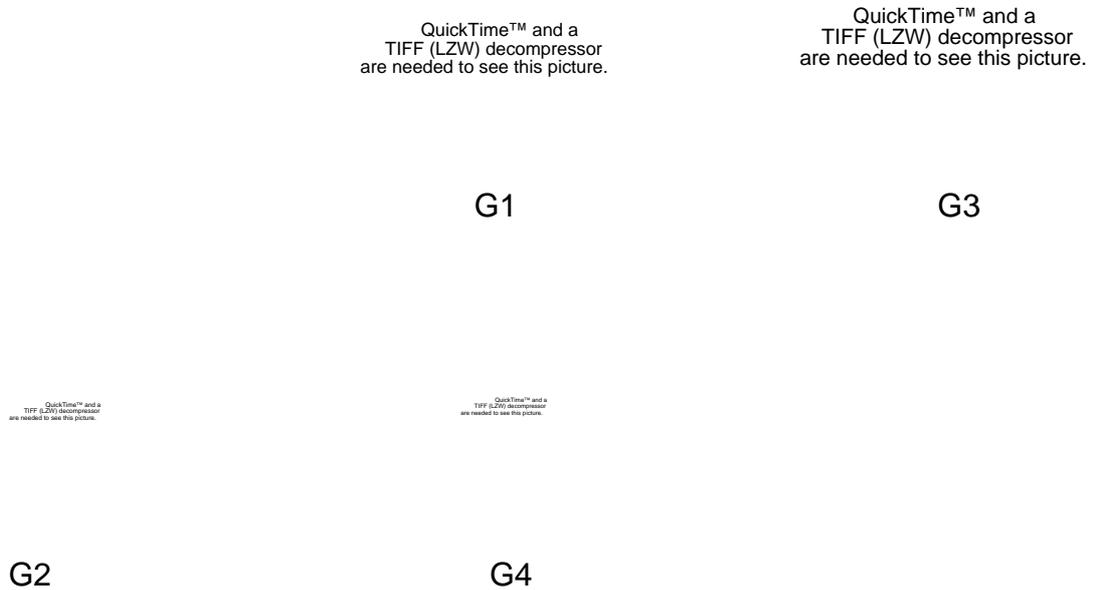


FIGURA 12 - Avaliação macroscópica do processo infeccioso dos respectivos grupos.

3.6.3 Estudo bacteriológico

Após estabelecido um quadro de anestesia, foram retiradas, utilizando-se técnicas de anti-sepsia (álcool iodado), uma parte tecidual da porção plantar do membro pélvico esquerdo de cada representante.

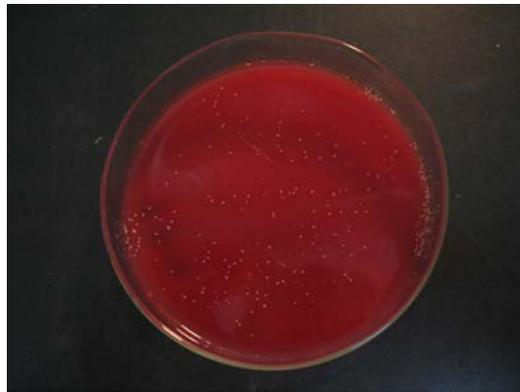
Parte da porção tecidual foi encaminhada submersa em BHI, caldo previamente pesado, o qual foi dissecionado com auxílio de bisturi nº11 (EMBRAMAC) em placa de petri estéril até a completa homogeneização tecidual. Após esta etapa, foi coletada uma alíquota da suspensão de 0,1mL, a qual, por sua vez, foi submetida a duas diluições com salina estéril de mesmo volume inicial, com o intuito de facilitar a contagem das UFC (Unidades Formadoras de Colônias)/mL (grupo controle positivo) (NCCLS, 2000).

As suspensões teciduais, uma alíquota de 0,1mL, foram semeadas em placa de BHI ágar suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Após semeio promovido com alça de Drigalski (NCCLS,2000), todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35/37°C durante 24/48 horas. Passado este período, foram promovidas as contagens das UFC.

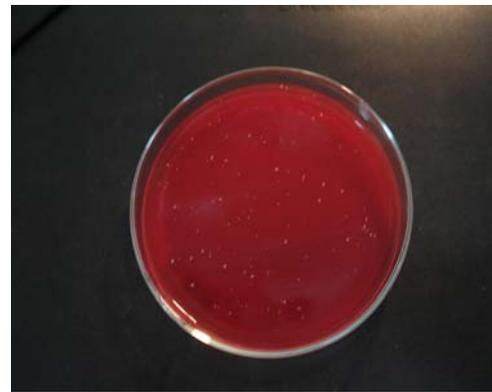
As contagens das UFC formadas foram realizadas baseando-se nas técnicas propostas por Ridley *et. al.* (1964) e Westergreen (1978), para o cálculo do índice baciloscópico (RIDLEY *et. al.*, 1964).

Todos estes procedimentos foram realizados em triplicata, dos quais os resultados foram obtidos mediante cálculo da média do somatório do número de UFC/mL formadas.

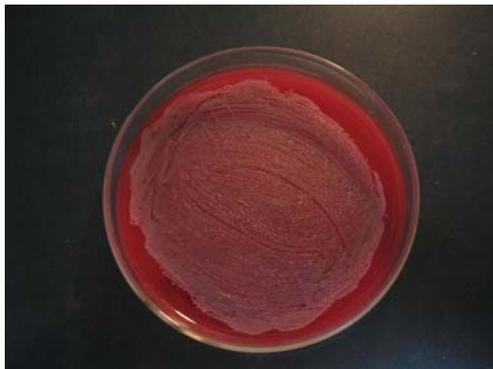
Após a coleta tecidual, os animais utilizados tanto no experimento 1 quanto no 2 foram mortos individualmente, por deslocamento cervical.



G4 (*Lippia aff. gracilis*)



G4 (*Lippia gracilis*)



G3 (*Lippia aff. gracilis*)



G3 (*Lippia gracilis*)

FIGURA 13 - Avaliação macroscópica do crescimento em ágar sangue das unidades formadoras de colônia desenvolvidas nas culturas dos grupos 4 (teste) e grupo 3 (controle positivo).

3.6.4 Estudo histopatológico

Parte da amostragem tecidual dos animais foi encaminhada ao laboratório de Patologia (UFC) para análise qualitativa. Os tecidos foram conservados em solução de formalina a 10%, tamponada, e acondicionados em pequenos frascos de ependoff.

Em seguida, os tecidos foram embebidos em parafina, cortados no micrótomo na espessura de 4 a 6 μ , tendo sido utilizada a coloração hematoxilina-eosina habitual e, posteriormente, analisados em microscopia óptica. Os parâmetros histológicos empregados para a análise foram: a) presença ou ausência de processo inflamatório; b) presença ou ausência de necrose tecidual. Cada parâmetro foi avaliado por um observador (D.B.M) cego e quantificado como leve (+), moderado (++) ou intenso (+++).

3.7 Avaliação da ação antioxidante e imunomoduladora da L-glutamina em ratos diabéticos.

3.7.1 Avaliação da ação antioxidante

Total de animais: 40

Os 40 ratos pertencentes a este experimento foram distribuídos em cinco grupos numericamente iguais (n=8):

Grupo Não Diabético (GND): constituído por 8 ratos, tratados com ração especializada e água *ad libitum*, os quais foram manipulados apenas no final do experimento (30^o dia).

Grupo Diabético (GD): constituído por 8 ratos, tratados com ração especializada e água *ad libitum*, os quais foram manipulados no ato da indução do quadro diabético, na confirmação e no 30^o dia .

Grupo Diabético gavagem salina (GDS): constituído por 8 ratos, tratados com ração especializada e água *ad libitum*, os quais foram manipulados no ato da

indução do quadro diabético, na confirmação e diariamente por 30 dias, com uma solução de NaCl 0,85% uma tomada diária de 2mL por gavagem.

Grupo Diabético gavagem L-Glutamina (GDG): constituído por 8 ratos, tratados com ração especializada e água *ad libitum*, os quais foram manipulados no ato da indução do quadro diabético, na confirmação e diariamente por 30 dias, com uma solução aquosa de L-Glutamina (0,7g/Kg de peso) uma tomada diária de 2mL por gavagem.

Grupo Diabético gavagem Proteína do Soro do Leite (GDPSL): constituído por 8 ratos, tratados com ração especializada e água *ad libitum*, os quais foram manipulados no ato da indução do quadro diabético, na confirmação e diariamente por 30 dias, com uma solução aquosa de PSL (0,7g/Kg de peso) uma tomada diária de 2mL por via gavagem.

3.7.2 Avaliação da ação imunomoduladora

O estudo foi realizado utilizando-se os mesmos animais pertencentes aos grupos que avaliaram a ação antioxidante. Não foi realizado a avaliação dos grupos de ratos diabéticos (GND) e não diabéticos (GD), ficando estabelecidos para este estudo apenas três grupos designados como; GDS: diabético gavagem salina; GDG: diabético gavagem L-glutamina; e GDPSL: diabético gavagem Proteína do Soro do Leite .

3.7.3 Técnica laboratorial realizada no experimento 3

Preparação dos espécimes (soro, plasma e sangue arterial)

Os tubos de ensaio contendo sangue arterial total (1,0mL) foram colocados em centrífuga refrigerada Jouan, modelo MR23i (França), e centrifugados a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, mantendo-se a temperatura interna em 10°C. Parte do soro obtido (0,5mL) foi imediatamente transportado para um tubo de endoff e imediatamente armazenado a -70°C. A outra parte foi transportada para um tubo de endoff e encaminhada para o laboratório de análises clínicas (H.L.A.S) onde foi

mensurada a glicemia plasmática pela metodologia glicose-oxidase (espectrofotometria) (CELM, 2003).

Foi coletada ainda cerca de 0,5mL de sangue arterial total em tubo de endoff, contendo 0,025mL de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), o qual, após a coleta, referido material foi encaminhado para o Laboratório Central do Ceará (LACEN-CE), para o setor de virologia, onde foram quantificados os Linfócitos da linhagem CD⁴⁺ e CD⁸⁺ por técnicas de Citometria de Fluxo (CELM, 2003).

3.7.3.1 Avaliação glicêmica

A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4- aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



Reagentes:

Reagente de cor: (solução de tampão com enzima glicose oxidase)

Padrão: (solução de glicose de concentração 100mg)

Foram tomados tubos de ensaio em quantidade de acordo com o número de amostras analisadas e processadas como se segue:

Adicionou-se cerca de 2,0mL do reagente de cor nos tubos “teste, padrão e branco”. Em seguida cerca de 0,002mL da amostra de plasma foi adicionada a cada tubo teste e 0,002mL do padrão foi adicionado ao tubo definido como padrão. Misturou-se vigorosamente e colocou-se em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Passado o tempo de incubação, foi determinada a absorbância dos tubos teste e

padrão em aparelho espectrofotômetro de marca Celm em 505nm de filtro, acertando o zero com o tubo branco.

3.7.3.2 Contagem de células CD^{4+} e CD^{8+}

A técnica de quantificação de células sanguíneas foi realizada em um sistema FACSCount que fornece o número absoluto de Linfócitos T auxiliares (CD^{4+}) e de Linfócitos T citotóxicos (CD^{8+}), a partir da medida de quatro parâmetros: FSC (forward scatter), SSC (side scatter), FL1 (Fluorescência 1), FL2 (Fluorescência2).

A contagem de linfócitos absolutos é possível porque, em cada tubo de amostra, existe um número conhecido de partículas de referência conjugadas com substância fluorescente. Essas partículas atuam como um padrão para a quantificação das células. Como o aparelho lê a fluorescência tanto das partículas de referência quanto das células, conhecendo a quantidade de partículas, ele pode calcular o número de células.

As amostras de sangue arterial total após serem coletadas em EDTA foram imediatamente encaminhadas para o setor de virologia do LACEN-CE, onde foram entregues e analisadas por um observador não cego (J.N.M.C) (APÊNDICE C).

Preparação dos tecidos (Fígado, Rim, Músculo esquelético, Pâncreas e Tecido adiposo).

Após remoção dos fragmentos teciduais, os mesmos foram lavados com soro fisiológico gelado (4°C) para a remoção dos resquícios de sangue e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido há cerca de 190 graus centígrados negativos. Após o congelamento, procedeu-se à fragmentação do material utilizando-se grau e pistilo de porcelana. Os fragmentos foram colocados em tubos de endoff devidamente rotulados e armazenados a -70°C, até sua utilização.

3.7.3.3 Avaliação da peroxidação lipídica

A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA) formado na peroxidação lipídica. Procede-se, a seguir, à extração deste composto usando-se

um solvente orgânico (n-butanol), determinando-se a concentração de MDA que será expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Utilizou-se no presente estudo, para a quantificação do teor de TBARS no Soro e nos tecidos (Fígado, Rim, Músculo esquelético, Pâncreas e Tecido adiposo), o teste de Uchiyama e Mihara (1978), semelhante ao acima descrito, no qual a concentração de TBARS é expressa em $\mu\text{mol MDA/g}$ de tecido.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos tecidos:

O MDA é capaz de reagir sob aquecimento em meio ácido com o ácido tiobarbitúrico originando um composto de cor rosa.

Reagentes:

Cloreto de potássio: 1,15%

Acido tiobarbitúrico: 0,6%

Acido fosfórico:1%

N-butanol

Procedimento:

O teor de TBARS ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) foi quantificado pelo método de Uchiyama e Mihara (1978), freqüentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica. As amostras de soro e nos tecidos (Fígado, Rim, Músculo esquelético, Pâncreas e Tecido adiposo) a serem analisadas foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C imediatamente após a coleta e lavagem com soro fisiológico gelado (4°C), para remover quaisquer vestígios de sangue. Após pesagem, a amostra tecidual foi homogeneizada em KCL gelado 1,15%, resultando em uma solução ácida de concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5mL de cada amostra e acrescentou-se 1,0mL da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0mL da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 1%). A mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo seguido da adição de 4,0 mL de N-butanol. Após 2,0 minutos de agitação, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a

3.000 r.p.m (rotações por minuto). A absorvância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-640 (Fullerton, CALifórnia) a 520nm e 535nm.

A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando-se a regressão linear a partir de uma curva padrão preparada (APÊNDICE D). Os resultados foram expressos em μmol MDA/g tecido fresco.

3.7.3.4 *Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)*

A determinação dos grupos SH é realizada pelo método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do 5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto formado. A leitura da absorvância a 412nm foi realizada em espectrofotômetro (Beckman DU-640, Fullerton, Califórnia).

Drogas e Reagentes

Acido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Acido tricloroacético (ATC 50%)

Tampa TRIS 0,4M pH 8,9

5,5-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) 0,5M)

Metanol

Glutathiona (GSH, 1mg/mL)

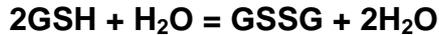
Preparo dos reagentes:

Acido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

EDTA Na_2 0,2M PM 372,2 (211g + H_2O *qsp* 70mL)

EDTA Na_2 0,2M (30mL de EDTA Na_2 0,2M+ H_2O *qsp* 300mL)

Reação



Procedimento:

As amostras de tecido de fígado, rim, pâncreas, músculo esquelético e tecido adiposo (500mg) foram pesadas e homogeneizadas em 5mL de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado em lã ad vidro. Retira-se uma quantidade de 4,0mL do homogenato e mistura-se com 3,2mL de água destilada e 0,8mL de ácido tricloroacético 50%. O tubo é agitado e centrifugado a 3000 r.p.m. por 15 minutos. Retiram-se 2,0mL do sobrenadante e acrescentam-se 4mL de TRIS 0,4 M (pH8,9) e 0,1 mL de DTNB 0,01M. Agita-se a mistura para homogeneização. Em seguida, lêem-se as absorbâncias no espectrofotômetro a 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH é obtida comparando-se o valor da absorbância a uma tabela padrão de GSH, previamente preparada (APÊNDICE E).

3.8 Análise estatística

Para todas as variáveis, realizou-se uma análise descritiva dos dados. Comparações transversais foram realizadas entre os diferentes grupos com os respectivos controles, utilizaram-se testes paramétricos (testes T student) para a análise inter-grupal entre os grupos não diabéticos e diabéticos na avaliação das atividades anti-oxidantes e nas contagens de CD⁴⁺ e CD⁸⁺.

ANOVA com comparações *post hoc* (teste de Tukey-Kramer, Bartlett's, Newmann-Keuls, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis (Dunn)) foram os testes não paramétricos utilizados para as análises dos demais resultados, em que se necessitava a comparação de mais de dois grupos.

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se os programas de análise estatística Graph Pad software, San Diego, Califórnia, USA, www.graphpad.com.

Os resultados foram apresentados sob forma de tabelas e gráficos. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1: *Lippia aff. gracilis*

Observou-se um aumento na concentração do composto Carvacrol, o qual apresentou um percentual de 50,13% em relação aos outros constituintes químicos identificados.

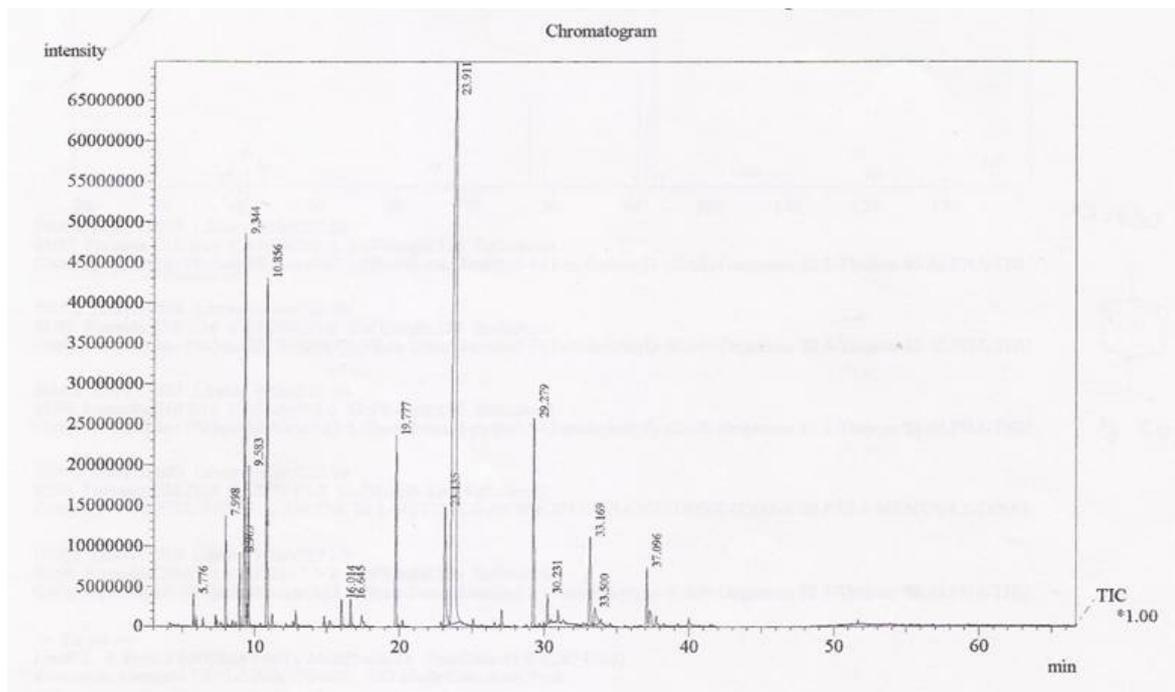


Imagem 1: Cromatograma *Lippia aff. gracilis*

QUADRO 2 - CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE *LIPPIA AFF GRACILIS*

SUBSTÂNCIA	IK	PERCENTUAL
Alpha-thujeno	930	0,60
Myrceno	991	2,08
Alpha-terpineno	1017	1,46
Para-cymeno	1025	10,73
Eucalyptol	1031	2,74
Gamma-terpineno	1060	8,04
Borneol	1169	0,68
4-terpineol	1177	0,71
Carvacrol methyl ether	1245	4,95
Thymol	1290	4,92
Carvacrol	1299	50,13
Beta-caryophyleno	1419	5,96
Aromadendreno	1441	0,78
Bicyclogermancreno	1500	3,34
Spathulenol	1578	1,77
TOTAL		98,89

IK: Índice de Kovat simulado

O diâmetro da zona de inibição de crescimento observado no controle foi bem menor que o halo formado na concentração de 5%. O potencial antibacteriano do óleo essencial de *Lippia aff. gracilis* mostrou-se eficaz na concentração de 5% e significativo ($p < 0,005$) quando realizadas comparações entre os demais halos formados.

Observou-se uma diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado o halo de inibição de crescimento formado pelo controle (oxacilina) com o halo formado pela ação do óleo.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC, µG/ML) DO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA AFF. GRACILIS FRENTE À CEPA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADO DE ÚLCERA DE PÉ DIABÉTICO

Bactéria	Gram	MIC (µg/mL)				
		10	5**	2,5	1,25	Oxacilina(1µg/disco)
<i>S.aureus</i>	+	26	25	n/a	n/a	18

n/a: não ativo

Teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ comparado ao diâmetro formado no controle).

Ocorreu redução significativa ($p < 0,001$) nas contagens das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* quando a administração tanto do inóculo como da solução de *Lippia aff. gracilis* 5% ocorreu no mesmo instante. Observou-se uma redução estatisticamente significativa no número de UFC/mL no grupo teste (G4) quando comparado com o grupo controle (G3).

TABELA 2 - QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS OBSERVADAS COM A ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE DO INÓCULO E SOLUÇÃO DE LIPPIA AFF. GRACILIS 5%.

GRUPOS	RATOS							X ± EPM
	Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL)							
	1	2	3	4	5	6	7	
1	00	00	00	00	00	00	00	00 ± 00
2	00	00	00	00	00	00	00	00 ± 00
3***	10 ⁷	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸ ± 698
4	45	175	347	100	427	306	652	293,1 ± 79,07

G1: Branco; G2: Controle negativo; G3: Controle positivo e G4: Teste

Testes de Bartlett's e Newman-Keuls em 7 ratos por grupo (Média ± E.P.M);

*** $p < 0,001$ quando comparados com G1;

*** $p < 0,001$ quando comparado com G2;

*** $p < 0,001$ quando comparado com G4 .

Houve redução significativa ($p < 0,001$) nas UFCs do grupo teste (G4) em comparação com o grupo controle (G3) quando dado um intervalo de 24h de administração do inóculo para a solução de *Lippia aff. gracilis* 5%.

TABELA 3 - QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS QUANDO DADO UM INTERVALO DE TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO DE 24H DO INÓCULO PARA A SOLUÇÃO DE LIPPIA AFF. GRACILIS 5%.

GRUPOS	RATOS							X ± EPM
	Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL)							
	1	2	3	4	5	6	7	
1	00	00	00	00	00	00	00	00 ± 00
2	00	00	00	00	00	00	00	00 ± 00
3***	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸ ± 313
4	08	03	30	15	24	01	12	13,28 ± 4,03

Testes de Bartlett's e Newman-Keuls em 7 ratos por grupo (Média ± E.P.M);

*** $p < 0,001$ quando comparados com G1;

*** $p < 0,001$ quando comparado com G2;

*** $p < 0,001$ quando comparado com G4 .

4.2 Experimento 2: *Lippia gracilis*

Observou-se um aumento na concentração do composto Carvacrol, que apresentou um percentual de 47,57% em relação aos outros constituintes químicos identificados.

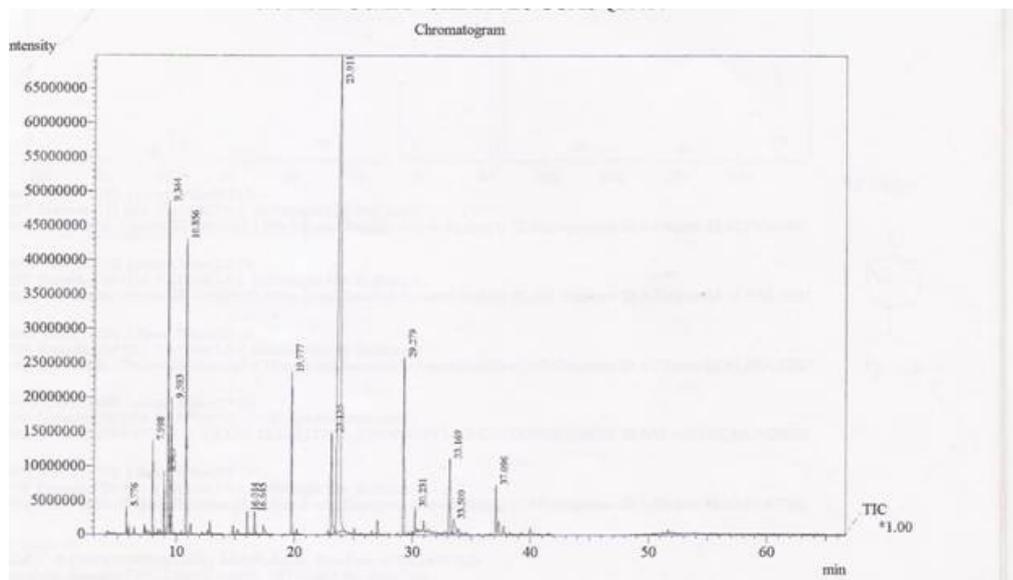


Imagem 2: Cromatograma *Lippia gracilis*

QUADRO 3: CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE *LIPPIA GRACILIS*

SUBSTÂNCIA	IK	PERCENTUAL
Alpha-felandreno	930	0,96
Myrceno	991	2,40
Alpha-terpineno	1017	10,89
Para-cymeno	1025	14,04
Eucalyptol	1031	2,74
Gamma-terpineno	1060	8,04
Borneol	1169	0,68
4-terpineol	1177	0,71
Carvacrol methyl ether	1245	4,95
Thymol	1290	5,45
Carvacrol	1299	47,57
TOTAL		98,43

IK: Índice de Kovat simulado

O potencial antibacteriano do óleo essencial de *Lippia gracilis* mostrou-se eficaz na concentração de 5%. Quando comparado a zona de inibição formada a partir de uma solução 5% de óleo com o controle (oxacilina 1µg/disc), observou-se uma diferença significativa ($p < 0,01$).

TABELA 4- CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC, µG/ML) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA GRACILIS* FRENTE À CEPA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADO DE ÚLCERA DE PÉ DIABÉTICO.

		MIC (µg/mL)				
Bactéria	Gram	10	5**	2,5	1,25	Oxacilina(1µg/disco)
<i>S.aureus</i>	+	28	26	n/a	n/a	17

n/a: não ativo

Teste de Mann-Whitney (** $p < 0,01$ comparado ao diâmetro formado no controle..oxacilina).

Ocorreu redução significativa ($p < 0,001$) nas contagens das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* quando a administração tanto do inóculo quanto da solução de *Lippia gracilis* 5% ocorreu no mesmo instante. Observou-se uma redução estatisticamente significativa no número de UFC/mL no grupo teste (G4) quando comparada com o grupo controle (G3).

TABELA 5 - QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS OBSERVADAS COM A ADMINISTRAÇÃO CONCOMITANTE DO INÓCULO E SOLUÇÃO DE *LIPPIA GRACILIS* 5%.

GRUPOS	RATOS							X ± EPM
	Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL)							
	1	2	3	4	5	6	7	
1	00	00	00	00	00	00	00	00 ± 00
2	00	00	00	00	00	00	00	00 ± 00
3***	10 ⁶	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸ ± 873
4	85	275	300	200	500	250	504	302,57,2

Testes de Bartlett's e Newman-Keuls em 7 ratos por grupo (Média ± E.P.M);

*** $p < 0,001$ quando comparados com G1;

*** $p < 0,001$ quando comparado com G2;

*** $p < 0,001$ quando comparado com G4 .

Houve redução significativa ($p < 0,001$) nas UFCs do grupo teste (G4) em comparação com o grupo controle (G3) quando dado um intervalo de 24h de administração do inóculo para a solução de *Lippia gracilis* 5%.

TABELA 6 - QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS QUANDO DADO UM INTERVALO DE TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO DE 24H DO INÓCULO PARA A SOLUÇÃO DE *LIPPIA GRACILIS* 5%.

GRUPOS	RATOS							X ± EPM
	Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL)							
	1	2	3	4	5	6	7	
1	00	00	00	00	00	00	00	00 ± 00
2	00	00	00	00	00	00	00	00 ± 00
3***	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹	10 ⁸ ± 818
4	05	01	20	12	34	05	15	13,14 ± 4,27

Testes de Bartlett's e Newman-Keuls em 7 ratos por grupo (Média ± E.P.M);

*** $p < 0,001$ quando comparados com G1;

*** $p < 0,001$ quando comparado com G2;

*** $p < 0,001$ quando comparado com G4 .

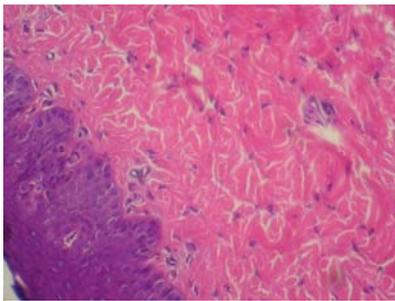
Estudo histopatológico dos experimentos 1 e 2

Diferenças significantes foram observadas quando comparado o grupo teste (G4) com o controle (G3). Observou-se que o grau de processo inflamatório do grupo teste foi leve. O nível de presença ou ausência de processo inflamatório foi similar quando foram avaliadas as soluções dos diferentes óleos e o seu tempo de administração.

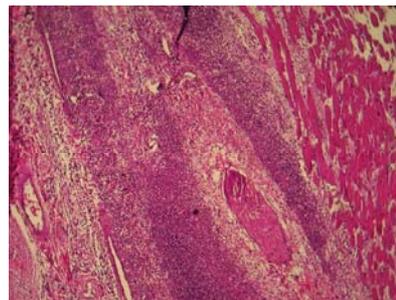
TABELA 7 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS REPRESENTANTES DOS GRUPOS

GRUPOS	Processo Inflamatório
1	+
2	+
3***	+++
4	+

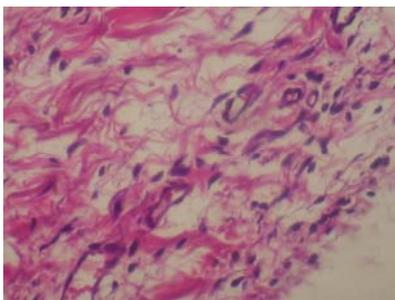
(+) leve; (++) moderado; (+++) intenso



G1 e G2 (Leve) (40X)



G3 (Intenso) (40X)



G4 (Leve) (40X)

FIGURA 14 - Avaliação histopatológica do processo inflamatório dos grupos

4.3 Experimento 3: L-glutamina

Observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) nas taxas glicêmicas do grupo PSL (GDPSL) quando comparado com o controle (GDS). Não houve diferença nas taxas glicêmicas do grupo teste (GDG) quando comparado com o grupo PSL (GDPSL). Observaram-se diferenças significantes quando comparados o grupo não diabético (GND) com o grupo diabético (GD).

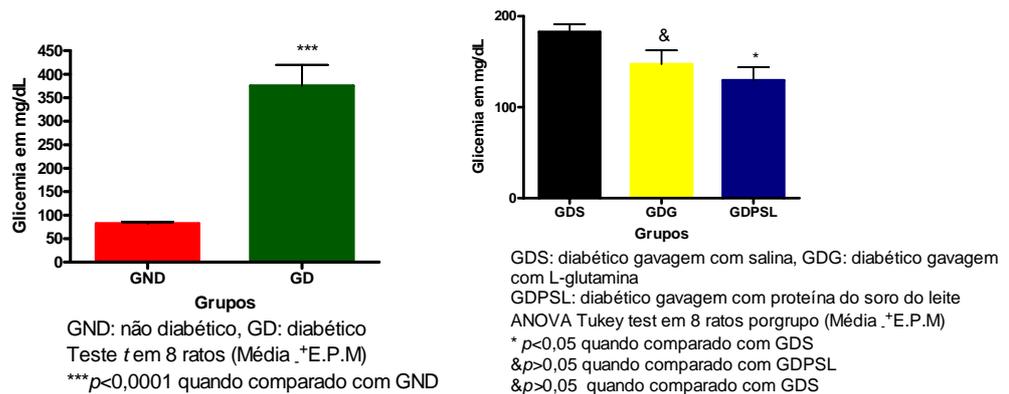


FIGURA 15 - Concentração glicêmica em mg/dL dos grupos no final do experimento

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.

GDG (Diabético com L-Gln)

QuickTime™ and a
TIFF (LZW) decompressor
are needed to see this picture.

GDS (Diabético com salina)

FIGURA 16 - Gráficos das populações de linfócitos T nos diferentes grupos analisados por Citometria de Fluxo FACSCalibur (#0123456789).

A quantificação de linfócitos CD⁴⁺ apresentou diferença com significância estatística. Verificaram-se diferenças ($p < 0,001$) quando comparados o grupo teste (GDG) com o controle (GDS) e o grupo PSL (GDPSL) com o grupo não diabético (GND). Não houve diferenças significantes nas populações de CD⁴⁺ do grupo teste (GDG) quando comparadas com as populações do grupo PSL (GDPSL).

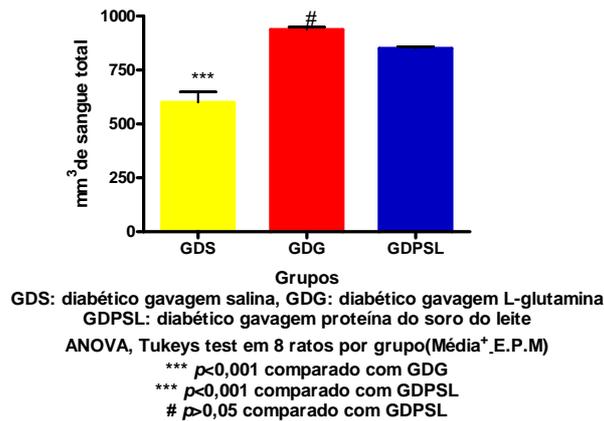


FIGURA 17 - Quantificação de células da linhagem linfocítica tipo CD⁴⁺ nos diferentes grupos

A quantificação de linfócitos CD⁸⁺ mostrou diferença estatisticamente significativa. Verificaram-se diferenças ($p < 0,001$) quando comparados o grupo teste (GDG) com o controle (GDS) e o grupo PSL (GDPSL), respectivamente.

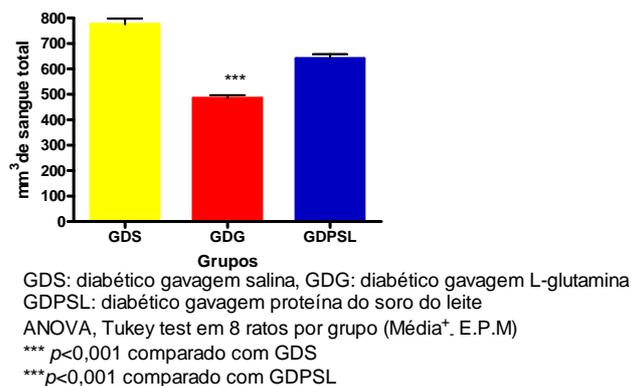


FIGURA 18 - Quantificação de células da linhagem linfocítica tipo CD⁸⁺ nos diferentes grupos.

A relação CD⁴⁺/CD⁸⁺ mostrou diferenças significantes. Verificaram-se diferenças estatísticas quando comparados os grupos teste (GDG) com os grupos (GDS) e (GDPSL), respectivamente.

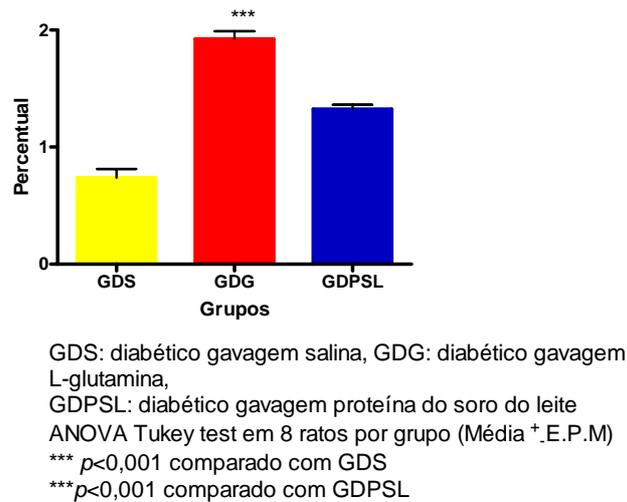
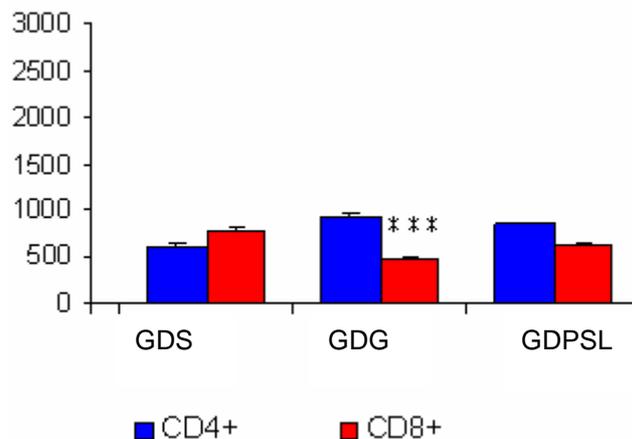


FIGURA 19 - Relação CD^{4+}/CD^{8+} em sangue total nos diferentes grupos

A quantificação das células CD^{4+} do grupo teste foi superior ($p < 0,001$) quando comparada com as taxas de CD^{8+} do respectivo grupo.



GDS: diabético gavagem salina; GDG: diabético gavagem L-glutamina; GDPSL: diabético gavagem proteína do soro do leite
*** $p < 0,001$ comparado com CD^{4+} Student t Test em 8 ratos por grupo (Média \pm E.P.M)

FIGURA 20 - Relação na contagem de linfócitos CD^{4+} e CD^{8+} nos diferentes grupos.

Ocorreu aumento significativo ($p < 0,001$) nas concentrações de glutatona no soro dos ratos do grupo teste (GDG) quando comparado com as concentrações registradas no grupo PSL (GDPSL) e controle (GDS); o grupo PSL (GDPSL) apresentou níveis elevados de glutatona frente ao controle (GDS). Observou-se também que o grupo não diabético (GND) apresentou-se estatisticamente diferente do grupo diabético (GD).

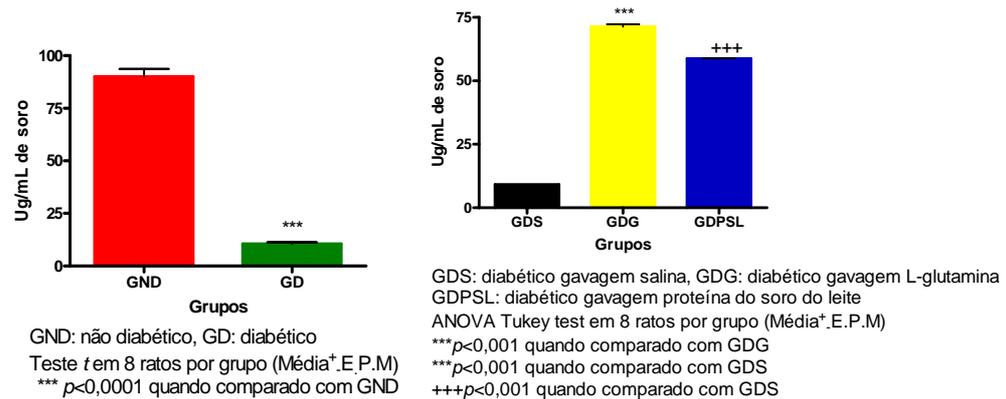


FIGURA 21 - Concentração de Glutaciona em Ug/mL no soro de ratos machos Wistar

Ocorreu aumento significativo ($p < 0,001$) nas concentrações de glutaciona no pâncreas dos ratos do grupo PSL (GDPSL) quando comparado com o grupo teste (GDG). O grupo teste apresentou aumento significativo ($p < 0,001$) nas concentrações de glutaciona quando comparado com o controle (GDS). Observaram-se diferenças significantes ($p < 0,001$) quando comparados os grupos não diabéticos (GND) com diabéticos (GD).

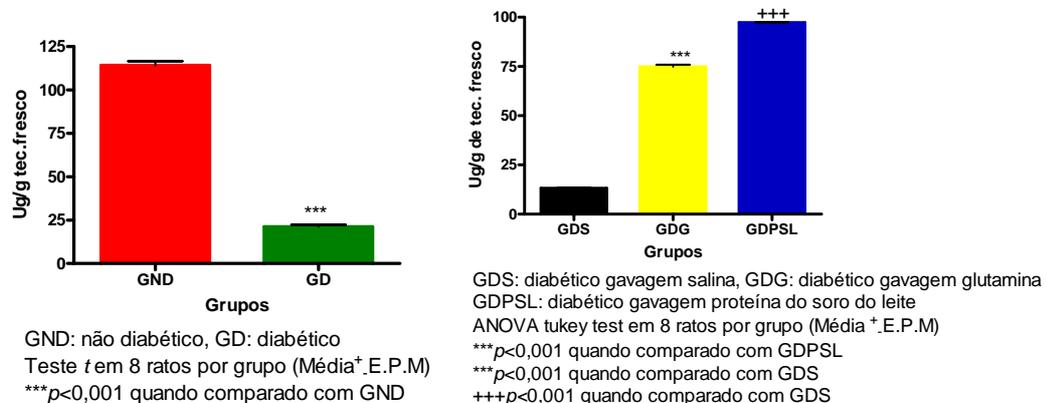


FIGURA 22 - Concentração de Glutaciona em Ug/g de tecido pancreático de ratos machos Wistar.

Ocorreu aumento significativo ($p < 0,001$) nas concentrações de glutaciona no tecido renal do grupo teste (GDG) quando comparado com os grupos PSL (GDPSL) e o controle (GDS). Observaram-se diferenças significantes nas concentrações de glutaciona quando comparados os grupos controle (GDS) com PSL (GDPSL), não diabético (GND) com diabético (GD), respectivamente.

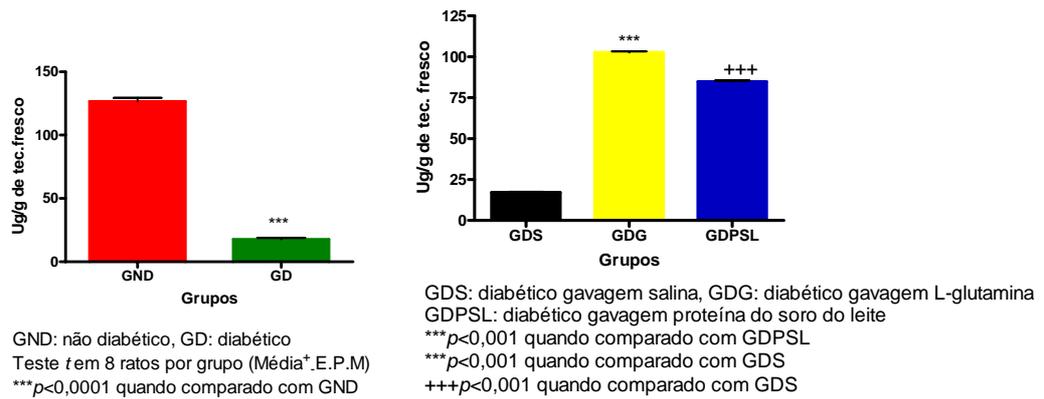


FIGURA 23 - Concentração de Glutaciona em Ug/g de tecido renal de ratos machos Wistar.

Houve aumento significativo ($p<0,001$) nas concentrações de glutaciona do grupo teste (GDG) quando comparado com o grupo PSL (GDPSL) e com o controle (GDS) no tecido adiposo. Os níveis de glutaciona do grupo PSL (GDPSL) mostraram-se superiores quando comparados com o controle (GDS). Observou-se ainda que os níveis de glutaciona no tecido adiposo do grupo não diabético (GNDI) apresentaram uma diferença estatística ($p<0,0001$) quando comparados ao grupo diabético (GD).

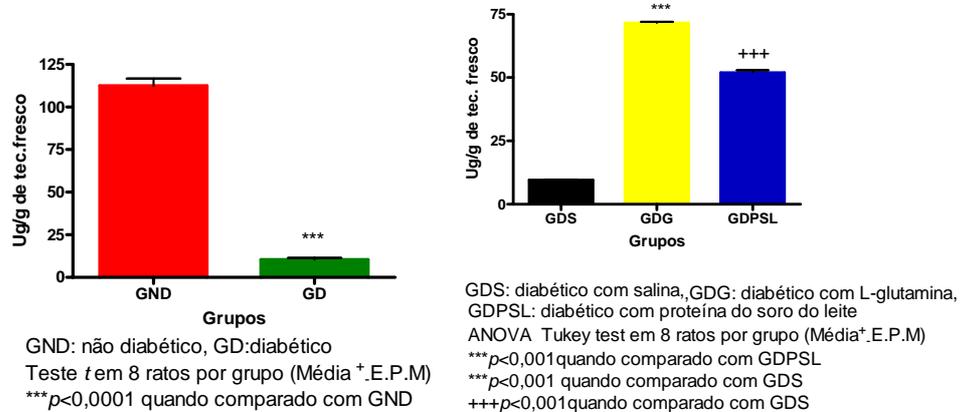


FIGURA 24- Concentração de Glutaciona em Ug/g de tecido adiposo de ratos machos Wistar.

Houve aumento significativo ($p<0,001$) nas concentrações de glutaciona na musculatura esquelética do grupo teste (GDG) quando comparado com os grupos PSL (GDPSL) e controle (GDS). O grupo PSL (GDPSL) mostrou-se estatisticamente diferente ($p<0,001$) do grupo controle (GDSI). Observou-se ainda que as concentrações de glutaciona na musculatura esquelética dos representantes do grupo não diabético (GND) foram superiores às concentrações do grupo diabético (GD).

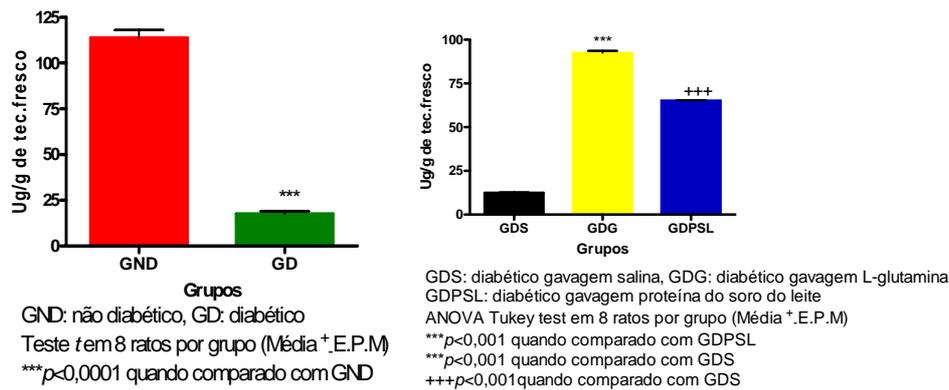


FIGURA 25 - Concentração de Glutathione em Ug/g em tecido da musculatura esquelética de ratos machos Wistar.

Observou-se aumento significativo ($p<0,001$) nas concentrações de glutathione no tecido hepático do grupo teste (GDG), quando comparado com o grupo PSL (GDPSL) e o controle (GDS). O grupo PSL (GDPSL) apresentou-se estatisticamente diferente do controle (GDS). Observou ainda diferenças significantes ($P<0,0001$) quando comparados os grupos não diabético (GND) com o grupo diabético (GD).

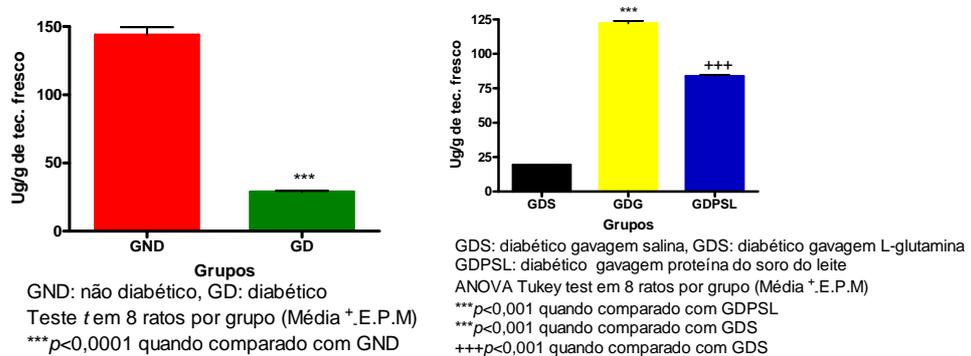


FIGURA 26 - Concentração de Glutathione em Ug/g de tecido hepático de ratos machos wistar

Observou-se uma redução significativa ($p<0,001$) nas concentrações de MDA no soro do grupo teste (GDG) quando comparado com o grupo PSL (GDPSL) e controle (GDS) respectivamente. O grupo PSL (GDPSL) apresentou-se estatisticamente diferente do grupo controle (GDS). Observou-se uma redução significativa ($p<0,0001$) nos níveis de MDA no soro do grupo não diabético (GND) quando comparado com o grupo diabético (GD).

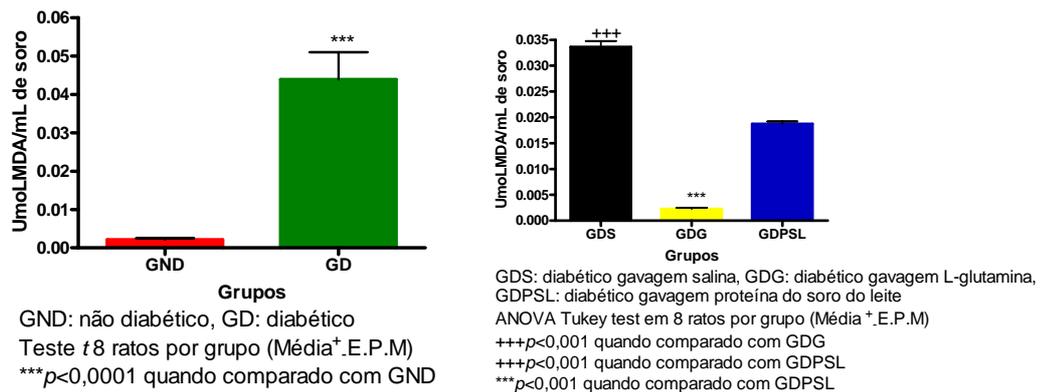


FIGURA 27 - Concentração de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{MDA}/\text{mL}$) no soro de ratos machos Wistar

Ocorreram reduções semelhantes nas concentrações de MDA pancreático tanto nos ratos do grupo teste (GDG) como nos ratos do grupo PSL (GDPSSL).

Ocorreram reduções significantes ($p < 0,001$) nas concentrações de MDA pancreático do grupo teste (GDG) quando comparado com o controle (GDS), e no grupo PSL (GDPSSL) quando comparado com o controle (GDS). Observou diferenças estatísticas ($p < 0,0001$) quando comparado os grupos não diabético (GND) com diabético (GD).

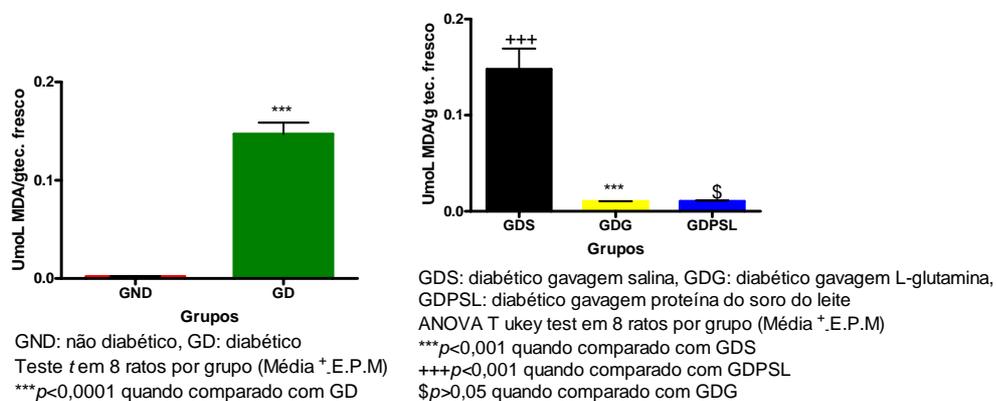


FIGURA 28 - Concentração de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{MDA}/\text{g}$) em tecido pancreático de ratos machos wistar

Ocorreram reduções significantes ($p < 0,001$) nas concentrações de MDA no tecido renal do grupo teste (GDG) quando comparado o controle (GDS) com o grupo teste (GDG) e PSL (GDPSSL) respectivamente. Diferenças estatísticas foram observadas quando comparados os grupos não diabético (GND) com o grupo diabético (GD). Não observou diferenças significantes nas concentrações de TBARS do grupo teste (GDG) quando comparado com o grupo PSL (GDPSSL).

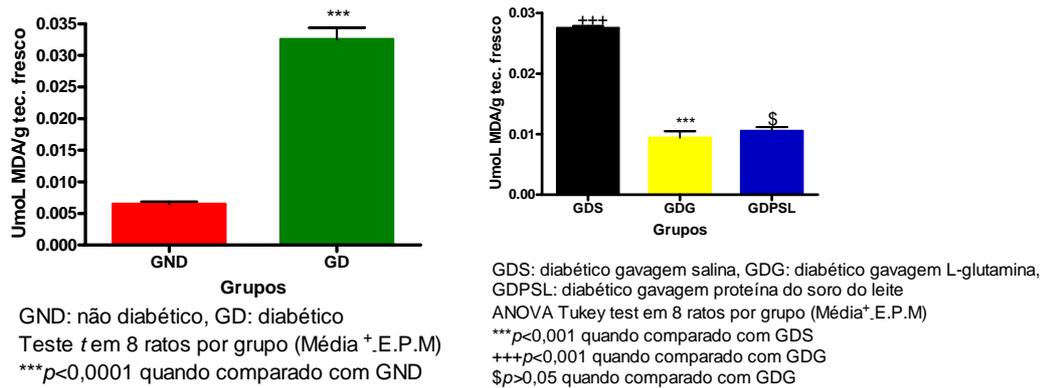


FIGURA 29 - Concentração de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{MDA}/\text{g}$) em tecido renal de ratos machos wistar

Houve redução significativa ($P < 0,001$) nas concentrações de MDA no tecido adiposo do grupo teste (GDG) quando comparado com as concentrações dos grupos PSL (GDPSL) e controle (GDS) respectivamente. O grupo PSL (GDPSL) apresentou-se estatisticamente diferente do grupo controle (GDS). As concentrações de MDA do tecido adiposo do grupo não diabético (GNDI) apresentaram estatisticamente menores ($p < 0,0001$) que as do grupo diabético (GD).

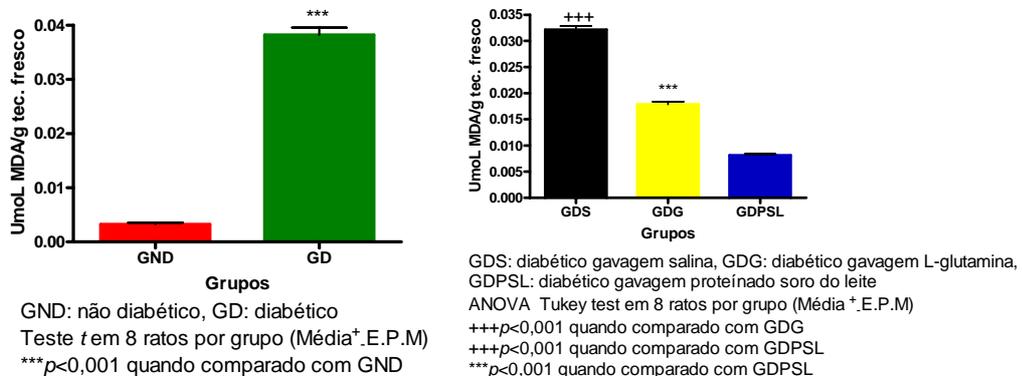


FIGURA 30 - Concentração de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{MDA}/\text{g}$) em tecido adiposo de ratos machos wistar

Observou-se uma redução significativa ($p < 0,001$) nas concentrações de MDA na musculatura esquelética do grupo teste (GDG) quando comparado com os grupos PSL (GDPSL) e controle (GDS) respectivamente. O grupo PSL (GDPSL) apresentou-se estatisticamente diferente do controle (GDS). Observou-se uma redução significativa ($p < 0,0001$) nos níveis de MDA na musculatura esquelética do grupo não diabético (GND) quando comparado com o grupo diabético (GD).

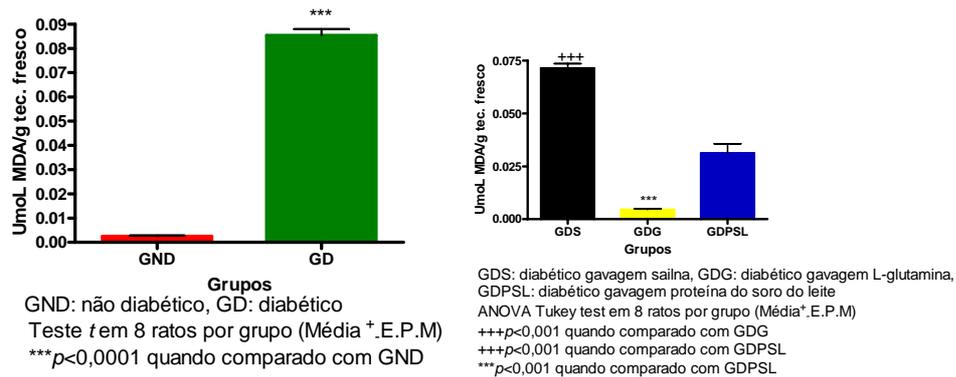


FIGURA 31 - Concentração de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{MDA}/\text{g}$) em tecido da musculatura esquelética de ratos machos wistar

Ocorreu redução significativa ($p < 0,001$) nas concentrações de MDA, no tecido hepático dos ratos pertencentes ao grupo teste (GDG) quando comparados com os ratos pertencentes ao grupo PSL (GDPSL) e controle (GDS) respectivamente; o grupo PSL (GDPSL) apresentou-se estatisticamente diferente do grupo controle (GDS). Observou-se uma redução significativa ($p < 0,0001$) nos níveis de MDA no tecido hepático do grupo não diabético (GND) quando comparado com o grupo diabético (GD).

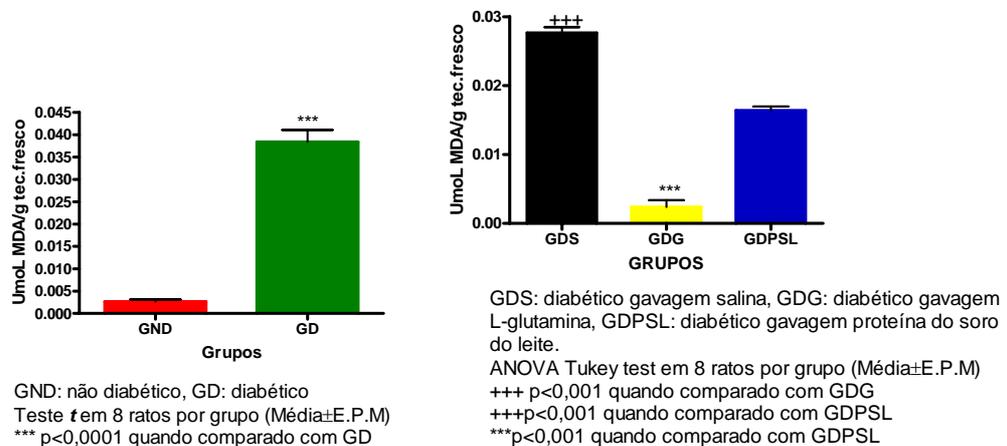


FIGURA 32 - Concentração de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{MDA}/\text{g}$) em tecido hepático de ratos machos wistar

5 DISCUSSÃO

O rato foi o animal de experimentação escolhido para esse estudo. Trata-se de um mamífero de baixo custo de manutenção, apresenta elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico (FESTING, 1979).

O éter dietílico foi o anestésico utilizado pela facilidade de uso com um mínimo de equipamento, apesar de suas conhecidas desvantagens: indução de salivagem excessiva, irritação do epitélio respiratório. Sabe-se que vários anestésicos, entre os quais citam-se o éter dietílico, o halotano e o óxido nitroso, podem desencadear a formação de radicais livres no fígado. A exposição do rato a uma mistura de óxido nitroso a 50% durante 15 minutos não alterou a função mitocondrial do rato (VAN JAARSVELD *et. al.*, 1991).

Liu *et. al.* (1993) demonstraram que tanto o jejum pré-operatório como a anestesia por inalação de vapores do éter dietílico agravam o estresse oxidativo em ratos Wistar adultos, ressaltando que esses efeitos são independentes e aditivos. No estudo, o aumento do estresse oxidativo e a depleção da glutatona hepática e renal foram diretamente proporcionais à duração da anestesia. (LIU *et. al.*, 1993).

Utilizou-se, no presente estudo, a anestesia por inalação do éter dietílico em todos os animais, precedida por um jejum de 12 horas. Os procedimentos cirúrgicos foram de curta duração (15 minutos), o que minimizou a incidência das complicações. O fato de todos os grupos de animais (controle e de estudo) terem recebido a mesma modalidade de anestesia torna o viés de induzir estresse oxidativo não relevante.

Optou-se, neste estudo, por utilizar um modelo de rato diabético induzido por aloxano, através de uma injeção intraperitonal a uma concentração de 140mg/kg de peso corporal em 50mM preparada em tampão citrato a um pH 3,0 (ZARROW, 1964).

Segundo Lee *et. al.* (2006), o aloxano é uma droga inibidora seletiva da enzima *O-N*-acetil-glucosamina transferase (OGT), enzima esta que atua sobre o monossacarídeo *N*-acetilglucosamina presente tanto no núcleo como no citoplasma

das células β -pancreáticas (LEE *et. al.*, 2006). As células β -pancreáticas são ricas em OGT esta enzima promove a glicosilação da glicose do espaço extracelular com a proteína intracelular (*N*-acetilglucosamina) (LIU *et. al.*, 2000), a inibição da atividade da enzima OGT pelo aloxano leva a morte das células β -pancreáticas, por fragmentação do seu DNA nuclear, ocasionando um dano na produção de insulina (KONRAD; JANOWSKI; KUDLOW, 2000; RAMACHANDRAN *et. al.*, 2004).

O Diabetes Mellitus (DM) é um dos mais importantes problemas mundiais de saúde na atualidade e o pé diabético constitui uma de suas complicações mais prevalentes (CARVALHO *et. al.*, 2004).

Parte deste estudo (experimentos 1 e 2) avaliou a ação antibacteriana tanto *in vitro* como *in vivo* de soluções de óleos essenciais das espécies de *Lippia aff gracilis* e *Lippia gracilis* frente a modelos de ratos Wistar machos diabéticos com membro pélvico infectado por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de úlceras de pacientes com pé diabético.

Pascual *et. al.* (2000), mostraram que a análise fitoquímica do gênero *Lippia* spp registrou um alto teor de compostos fenolíticos principalmente uma mistura de Timol e Carvacrol, dois terpenos fenolíticos dotados de fortíssima atividade antibacteriana (PASCUAL *et. al.*, 2000).

Bassole *et. al.* (2003), mostraram em seus estudos com óleos essenciais extraídos das folhas das espécies de *Lippia chevalieri* e *Lippia multiflora* que este apresentou elevado percentual de constituintes fenolíticos e uma potente atividade antimicrobiana frente a diferentes espécies e gêneros bacterianos (BASSOLE *et. al.*, 2003) .

No presente estudo, analisados os quadros 1 e 2, constatou-se que o constituinte Carvacrol foi o majoritário na análise fitoquímica realizada pela técnica de CG-MS (Cromatografia Gasosa acoplado a Espectro de Massa) dos óleos tanto de *Lippia aff gracilis* como de *Lippia gracilis*. Segundo Burdavari e Neil (1989), a atividade antimicrobiana do Carvacrol já é bem reportada (BUDAVARI; NEIL, 1989). Estudos realizados por Kunle *et. al.* (2003), mostraram que o constituinte Carvacrol isolado de um extrato de *Lippia multiflora* apresentou alta atividade *in vitro* contra

cepas de *Pseudomonas aeruginosas* e *Candida albicans* (KUNLE *et. al.*, 2003). Já Iraj e Seyed (2003), mostraram que constituintes de natureza fenolítica como o Carvacrol e o Timol quando presentes, na composição de um determinado óleo essencial contribuem em 75% com o seu potencial antimicrobiano (IRAJ; SEYED, 2003).

As tabelas 1 e 4 (ensaios *in vitro*), mostraram as formações de halos de inibição de crescimento bacteriano (*Staphylococcus aureus*) superiores aos halos formados pela droga controle dos óleos essenciais nas concentrações de 5%.

Lemos *et. al.* (1990), relataram em seus estudos uma atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia sidoides* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) com formação de um halo de inibição de crescimento superior a 12mm, mostrando o alto potencial antimicrobiano das diferentes espécies de *Lippia* (Lemos *et. al.*, 1990).

Segundo Motta Neto *et. al.* (2003), os *Staphylococcus aureus* são os agentes bacterianos mais isolados em úlceras de pé diabético; baseados nestes achados e no alto grau de resistência a diferentes agentes antimicrobianos desenvolvida por esta espécie bacteriana é que optou-se por avaliar o potencial de ação *in vivo* da menor diluição dos óleos essenciais extraídos das espécies de *Lippia aff gracilis* e *Lippia gracilis* (MOTTA NETO *et. al.*, 2003).

Oladimeji *et. al.* (2000), relataram em seus estudos o alto potencial dos óleos essenciais das espécies de *Lippia* nas formulações e emulsões farmacêuticas de uso tópico. Já Deans e Ritchie *et. al.* (1987) mostraram o alto potencial antimicrobiano das diferentes espécies de *Lippia* ; sugerindo assim sua aplicação tanto nas formulações farmacêuticas como na preservação e conservação de alimentos (DEANS; RITCHIE, 1987).

O modelo experimental *in vivo* deste estudo foi realizado utilizando uma solução a 5% dos óleos tendo como veículo o Dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% preparado previamente em soro fisiológico estéril. A administração das suspensões foi por via subcutânea em membro pélvico esquerdo de ratos diabéticos e

ocorreram em dois momentos ; um logo após administração do inóculo bacteriano (*S.aureus*) padronizado e o outro após 24 horas da administração do mesmo.

O Dimetilsulfóxido (DMSO), é um composto químico dotado de marcante capacidade solvente e pode atravessar rapidamente as membranas biológicas. Estas características o tornam o solvente de escolha, nos estudos experimentais, para a administração de substâncias hidrofóbicas (VARMA et al., 1987). Concentrações variáveis (2% a 3%) foram utilizadas por SOUZA (1993), RAO et. al. (1997), SOUZA et. al. (1999) e RAO et. al. (2003).

O uso da solução de DMSO a 2%, utilizada como diluente no preparo das soluções tanto dos óleos essenciais como do inóculo bacteriano, motivou o estudo pois, além de ser um excelente diluente o mesmo não apresentou em nenhum momento ação bactericida frente a cepa de *Staphylococcus aureus* quando testado na realização do estudo piloto *in vitro*.

Unidades Formadoras de Colônias (UFC) é um termo utilizado na microbiologia para a quantificação de uma determinada espécie bacteriana (MURRAY et. al., 1999). A quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), foi realizada baseando-se na metodologia proposta por Ridley e colaboradores em 1964.

As tabelas 2 e 5, referentes às atividades antibacterianas das soluções dos óleos administradas simultaneamente, mostraram uma redução significativa nas UFC/mL quando comparados os grupos 4 (teste) com os grupos 3 (controle positivo) ($p < 0,001$). Resultados semelhantes também foram observados quando analisadas as tabelas 3 e 6, em que foram avaliadas as ações antibacterianas após 24h de intervalo entre a administração do inóculo e da suspensão de óleo. Ambos os óleos essenciais, utilizados no presente estudo, induziram redução no número de colônias (UFC/mL) nos tecidos infectados por *Staphylococcus aureus*.

Um dos fatores associados à redução da atividade bactericida das células de defesa são as elevadas taxas de glicose plasmática (SOUZA et. al., 2007). Lipopolissacarídeos (LPS) são macromoléculas presentes nas paredes de bactérias Gram negativas, estas por sua vez, quando inoculadas na cavidade peritonial de

animais, provocam uma intensa atividade inflamatória, culminando, assim, na proliferação de células do tipo polimorfonucleares. Estudos realizados por Souza *et. al.* (2007), envolvendo a inoculação de LPS na cavidade peritoneal de ratos diabéticos, mostraram uma menor proliferação destas células, quando comparados com o grupo de ratos não diabéticos (SOUZA *et. al.*, 2007).

Níveis elevados de glicose reduzem consideravelmente a produção de interleucina -1 (IL-1) em macrófagos de ratos (HALL *et. al.*, 1999). Zanardo *et. al.* (2003), realizando estudo em uma população de ratos diabéticos, mostraram que o estado hiperglicêmico reduz de uma forma significativa a migração leucocitária, promovendo assim uma maior complicação do estado infeccioso (ZANARDO *et. al.*, 2003).

Estudos realizados por Molne, Verdrengh e Tarkowski (2000), envolvendo cultivo de tecido subcutâneo infectado por *Staphylococcus aureus*, realizado em grupos de ratos Wistar normais, mostraram que a redução do número de colônias isoladas após cultura tecidual dá-se pela ação do próprio sistema imunológico do animal e que com o passar do tempo o número de colônias tendem a diminuir (MOLNE; VERDRENGH; TARKOWSKI, 2000).

Mandrup *et. al.* (1987) relataram em seus estudos que o estado de hiperglicemia leva a alterações nas células de defesa principalmente no que se refere as ações de quimiotaxia e fagocitose (MANDRUP *et. al.*, 1987). Marhoff *et. al.* (1992), relataram que estas alterações celulares presentes principalmente nas células da linhagem neutrofílica devem-se as modificações nas estruturas protéicas causadas pela alta condição hiperglicêmica, este fato foi também comprovado por Seidel *et. al.* (2003), em estudo realizado com grupos de ratos diabéticos e não diabéticos onde mostraram que a própria condição de diabetes aumenta de uma forma significativa a prevalência dos mesmos apresentarem infecções respiratórias (MARHOFF *et. al.*, 1992; SEIDEL *et. al.*, 2003).

Nesse estudo os animais no início dos experimentos apresentaram uma média glicêmica em torno de 179mg/dL, fato este que deve ter contribuído para a manutenção da população bacteriana (experimentos 1 e 2), quando se processaram as contagens de UFC/mL nos representantes dos grupos 3 (controles positivos).

Segundo Pascual *et. al.* (2000), em seu trabalho de revisão em que relataram o uso tradicional das características químicas e farmacológicas de diferentes óleos essenciais extraídos de diferentes espécies de *Lippia*, mostraram que óleos essenciais à base de constituintes fenolíticos exercem um efeito pró-inflamatório potente, com intensa lesão tecidual (PASCUAL *et. al.*; 2000). Baseados nestes achados é que optou-se por realizar os testes *in vivo* utilizando a menor diluição que apresentasse uma ação antibacteriana frente a cepa testada de *Staphylococcus aureus*.

Baseados nos resultados positivos com relação à eficácia antibacteriana das soluções a 5% dos óleos essenciais de *Lippia aff gracilis* e *Lippia gracilis* foram realizados, em paralelo ao cultivo e contagem bacteriana (UFC/mL) do tecido infectado, a análise histopatológica semi-quantitativa do tipo não-cego dos fragmentos teciduais infectados, os parâmetros criados segundo protocolo próprio estabelecido pelo observador foram os seguintes; presença de processo inflamatório, caracterizados como leve (+), moderado (++) e intenso (+++).

Analisando a tabela 7 observa-se que nos grupos 4 (G-4) (teste) os graus de processos inflamatórios presentes foram leve. Nos grupos 2 (G-2) (controle negativo); que avaliaram as ações das soluções no que se refere à presença ou ausência de um efeito pró-inflamatório, constatou-se também um grau leve (+)., Estes resultados devem-se ao próprio trauma causado no ato da inoculação das soluções por via subcutânea. Analisando os grupos 3 (G-3) (controle positivo) constataram-se um processo inflamatório de natureza intensa (+++), resultados estes já esperados.

Experimentos realizados por Akula *et. al.* (2003) em ratos diabéticos, comprovaram através de estudos histopatológicos que o tempo de diabetes tem uma influência direta no surgimento de necrose no miocárdio isto é; após 12 semanas de diabetes observaram um extenso foco de necrose no tecido do miocárdio destes animais (AKULA *et. al.*, 2003).

Na outra parte deste estudo (experimento 3) foi avaliado o potencial imunomodulador e antioxidante de soluções de L-glutamina (L-Gln), em ratos diabéticos. Para a realização deste experimento o mesmo modelo de ratos diabéticos aloxano induzido foi utilizado, onde a administração das soluções foram

feitas por gavagem em um período de trinta dias consecutivos utilizando-se água destilada como veículo no preparo.

A glutamina é o mais abundante aminoácido do corpo, atua como precursor na síntese de substâncias como purinas, pirimidinas, glucosamina e NAD⁺, e como precursor da uréia e glicose no fígado. Pode ser sintetizada pelo tecido muscular, porém é considerado um aminoácido condicionalmente essencial durante uma situação de estresse. Diante do estresse metabólico ocorre aumento significativo do consumo endógeno deste aminoácido. O balanço entre sua síntese e degradação torna-se negativo na condição de diabetes (MOORMAN *et. al.*, 1994). A concentração de glutamina (dose nutracêutica) utilizada no estudo foi de 0,7g/kg, dada a baixa solubilidade da mesma em solução aquosa.

As proteínas do soro do leite (PSL) têm sido apontadas como nutrientes portadores de atividade funcional, capazes de modular algumas respostas fisiológicas do organismo animal. Evidências fornecidas por estudos realizados em diferentes modelos experimentais, utilizando PSL, têm comprovado sua eficácia na modulação orgânica, como no aumento ao combate a infecções e processos inflamatórios, ação antibacteriana e antiviral, estímulo da absorção e função intestinal, aumento da síntese de hormônios, ação anticancerígena, além do efeito citoprotetor a partir da promoção da síntese de glutathione (GSH) (BOUNOUS; GOLD, 1991; BOUNOUS *et. al.*, 1993; FONSECA; FONSECA; BRANDÃO, 1999; BRINK, 1997).

O PSL neste experimento serviu como fonte de comparação com o grupo que fez uso de L-Gln (teste), por tratar-se de uma proteína íntegra dotada de características iso-protéica e iso-calórica, em relação ao aminoácido L-glutamina.

A causa do aumento na produção de radicais livres no diabetes é multifatorial; a hiperglicemia é apenas um dos fatores. Baynes (1991), concluíram que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na condição diabetes está associada com o aumento das alterações químicas nos lipídeos e proteínas e que a glicemia elevada leva tanto a glicação protéica como a oxidação lipídica promovendo a formação de ROS (BAYNES, 1991). No presente estudo observou-se uma redução significativa nas taxas glicêmicas no final do experimento quando comparados o grupo que fez

uso de PSL ($p < 0,05$) com o controle. Porém, as concentrações glicêmicas não apresentaram diferenças significantes quando comparados os grupos teste (L-Gln) com o grupo controle. Achado semelhantes foram relatados por Akimoto *et. al.* (2000), que mostraram o aumento nos níveis de glicose plasmática após administração de solução de L-Gln em ratos diabéticos (AKIMOTO *et. al.*, 2000).

Pidaran e Leelavinothan (2006) mostraram que o uso oral de 80mg/kg/dia de uma solução de tetrahidrocurcumim em ratos diabéticos por um período de 45 dias reduziu consideravelmente a glicemia plasmática. Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa *et. al.* (2006), demonstraram que o composto sintético difenil diselenídeo, constituído de selenium dotado de propriedades antioxidantes, administrado em ratos Wistar diabéticos por via intravenosa na dosagem de 45mg/kg por 90 dias, também promoveu redução significativa nas taxas glicêmicas (BARBOSA *et. al.*, 2006). Estudo clínico realizado por Alves *et. al.* (2003), em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores, mostrou que a L-alanil-glutamina quando administrada por via endovenosa induz a redução da glicemia (ALVES *et. al.*, 2003).

Estudos realizados por Malaisse *et. al.* (1982) mostraram que a glutamina quando combinada com outros aminoácidos leva ao aumento da produção de ATP (adenosina trifosfato) desencadeando o processo de secreção de insulina, promovendo a redução da glicemia plasmática (MALAISSE *et. al.*, 1982).

Resultados semelhantes foram observados por Calbet e Maclean (2002), que mostraram que a ingestão de soluções contendo proteínas do soro do leite aumentam significativamente as concentrações de insulina plasmática (CALBET; MACLEAN, 2002).

Linfócitos, macrófagos e neutrófilos, são importantes células que estão envolvidas na resposta imune. A L-Gln é um aminoácido essencial vital para a execução das funções normais dos linfócitos. Estudos realizados por Misra, Duguid e Marliss (1996) com ratos diabéticos, mostraram que a administração de uma determinada droga com ação anti-glutamina promoveu a progressão da doença.

Experimentos *in vitro* com macrófagos, realizados por Newsholme *et. al.* (1990), mostraram que na administração de um inibidor de glutaminase a estas populações de células antes de serem expostas a um grupo de ratos apresentando pancreatite de células β , estas perderam de uma forma significativa a sua capacidade lítica. Evidenciaram também, que a utilização de L-Gln pelos macrófagos e linfócitos é aumentada na rota dos processos patogênicos e que a mesma atua ativando a produção de citocinas, óxido nítrico e superóxido, intensificando assim o processo físico de fagocitose (NEWSHOLME *et. al.*, 1999).

No presente estudo a gavagem diária de L-glutamina promoveu elevação nas populações de células CD⁴⁺; não foram observadas diferenças significantes quando comparados os grupos teste (GDG) com o grupo que fez uso de PSL (GDPSL).

Grupta (1984) mostrou que a própria condição de diabetes leva a uma diminuição do número de linfócitos (GRUPTA, 1984). Estudos realizados por Pozzilli *et. al.* (1986) revelaram que as alterações nas populações de linfócitos CD⁴⁺ são bem comuns em situações de diabetes (POZZILLI *et. al.*, 1986).

Grupta (1984) mostrou que a administração de insulina melhora de uma forma significativa o nível da população de linfócitos, e que esta parece atuar de uma forma certa e eficaz nos receptores de células T, isto é, a insulina, após interagir com estes receptores de membrana, estimula os transportadores de glicose facilitando a entrada do carboidrato para o interior da célula, exercendo ainda uma ação anabólica sobre o metabolismo protéico inibindo a proteólise, e suprimindo a liberação e oxidação dos aminoácidos essenciais (GRUPTA, 1984). No presente estudo não houve administração de insulina.

Segundo Mandrup, Bendtzenk e Dinarello (1987), as populações de leucócitos de um modo geral são afetadas no diabetes; estas células estão associadas com a resposta imunológica do organismo contra infecções atuando como uma barreira de proteção contra patógenos exteriores. Pacientes diabéticos apresentam uma perda funcional nos mecanismos de defesa atribuídos a estas células tais como, quimiotaxia, adesão e fagocitose (MANDRUP; BENDTZENK; DINARELLO, 1987).

Estudos *in vitro* em macrófagos de ratos realizados por Parry-Billings *et. al.* (1990), demonstraram que a atividade de fagocitose destas células esta diretamente relacionada com a concentração de L-Gln fornecida ao meio (PARRY-BILLINGS *et. al.*, 1990). Já Juretic, Spagnoli e Hoic (1994), mostraram que a L-Gln atua como ativador de células natural *Killer* promovendo a lise do agente agressor (JURETIC; SPAGNOLI; HORIG, 1994).

Estudos realizados por Tsiavou *et. al.* (2005), mostraram que pacientes com diabetes apresentaram uma redução na capacidade de produzir interferon gama (IFN- γ) acarretando assim, uma diminuição na produção de linfócitos T das linhagens CD⁴⁺ e CD⁸⁺ (TSIAVOU *et. al.*; 2005).

Newsholme *et. al.* (1999), mostraram que a L-Gln fortalece a capacidade funcional das células linfocíticas. Calder (1994), mostraram que este aminoácido promove a proliferação de linfócitos bem como a produção de IL-2 (NEWSHOLME, *et. al.*, 1999; CALDER, 1994).

Estudos *in vitro* realizados por Wilmore e Shabert (1998) mostraram que a L-Gln é de fundamental importância nas culturas de células mononucleares como os linfócitos CD⁴⁺ pois a mesma fornece energia vital para a proliferação celular, atuando como fonte de nitrogênio que é de crucial importância para a síntese de constituintes intermediários (WILMORE; SHABERT, 1998).

Newsholme *et. al.* em trabalhos realizados no ano de 1999, definiram que a relação de linfócitos CD⁴⁺/CD⁸⁺ é muito utilizada para a avaliação do estado de imunodeficiência (NEWSHOLME *et. al.*, 1999).

Analisando a relação CD⁴⁺/ CD⁸⁺ , observou que o grupo que fez uso de L-Gln apresentou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) quando comparado com os demais; mostrando assim a eficácia da L-Gln como aminoácido imunonutriente, reforçando mais ainda o seu uso nas situações de imunodeficiência tais como nos hospedeiros com diabetes.

Os sistemas antioxidantes dos organismos vivos dependem da atividade de enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase), macromoléculas

(albumina, ceruloplasmina, ferritina) e pequenas moléculas (ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, glutathiona reduzida, ácido úrico, bilirrubina) para pleno exercício de sua atividade protetora. A capacidade antioxidante total dos líquidos extracelulares representa o somatório da ação dos antioxidantes endógenos e de antioxidantes exógenos, provenientes da alimentação ou de oferta de drogas antioxidantes. (GHISELLI *et. al.*, 2000).

No presente estudo, foram avaliadas as concentrações *in vivo* de Glutathiona reduzida (GSH) e TBARS (expressos em μmol MDA/g tecido fresco e MDA/mL soro) no soro e nos tecidos pancreático, adiposo, músculo esquelético, renal e hepático respectivamente.

O teste com ácido tiobarbitúrico (TBA) foi introduzido por Kohn e Liversedge em 1944 e ainda é um dos métodos mais utilizados para a medida da peroxidação lipídica (CHIRICO, 1994). O malonaldeído (MDA), também conhecido como aldeído malônico ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$) é um aldeído de cadeia curta, resultante da decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos (BONNES; GUÉRIN, 1992). Trabalhos científicos utilizando a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na avaliação dos índices de peroxidação lipídica, em modelos experimentais de ratos diabéticos, estão disponíveis na literatura médica (ÇAKATAY *et. al.*, 2004).

No presente estudo as concentrações de TBARS (expressos em μmol MDA/g) encontrados nos tecidos pancreáticos foram similares aos encontrados no tecido renal. Já no tecido adiposo observou-se uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) nas concentrações de TBARS do grupo representante de L-Gln quando comparado com o grupo controle; neste tecido as concentrações de TBARS encontradas nos representantes do grupo que fizeram uso de PSL foram inferiores as concentrações encontradas no grupo teste ($p < 0,001$). No músculo esquelético, observou-se que as concentrações de TBARS foram inferiores no grupo que fez uso de L-Gln, apresentando uma significância estatística ($p < 0,001$). Quando comparado este grupo com o controle e com o grupo PSL respectivamente. Resultados semelhantes foram observados nas análises das concentrações de TBARS dos tecidos hepáticos e soro.

O diabetes acarreta dano mitocondrial a nível de células pancreáticas, levando a produção de radicais livres com efeito pró-oxidante (SCHRAUWEN; HESSELINK, 2004). Estudos realizados por Çakatay *et. al.* (2006), mostraram que ratos diabéticos induzidos apresentaram níveis de TBARS elevados no soro, pâncreas e fígado após uma semana de indução (ÇAKATAY *et. al.*, 2006).

Vários estudos com modelos de ratos diabéticos relatam o aumento mitocondrial de malonaldeído (MDA) substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e lipídios hidroperóxidos; contribuindo de uma forma significativa no surgimento das complicações do diabetes (KAYALI *et. al.*, 2004). A concentração de TBARS foi avaliada através da quantificação de malonaldeído em μmol . Analisando-se os resultados observou-se que as taxas de MDA/g no tecido pancreático do grupo teste foram inferiores ao grupo controle ($p < 0,001$), porém; não apresentaram nenhuma diferença quando comparado com o grupo que fez uso de PSL.

Jang *et. al.* (2000), em seus estudos observaram um aumento de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico a nível hepático em ratos diabéticos após oito semanas de indução (JANG *et. al.*; 2000). Já estudos comparativos realizados por Çakatay *et. al.* (2004), mostraram que ratos com apenas uma semana de diabetes apresentaram uma concentração de agentes oxidantes a nível de fígado, pâncreas e rins bem maior que o grupo com oito semanas de indução (ÇAKATAY *et. al.*, 2004).

Latha e Pari (2004), mostraram que extratos das folhas de *Scoparia dulcis*, quando administrados a ratos diabéticos por via gavagem promoveram uma redução significativa nas concentrações de TBARS do soro (LATHA; PARI, 2004).

No presente estudo as concentrações de TBARS nos tecidos analisados foram superiores nos grupos diabéticos (GD) e inferiores nos grupos de ratos não diabéticos (GND) ($p < 0,001$) demonstrando a ação pró-peroxidação lipídica induzida pelo estado diabético.

A Glutathiona reduzida (GSH) é um tri-peptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína, distribuída em todas as células do organismo humano e animal. Desempenha função metabólica como antioxidante celular protegendo contra efeitos deletérios de radicais livres, xenobióticos e como substrato para a enzima glutathiona

peroxidase (selênio dependente), com ação desintoxicante sobre o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos (BRINK, 1996).

No presente estudo foram determinadas as concentrações de GSH no soro e nos tecidos pancreáticos, renal, adiposo, esquelético e hepático de ratos diabéticos submetidos a uma suplementação diária de L-Gln por 30 dias.

Estudos realizados por Barbosa *et. al.* (2006) mostraram um aumento significativo de GSH nos tecidos hepáticos, renais e soro de ratos diabéticos submetidos a uma suplementação diária de 1mg/kg via subcutânea de selenium por 90 dias (BARBOSA *et. al.*, 2006).

Pidaran e Leelavinothan (2006) mostraram em seus trabalhos que o uso do tetrahidrocurcumim administrados por via oral em modelos de ratos diabéticos estimularam a síntese de GSH nos tecidos hepáticos e renais (PIDARAN; LEELAVINOTHAN, 2006). Já Chaudhry *et. al.* (2006) mostraram o efeito antioxidante da tiazolidina (droga utilizada em pacientes diabéticos que apresentam resistência a insulina), em um grupo de ratos diabéticos e concluíram que o seu uso nas concentrações de 30mg/kg administradas diariamente por um período de 30 dias levou a uma elevação nas concentrações de GSH nos tecidos hepático, renal e pancreático (CHAUDHRY *et. al.*, 2006).

Razieh, Amin e Shirin (2007) mostraram que o uso do extrato da planta *Achillea santolina* nas concentrações de 0,1g/kg por 30 dias administrando em um grupo de ratos diabéticos apresentou fortes características antioxidantes, por promover um aumento nas concentrações de GSH no tecido pancreático do grupo teste (RAZIEH; AMIN; SHIRIN, 2007).

Nilufer *et. al.* (2006) investigaram o potencial antioxidante do extrato de folhas do *Vitis vinifera*, administrado em um grupo de ratos diabéticos por gavagem nas concentrações de 250 e 500mg/kg por um período de 15 dias. Nilufer *et. al.* (2006) observaram que as concentrações de GSH tanto a nível hepático como renal do grupo teste apresentaram superiores quando comparados ao grupo controle e que esse aumento nas concentrações de GSH foram independentes ao tipo de concentração administrada (NILUFER *et. al.*, 2006).

Neste estudo observou-se que as concentrações de GSH no tecido hepático do grupo que recebeu gavagem com L-Gln foram significativamente superiores ($p < 0,001$) quando comparadas com os valores de GSH encontrados no grupo controle e no grupo que fez uso de PSL, resultados similares foram observados quando comparados as concentrações de GSH no tecido renal ($p < 0,001$).

Os tecidos hepáticos e renais desenvolvem importantes papéis na homeostase da glutamina, atuando como órgãos tanto produtores como consumidores de glutamina (CURI, 2000).

O metabolismo hepático é influenciado por hormônios e nutrientes. Aminoácidos como glutamina e leucina desenvolvem um papel importante na resposta anabólica celular (KRAUSE *et. al.*, 2002).

Krause *et. al.* (2002), em seus estudos em ratos Wistar diabéticos mostraram que a glutamina aumentou consideravelmente a resposta anabólica hepática nesses animais (KRAUSE *et. al.*, 2002).

Estudos realizados por Squires *et. al.* (1997), mostraram que hepatócitos de ratos diabéticos quando colocados na presença de glutamina estimularam a produção de glutaminase bem mais que os hepatócitos de ratos normais (SQUIRES *et. al.*, 1997).

A glutaminase é uma importante enzima que atua no catabolismo da glutamina para a produção de glutamato, importante precursor de glutathione (GSH) (SQUIRES *et. al.*, 1997). O músculo esquelético atua como órgão de maior produção de glutamina, por esta razão, fatores que afetam o metabolismo desse tecido podem comprometer a concentração de glutamina no plasma (CURI, 2000). Estudos realizados por Onan *et. al.* (2005), avaliaram a demanda de glutamina na musculatura esquelética de ratos diabéticos, onde mostraram que o tipo de contração muscular se lenta (maior demanda) ou rápida (menor demanda) da fibra é que determina o transporte deste aminoácido (ONAN *et. al.*, 2005). Quantitativamente a glutamina é o maior aminoácido reserva presente na musculatura esquelética (CURTHOYS; WATFORD, 1995).

No presente estudo, as concentrações de GSH na musculatura esquelética do grupo L-Gln foram significativamente superiores ($p < 0,001$) às concentrações encontradas no controle e no grupo que fez uso de PSL.

Analisando as concentrações de GSH no tecido adiposo observou-se que as taxas encontradas no grupo teste foram superiores ($p < 0,001$) as encontradas tanto no grupo controle como no grupo que fez uso de PSL; Já no tecido pancreático as concentrações de GSH no grupo L-Gln foram superiores ($p < 0,001$) as concentrações encontradas no grupo controle. Observou-se que as concentrações de GSH no grupo que fez uso de PSL foram superiores ($p < 0,001$) as concentrações do grupo L-Gln, ressaltando a importância da PSL como mantenedora das concentrações de insulina plasmática; importante hormônio anti-catabólico protéico (CALBET; MACLEAN, 2002).

A aminoguanidina é um inibidor de reação de glicação; estudos realizados por Stoppa *et. al.* (2005), envolvendo a administração de aminoguanidina num grupo de ratos diabéticos submetidos a uma atividade física diária, mostraram que o grupo que fez uso deste composto tiveram um aumento significativo nas taxas de GSH no soro (STOPPA *et. al.*, 2005).

Salomão *et. al.* (2006), em estudos envolvendo clampeamento do hilo hepático de ratos Wistar por 30 minutos e reperusão por 5 minutos com administração de glutamina, observaram que a mesma melhorou de uma forma significativa a capacidade antioxidante total do soro destes animais (SALOMÃO *et. al.*, 2006).

No presente estudo foi observado que as concentrações de GSH no soro do grupo teste foram superiores ($p < 0,001$) as concentrações encontradas nos demais grupos diabéticos.

As concentrações de GSH encontradas no soro e nos tecidos (hepáticos, renais, pancreáticos, adiposo e esquelético) nos representantes do grupo (GD) ratos diabéticos, foram estatisticamente inferiores quando comparadas com os valores encontrados nos grupos de ratos não diabéticos (GNDI) ($p < 0,001$) possivelmente por maior utilização deste antioxidante no diabetes. Tanto a L-Gln como o PSL

promoveram proteção contra a peroxidação lipídica. Estudos realizados por Micke *et al*, 2001, mostraram que a suplementação com PSL a longo prazo aumentou os níveis de glutathiona plasmáticas em pacientes infectados pelo HIV (MICKE P., *et al* 2001).

Observou-se neste estudo que os óleos essenciais de *Lippia aff gracilis* e *Lippia gracilis* apresentaram uma ação antibacteriana frente à cepa de *Staphylococcus aureus* tanto no experimento *in vitro* como no *in vivo*, e que a glutamina administrada por gavagem por um período de trinta dias promoveu uma ação antioxidante e imunomoduladora .

6 CONCLUSÃO

1. Os óleos essenciais de *Lippia aff gracilis* e de *Lippia gracilis* apresentaram potente atividade antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.
2. Soluções a 5% dos óleos de *Lippia aff gracilis* e *Lippia gracilis* quando administradas por via subcutânea em membro pélvico de rato diabético infectado com *Staphylococcus aureus* reduziram consideravelmente o número de Unidades Formadoras de Colônias, no tecido inoculado, demonstrando seus potenciais antibacterianos no experimento *in vivo*.
3. A L-glutamina ofereceu proteção contra a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo a ratos diabéticos, no soro e nos tecidos adiposo, renal, hepático, esquelético e pancreático.
4. Soluções de L-glutamina quando administradas por gavagem a ratos diabéticos por um período de trinta dias promoveram o aumento das populações de células CD⁴⁺ e aumento na relação das populações de linfócitos CD⁴⁺/CD⁸⁺ em ratos diabéticos.

7 REFERÊNCIAS

ABDULRAZAK, A.; BITAR, Z. I.; AL-SHAMALI, A. A.; MOBASHER, L. A. Bacteriological study of diabetic foot infections. **Jour. of Diabetes and Compl.** v.19, p.138-141, 2005.

AKIMOTO, L. S.; PEDRINHO, S. R. F.; LOPES, G.; BAZOTTE, R. B. Rates of gluconeogenesis in perfused liver of alloxan-diabetic fed rats. **Molecular Pathology and Pharmacology.** v.107, p.65-77, 2000.

AKULA, A.; KOTA, M. K.; GOPISETTY, S. G.; CHITRAPU, R. V.; KALAGARA, M.; KALAGARA, S. Biochemical, histological and echocardiographic changes during experimental cardiomyopathy in STZ-induced diabetic rats. **Phar.res.** v.48, p.429-435, 2003.

ALVES, W. F.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C., VASCONCELOS, P. R. L. Reperfusões da L-alanil glutamina sobre as concentrações da lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos a revascularização distal. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v.18, p.209, 2003.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care.** v.29. Suppl-1, Jan-2006.

ARTEEL, G.E.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Protection against peroxynitrite. **FEBS Lett.** v.455, n.2-3, p.226-30, 1999.

AVILA, J.; BARBAR, B.; GANGEMI, A.; ROMAGNOLI, T.; KUECHLE, J. Intra-Ductal Glutamine Administration Reduces Oxidative Injury During Human Pancreatic Islet Isolation. **American Jour. Of Transplantation.** v.5, p.2830-2837, 2005.

BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T.; WONDRACEK, D. C.; PEROTTONI, J.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions.** v. 163, p.230-238, 2006.

BARBOSA, R. C. C.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C. de; CHAVES, C. R.; VASCONCELOS, P. R. L. de. Efeitos metabólico da glutamina em ratos

submetidos á queimadura por água fervente (escaldadura). **Acta Cir. Bras.** v.18, p.527, 2003.

BASSOLE, I. H. N.; OUATTARA, A. S.; NEBIE, R.; OUATTARA, C. A. T.; KABORE, Z. I.; TRAORE, S. A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry.** v.62, p.209-212, 2003.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes.** v.40, p.405-412, 1991.

BONNES, T.; GUÉRIN, T. Is malonaldehyde a valuable of peroxidation? **Biochem. Pharmacol.** v.44, n.5, p.985-988, 1992.

BONORDEN, W. R.; PARIZA, M. W. Antioxidant nutrients and protection from free radicals. In: KOTSONIS, F.N.; MACKEY, M.; HJELLE, J. (eds.). **Nutritional toxicology.** New York: Raven Press Ltd. p.19-48, 1994.

BOUNOUS, G.; BARUCHEL, S.; FALUTZ, J.; GOLD, P. Whey protein s as a food supplement in HIV-seropositive individuals. **Clin Invest Med.** v.16, n.3, p.204-9, 1993.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clin Invest Med.** v.14, n.4, p.296-309, 1991.

BRINK, W. Fighting cancer with whey. **Life Ext Report.** v.12, p.13-15, 1997.

_____. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. **Life Ext Report.** n.1, p.21-28, 1996.

BUDAVARI, S.; NEIL, O. M. J. The MERCK INDEX, 11th Edition. Published by **MERCK & CO., INC, Rahway, NJ, USA.** v.286, 1989.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **Inter. Jour. Of Food Microbiology.**v.94, p.223-253, 2004.

ÇAKATAY, U.; KAYALI, R. The evaluation of altered redox status in plasma and mitochondria of acute and chronic diabetic rats. **Clinical Biochemistry**. v.39, p.907-912, 2006.

CALBET, J. A. L.; MACLEAN, D. A. Plasma glucagons and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. **J. Nutr.** v.132, n.8, p.2174-2182, 2002.

CALDER, P. C. Glutamine and System. **Clin. Nutr.**, v.13, p.2, 1994.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Glutamine and the immune system. **Amino Acids**. v.17, n.3, p.227-241, 1999.

CARVALHO, C. B. M.; MOTTA NETO, R.; ARAGÃO, L. P.; OLIVEIRA, M. M.; NOGUEIRA, M. B.; FORTE, A. C. Pé diabético análise bacteriológica de 141 casos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v.48, n.3, p.398-405, 2004.

CASTEL, L. M.; NEWSHOLME, E. A. Glutamine and the effects of exhaustive exercise upon the immune response. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.76, n.5, p.524-534, 1998.

CELM, Espectrofotômetro digital. Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. São Paulo, 2003.

CHIRICO, S. High Performance Liquid Chromatography-based Thiobarbituric acid tests. **Methods in Enzimology**. v.233, p.314-318, 1994.

CISTERNAS, J. R. Fisiologia das ilhotas de langerhans. In: Douglas CR. **Tratado de fisiologia aplicada a ciências da saúde**. 4. ed. 2000. p.1073-1086.

COLCA, J. R. Insulin sensitizers may prevent metabolic inflammation. **Biochemical Pharmacology**. v.72, p.125-131, 2006.

Consenso Internacional sobre Pé Diabético. Brasília: Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, 2003.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. **Patología estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CURI, R. **Glutamina: Metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Ed. Sprit, 2000.

CURTHOYS, N. P.; WATFORD, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. **Annu Rev Nutr.** v.15, p.133-159, 1995.

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **Food J. Microbiol.** v.5, p.165-180, 1987.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.** v.257, n.4 (Pt1), p. L163-173, 1989.

DINIZ, L. M. Diabetes do tipo 2: endemia em expansão. **Jornal do Conselho Federal de Medicina**, jul./ago. 2000. p.13-14.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** v.82, n.1, p.47-97, 2002.

FELTRE, R. **Química Orgânica**. 3. ed. São Paulo: Moderna, 1998. v. 3, p.179-207.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Méd. Brasil.** v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FESTING, M. F. W. Suitability of the rat for different investigations. In: ALTMAN, P.I.; KATZ, D.D. (Eds) - **Inbred and genetically defined strains of laboratory animals, mouse and rat**. Bethesda, **Fed.Am. Soc. Exp. Biol.** v.1, p.237-238, 1979.

FILHO, A. G.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. de. Efeito metabólico da oferta endovenosa de L-alanil-glutamina no sangue e fígado de ratos submetidos a hepatectomia parcial. **Rev. Bras Nutr. Clin.** v.19, p.54-58, 2004.

FILHO, J. E. B.; GUIMARÃES, S. B.; CHAVES, C. R.; QUEIROZ, D. A. F.; VASCONCELOS, P. R. C.; VASCONCELOS, P. R. L. Effects of L-alanyl-glutamine on in vivo kidney and blood concentrations of glucose, pyruvate and lactate in rats subjected to unilateral renal ischemia and reperfusion. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** v.17, p.122-125, 2002.

FONSECA, L. M.; FONSECA, C. S. P.; BRANDÃO, C. C. Propriedade anticarcinogênicas de componentes do leite. **Ind Latic.** v. 21, p.31-34, 1999.

GALLEANO, M; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocyte resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochem. Biophys. Acta,** v.1271, n.2-3, p.321-326, 1995.

GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radic. Biol. Med.** v.29, n.11, p.1106-1114, 2000.

GOLDSTEIN, E. J.; CITRON, D. M.; NESBIT, C .A. Diabetic foot infections: bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. **Diabetes Care.** v.10, p.638-641, 1996.

GONZALES, S.; POLIZIO, A. H.; ERATIO, M. A.; TOMARO, M. L. Glutamina is highly effective in preventing in vivo cobalt-induced oxidative stress in rat liver. **World J. Gastroenterology.** v.11, n.23, p.3533-3538, 2005.

GREENWALD, R. A. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. **Free Radic. Biol. Med.** v.8, n.2, p.201-209, 1990.

GRUPTA, S. Lymphocytes response in diabetes mellitus; In: S.Gupta (Ed), **Immunology of Clinical and Experimental Diabetes**, Plenum Publishing Corporation, New York. p.326-329, 1984.

GSTRAUNTHALER, G.; HOLCOMB, T.; FEIFEL, E.; LIU, W.; SPITALER, N.; CURTHOYS, N.P. Differential expression and acid-base regulation of glutaminase mRNAs in gluconeogenic LLC-PK (1)-FBPase(+) cells. **Am. J. Physiol.** v.278, p.227-237, 2000.

GUIMARÃES, S. B.; SANTOS, J. M. V.; ARAGÃO, A. A.; KIMURA, O. de S.; BARBOSA, P. H. U.; VASCONCELOS, P. R. L. de. Protective effect of α -lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. **Nutrition**. v.23, p.76-80, 2007.

HALL, A. G. Glutathione and the regulation of cell death. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.457, p.199-203, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Rad. Biol. Med.** v.18, n.1, p.125-126, 1995.

HALPERN, A.; MANCINI, M. C.; MANCINI, M. Diabetes mellitus. **Rev. Bras. Med.** v.57, 2000.

HAMMARQVIST, F.; EJESSION, B.; WERNERMAN, J. Stress hormones initiate prolonged changes in the muscle amino acid pattern. **Clin. Physiol.** v.21, p.44-55, 2001.

HAUSSINGER, D. Regulation of hepatic ammonia metabolism: the intercellular cycle. **Adv. Enzyme Regulat.** v.25, p.159-180, 1986.

HEATH, G. W.; FORD, E. S.; CRAVEN, T. E.; MACERA, C. A.; JACKSON, K. L.; PATE, R. R. Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. **Med. Sci. Sports. Exerc.** v.23, n.2, p.152-157, 1991.

IRAJ, R.; SEYED, A. M. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus* .**Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.2200-2205, 2003.

JANG, Y. Y.; SONG, J. H.; SHIN, Y. K.; HAN, E. S.; LEE, C. S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacol Res.** v.42, p.361-71, 2000.

JEPSON, M. M.; BATES, P. C.; BROADBENT, P.; PELL, J. M.; MILLWARD, D. J. Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v.255, n.18, p.E166-E172, 1988.

JOHNSON, I. R.; BALL, R. O.; BARACOS, V. E.; FIELD, C. J. Glutamine supplementation influences immune development in the newly weaned piglet. **Developmental and Comparative Immunology**. v.30, p.1191-1202, 2006.

JURETIC, A.; SPAGNOLI, G. C.; HORIG, H. Glutamine requirements in the generation of lymphokine activated killer cells. **Clin. Nutr.** v.13, p.24, 1994.

KAYALI, R.; ÇAKATAY, U.; TELCI, A.; AKÇAY, T.; SIVAS, A.; ALTUG, T. Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin diabetic rat. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v.20, p.315-21, 2004.

KONRAD, R. J.; JANOWSKI, K. M.; KUDLOW, J. E. Glucose and streptozotocin stimulate p135 O-glycosylation in pancreatic islets. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 267, p.26-32, 2000.

KOYAMA, K.; KAYA, M.; TSUJITA, J.; HORI, S. Effects of decreased plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.** v.77, n.1-2, p.25-31, 1991.

KRAUSE, U.; BERTRAND, L.; MAISIN, L.; ROSA, M.; HUE, L. Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes. **Eur. J. Biochem.** v.269, p.3742-3750, 2002.

KREBS, H. A. Metabolism of aminoacids. IV. The sunthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem. J.** v.29, p.1951, 1935.

KUNLE, O.; OKOGUN, J.; EGAMANA, E.; EMOJEVWE, E.; SHOK, M. Antimicrobial activity of varius extracts and cravacol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**. v.10, p.59-61, 2003.

LATHA, M.; PARI, L. Effect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Res.** v.37, p.577-586, 2004.

LAWRENCE, A. L.; LAWRENCE, B. H. Bacterial pathogens in infected puncture wound in adults with diabetes. **J. Foot Ankle Surg.** v.33, n.1, p.91-97, 1994.

LEANDRO, C. G.; NASCIMENTO, E. do; AZEVEDO, M. M.; VEGAS, A.; ALBUQUERQUE, C.; CAVALCANTE, C. B.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CASTRO, C. M. M. B. de. Efeito da L-Glutamina sobre o perfil leucocitário e a função fagocítica de macrófagos de ratos estressados. **Ver. Nutr.** v.19, n.4, p.437-444, 2006.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology.** v.24, p.281-287, 2007.

LEBOVICI, L. P.; REGEV, A.; KRAUZE, A. I.; HARELL, D. Influence of Diabetes Mellitus and Glycaemic Control on the Characteristics and Outcome of Common Infect. **Diabetic. Med.**,v.13, p.457-463, 1996.

LEE, T. N.; ALBON, W. E.; KNIERMAN, M. D.; KONRAD, R. J. Alloxan is an inhibitor of O-GlcNAc-selective N-acetyl- β -D-glucosaminidase. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v.350, p.1038-43, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. A glicólise e o catabolismo das hexoses. In: **Princípios da Bioquímica.** São Paulo, Sarvier, 2. ed., cap.14, 2000(a), p. 297-330.

LEIKER, D. L.; McDOUGALL, A. C. Technical Guide for Smear Examination for Leprosy by Direct MICROSCOPY. **Leprosy Doc.Ser. DN** .v.135, p.1097, 1988.

LE MOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; CHESNEY, J. D. M. C. Antimicrobial Activity of Essential Oils of Brazilian Plants. **Phytotherapy Research.** v.4, n.2, p.82-84, 1990.

LIPSKY, B. A.; PECORARO, R. E.; WHEAT, V. J. The diabetic foot:soft tissue and bone infection. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** v.2, p.409-432, 1990.

LIU, K.; PATERSON, A. J.; CHIN, E.; KUDLOW, J. E. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic β -cells: linkage of O-linked GlcNAc to β -cell death, **PNAS.** v.97, p.2820-25, 2000.

LIU, P. T.; KENTISH, P. A.; SYMONS, A. M.; PARKE, D. V. The effects of ether anaesthesia on oxidative stress in rats-dose response. **Toxicology**, v. 80, p. 37-49, 1993.

LLESUY, S. F. Introdução y Espécies Activas de Oxigênio. In: MARRONI, N.P. (org.) **Estresse oxidativo e Antioxidante**. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, p.21-32.

LOUIE, T. J.; BARTLETT, J. G.; TALLY, F. P.; GORBACH, S.L. Aerobic and anaerobic bacteria in diabetic foot ulcers. **Ann. Intern. Med.** v.85, p.461-463, 1976.

Lymphocytes ratio in patients with long standing diabetes mellitus, **IRCS Med. Sci.**, v.14, p.648-649, 1986.

MACEDO, C. S.; CAPELLETTI, S. M.; MERCADANTE, M. C. S. Role of metabolic control on diabetic nephropathy. **Acta Cir Bras.** v.17, p.370-375, 2002.

MALAISSÉ, W. J.; SENER, A.; MALAISSÉ-LAGAE, F.; WELSH, M.; MATTHEWS, D. E.; BIER, D. M.; HELLERSTROM, C. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. **J. Biol. Chem.** v.257, p-8731-8737, 1982.

MANDRUP, P. T.; BENDTZENK, N.; DINARELD, C. A.; NERUP, J. Man tumor necrosis factor potentiates human interleukin mediated rat pancreatic β -cell cytotoxicity, **J. Immunol.** v.139, p.4080-4082, 1987.

MANDRUP, P. T.; BENDTZENK, N.; DINARELLO, C. A. Man tumor necrosis factor potentiates human interleukin mediated rat pancreatic beta-cell cytotoxicity. **J. Immunol.** v.138, p.4080-82, 1987.

MARHOFFER, W.; STEIN, M.; MAESER, E.; FEDERTIN, E. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. **Diabetes Care.** v.15, p.256-260, 1992.

MARINHO, H. S. P. C. **Metabolismo da glutatona no fígado de rato normal e no fígado de rato hepatomizado**. 1995. 115P. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade de Lisboa, Lisboa.

MATÉS, J. M.; GÓMEZ, C. P.; CASTRO, I. N.; ASENJO, M.; MÁRQUEZ, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. **The Inter. J. Bioch & Cell Biol.** v.34, p.439-458, 2002.

MATOS, F. J. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado em pequenas comunidades.** 3. ed. Fortaleza: Editorav UFC, 1998.

MAXWELL, S. R; LIP, G. Y. Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease. **Br. J. Clin. Pharmacol.** v.44, n.4, p.307-317, 1997.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The Utility of Superoxide Dismutase in Studying Free Radical Reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethylsulfoxide, and oxygen. **J. Biol. Chem.** v.244, n.22, p.6056-6063, 1969.

MEISTER, A. Mechanism and regulation of the glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase of *Escherichia coli*. **Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.** v.62, p. 315-374, 1989.

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; MILLOGO, J.; VIANO, J. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry.** v.101, p.682-685, 2007.

MICKE, P.; BEEH, K. M.; SCHLAAK, J. F.; BUHL, R. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients. **Eur. Jour. Of Clin. Inver.** v.31, p.171-178, 2001

MISRA, M.; DUGUID, W. P.; MARLISS, E. B. Prevention of diabetes in the spontaneously diabetic BB rat by the glutamine antimetabolite acivicin. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.74, p.163-72, 1996.

MOLNE, L.; VERDRENGH, M.; TARKOWSKI, A. Role of Neutrophil Leukocytes in Cutaneous Infection Caused by *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity.** v.68, p.6162-6167, 2000.

MONTEIRO, M. V. B.; LEITE, A. K. R. de E.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M. de; PINHEIRO, D. C. S. N. Topical anti-inflammtory, gastroprotective and antioxidant

effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **Jour. Ethnopharmacology**. v.111, p.378-382, 2007.

MOORMAN, A. F.; WATFORD, M.; DINGEMANSE, M. A.; LAMERS, W. M. Hepatic glutaminase mRNA is confined to part of the urea cycle domain in the adult rodent liver lobule. **FEBS Lett**. v.356, p.76-80, 1994.

MOTTA NETO, R.; OLIVEIRA, M. M.; MAGALHÃES, P. S. F.; DIAS, A. M.; ARAGÃO, L. P.; FORTI, A. C.; CARVALHO, C. B. M. Plasmid-Mediated Extended-Spectrum β -lactamase-Producing Strains of Enterobacteriaceae Isolated from Diabetes Foot Infections in a Brazilian Diabetic Center. **The Brazilian J.infect. Disease**. v.7, n.2, p.129-134, 2003.

MOTTA NETO, R.; CARVALHO, C. B. M.; DIAS, A. M.; OLIVEIRA, M. M.; CÂMARA, L. M. C. PÉ DIABÉTICO: Epidemiologia da Resistência a Antimicrobianos de 61 cepas de *Staphylococcus aureus* Isoladas de 141 Pacientes Ambulatoriais. **RBAC**. v.37, n.3, p.149-152, 2005.

MOTTA NETO, R.; GUIMARÃES, S. B.; SILVA, S. L.; CRUZ, J. N.; DIAS, T.; VASCONCELOS, P. R. L. Glutamina or whey-protein supplementation on alloxan-induced diabetic rats. Effects on CD4+ and CD8+ lymphocytes. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.22, p. 215-218, 2007.

MURRAY, P. R.; BARRON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinic microbiology**. 7th ed. Washington DC, 1999.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.(NCCLS) **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard-M2A7 7th ed. 2000.

NEWSHOLME, E. A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; ARDAWI, M. S. M. Arole for muscle in the immune system and its importance in surgery, trauma, sepsis and burns. **Nutrition**. v.4, p.261-268, 1988.

NEWSHOLME, E. A.; PARRY-BILLING, M. Properties of glutamine release from muscle and its importance for the immune system. **J. Parent. Enter. Nutr.** v.14, p.63-67, 1990.

NEWSHOLME, P.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C.; MURPHY, C. J.; GARCIA, C.; MELO, M. Pires de. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages and neutrophils. Its importance in health and disease. **J. Nutr. Biochem.** v.10, p.316-324, 1999.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M. M. R.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; DOI, S. Q.; BAZOTTE, R. B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.36, n.2, p.153-163, 2003.

NILUFER, O.; MUSTAFA, A.; DIDEM, D. O.; ERGUN, F.; ERDEMY, E. S. In-Vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology.** v.108, p.280-286, 2006.

OHKUBO, Y.; HIDEKI, K.; ARAKI, E.; MIYATA, T.; ISAMI, S.; MOTOYOSHI, S.; KOJIMA, Y.; FURUYOSHI, N.; SCHICHIRI, M. Intensive insulin therapy prevents the progressive of diabetic microvascular complications in japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: A randomized prospective 6-years study. **Diabetes Res. Clin. Prat.**, v.28,n. 2, p.103-117, 2005.

OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, O. O.; OGUNNIYI, T. A. B.; ADEWUNMI, T. A. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil. **J. Ethnopharmacol.** V.72, p.305-311, 2000.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVINO, D. S.; ALVINO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia orignoides* H.B.K. **Food Chemistry.** v.101, p.236-240, 2007.

ONAN, M. C.; FISHER, J. S.; JU, J. S.; FUCHS, B. C.; BODE, B. P. Type I Diabetes Affects Skeletal Muscle GLUTAMINE Uptake in a Fiber-Specific Manner. **Soc. Exper. Biol. Med.** p.606-611, 2005.

OWEN, O.E.; FELING, P.; MORGAN, A. P.; WAHREN, J.; CAHILL, J. R.; G. F. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. **J. Clin. Invest.** v.48, p.574-583, 1969.

PARRY-BILLINGS, M.; EVANS, J.; CALDER, P. C.; NEWSHOLME, E. A. Does glutamine contribute to immunosuppression after burn? **Lancet.** p.336-523, 1990.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. Sánchez; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology.** v.76. p.201-14, 2001.

PESSOA, O. D. L.; CARVALHO, C. B. M, MOTTA NETO, R.; SILVESTRE, J. O. V. L., MATOS, F. J. A.; LEMOS, T. L. G. Antibacterial activity of the essential oil from *Limpia aff. Gracillis*. **Fitoterapia.** n. 76, p. 712-714, 2005.

PIDARAN, M.; LEELAVINOTHAN, P. Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. **Life Sciences.** v.79, p.1720-1728, 2006.

PITHON-CURI, T. C.; LEVADA, A. C.; LOPES, L. R.; DOI, S. Q.; CURI, R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. **Clin. Sci.** v.103, p.403-408, 2002.

POZZILLI, P.; NAGH, M.; VISALLI, N.; PAGANI, S.; BEALES, P.; ANDREANI, D. Impaired. CD⁴⁺/CD⁸⁺. 1986.

QUIJANO, C.; ALVAREZ, B.; GATTI, R. M.; AUGUSTO, O.; RADU, R. Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. **Biochem. J.** v.322 (Pt 1), p.167-173, 1997.

RAMACHANDRAN, B.; RAVI, K.; NARAYANAN, V.; KANDASWAMY, M.; SUBRAMANIAN, S. Protective effect of macrocyclic binuclearoxovanadium complex on oxidative stress in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. **Chem. Biol. Inter.** v.149, p.9-21, 2004

RAO, V. S. N.; PAIVA, L. A. F.; SOUZA, M. F.; CAMPOS, A. R.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C.; TEIXEIRA, M. J.; SILVEIRA, E. R. Ternatin, an anti-inflammatory Flavonoid, Inhibits Thioglycolate-Elicited Rat Peritoneal Neutrophil Accumulation and

LPS-Activated Nitric Oxide Production in Murine Macrophages. **Planta med.** v.69, p.851-853, 2003.

RAO, V. S.; SANTOS, F. A.; SOBREIRA, T. T.; SOUZA, M. F.; MELO, C. L.; SILVEIRA, E. R. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscose*. **Planta Med.** v.63, n.2, p.146-149, 1997.

RAZIEH, Y.; AMIN, A.; SHIRIN, J. Experimental diabetes treated With *Achillea santolina* effect on pancreatic oxidative parameters. **Journal of Ethnopharmacology. Appud**, 2007.

RIDLEY, D. S. Bacterial Índices. **Leprosy in Theory and Praticce Bristol**. John Wright and Sons Ltd, p.620-622, 1964.

ROSKOSKI, J. R. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

ROUTH, H. B.; BHOWMIK, K. R.; PARISH, L. C.; BHOWMIK, N. K. Diabetic foot infection. **An. Bras. Dermatol.** v.71, n.3, p.243-249, 1996.

ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova.** v.24, n.1, p.112-119, 2001.

SALOMÃO, A. B.; NASCIMENTO, J. E. A.; PERCÁRIO, S.; SANO, V.; MARQUES, N. R.; DIAS, C. C. G. O. Intestinal intraluminal injection of glutamine increase trolox total equivalent antioxidant capacity (TEAC) in hepatic ischemia-reperfusion. **Acta Cir. Bras.** v.21, p.69-73, 2006.

SAPICO, F. L.; WITTE, J. L.; CANAWATI, H. N.; MMONTGOMERIE, J. K.; BESSMAN, A. N. The infected foot of the diabetic patient: quantitative microbiology and analysis of clinical features. **Rev. Infect. Dis.** v.6, p.S171-S176, 1984.

SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M. K. C. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type-2 diabetes. **Diabetes.** v. 53, p.1412-1417, 2004.

SEIDEL, A. C.; FAGUNDES, D. J.; BAZOTTE, R. B.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y. Effect of lung resection and sham surgery on the frequency of infection in alloxan-diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.36, p. 287-290, 2003.

SHANKAR, E.M.; MOHAN, V.; PREMALATHA, G. Bacterial etiology foot infections in South India. **European Journal of Internal Medicine**. v.16, p.567-570, 2005

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GUSMANO, G. Farmacognosia da planta ao medicamento. 1. Ed. Rio Grande do Sul: Editora: UFRS, 1999.

SKYLER, J. S. Prevention and treatment of diabetes and its complications. **Med. Clin. North. Am.** v.82, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diagnóstico e classificação de DM e tratamento de DM tipo 2**. Disponível em : <<http://www.diabetes.org.br>>. Acesso em: 30 jul 2007.

SOUSA, D. E; ZANATTA, E.; PIZZOLATTI, M. G. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-DIRHAMNOSIDE FROM Bauhina forficata leaves. **Jour. of Natural Products**. v.67, p.829-832, 2004.

SOUZA, L. F. de; BARRETO, F.; SILVA, E. G. da; ANDRADES, M. E.; GUIMARÃES, E. L. M.; BEHR, G. ^a; MOREIRA, J. C. F.; BERNARD, E. A. Ainda. Regulation of LPS stimulated ROS production in peritoneal macrophages from alloxan-induced diabetic rats: Involvement of high glucose and PPAR γ . **Life Sciences**. v.81, p.153-159, 2007.

SOUZA, M. F. **Atividade anti-inflamatória, anti-trombótica e anti-anafilática da ternatina, um novo flavonóide da Egletes viscosa Less**. 1993. 99p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SOUZA, M.F.; TOME, A.R.; RAO, V.S. Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. **J. Pharm. Pharmacol.** v.51, n.2,p.125-129,1999

SQUIRES, S. A.; EWART, H. S.; McCARTHY, C.; BROSANAN, M. E.; BROSANAN, J. T. Regulation of Hepatic Glutaminase in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. **Diabetes**. v.46, p.1945-49, 1997.

STOPPA, G. R.; CESQUINE, M.; ROMANA, E. A. F. R.; OGO, S. H.; TORSONI, M. A. Aminoguanidine prevented impairment of blood antioxidant system in insulin-dependent diabetic rats. **Life Sciences**. v.78, p.1352-1361, 2006.

STUMVOLL, M.; PERRIELLO, G.; MEYER, C.; GERICH, J. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. **Kidney Internat**. v.5, p.778-779, 1999.

TORRES, J. M. S.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. L.; MARTINS, M. C. R.; CHAVES, C. R.; VASCONCELOS, P. R. C. Efeito metabólico da L-alanil-glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão. **Acta Cir. Bras**. v.18, p.39-44, 2003.

TSIAVOU, A.; HARZIAGELAKI, E.; CHAIDAROGLOU, A.; KONIAVITOU, K.; DEGIANNIS, D. Correlation between intracellular interferon-gamma production by CD⁴⁺ and CD⁸⁺ lymphocytes and IFN- γ gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and Latent Autoimmune Diabetes of Adults (LADA). **Cytokine**. v.31, p.135-141, 2005.

VAN JAARSVELD, H.; KUYL, J. M.; DE WET, E. H.; ALBERTS, D. W.; VAN DER WESTHUIZEN, F. D. Effect various mixtures of diethylether, halothane, nitrous oxide and oxygen on low molecular weight iron content and mitochondrial function of the rat myocardium. **Free Rad. Res. Commun**. v.15, n.3, p.151-157, 1991.

VARMA, R.K.; KAUSHAL, R.; THOMAS, G.P.; JUNNARKAR, A.Y.; SINGH, P.P.; TRIPATHI, R.M. Evaluation of dimethyl sulfoxide as a solvent in pharmacological experiments. **Ind. J.Exp. Biol**. v.25,p.758-760, 1987.

VERSPOHL, E. J. Recommended testing in diabetes research. **Planta médica**. v.68, p.581-590, 2002.

WAGENMAKERS, A. J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exer. Sports. Sci. Rev.** v.26, p.287-314, 1998.

WESTERGREEN, G; KRASSE, B. Evaluation of micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp infection. **J. Clin. Microbiol.** v.7, p.82-83, 1978.

WHEAT, L. J.; ALLEN, S.D.; HENRY, M.; KERNEK, C.B.; SIDERS, J.A.; KUEBLER, T.; FINEBERG, N.; NORTON, J. Diabetic foot infections. Bacteriologic analysis. **Arch. Intern. Med.** v.146, n.10, p.1935-1940, 1986.

WILMORE, D. W.; SHABERT, J. K. Role of glutamine in immunologic responses. **Nutrition.** v.14, p.618-626, 1998.

XI, P.; HONG, Y.; ZHONGYI, Y.; PEI, W.; SHILIANG, W. Glutamine granule-supplementes enteral nutrition maintains immunological function in severely burned patients. **Burns.** v.32, 2006.

YILDEZ, K.; MUSTAFA, N. A.; YANDI, M. Effect of pentoxifylline on the ischemia-reperfusion injury of the intestine. **Int. Surg.** v.80, p.152-155, 1995.

YOUNG, V. R.; AJAMI, A. M. Glutamine: The emperor or his clothes? **J. Nutrition.** v.131, p.2449-2459, 2001.

ZANARDO, R. C. O.; CRUZ, J.W. M. C.; MARTINEZ, L. L.; OLIVEIRA, M. A.; FORTES, Z. B. Probuco restores the defective leukocyte-endothelial interaction in experimental diabetes. **European Journal of Pharmacology.** v.478, p.211-219, 2003.

ZANATTA, L.; SOUSA, E. de; CAZAROLLI, L. H.; CUNHA JUNIOR, A.; PIZZOLATI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapota mica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **Jour. Ethnopharmacology.** v.109, p.151-155, 2007.

ZARROW, M.X.; YOCHIM, J.M.; SANBORN, R.C. **Experimental Endocrinology.** Academic press:New York, 1964.