

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AÇÃO DA CALENDULA OFFICINALIS 6 CH E SPRAY DE
QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM
RATAS DIABÉTICAS**

Letícia Melo Oliveira

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Neusa Margarida Paulo

GOIÂNIA

2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 **1. Identificação do material bibliográfico:** **Dissertação** **Tese**

1 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

Nome completo do autor: Leticia Melo Oliveira

Título do trabalho:

AÇÃO DA CALENDULA OFFICINALIS 6CH E SPRAY DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATAS DIABÉTICAS

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Leticia Melo Oliveira

Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 28 / 09 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

² A assinatura deve ser escaneada.

LETÍCIA MELO OLIVEIRA

**AÇÃO DA CALENDULA OFFICINALIS 6 CH E SPRAY DE
QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM
RATAS DIABÉTICAS**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia

Linha de Pesquisa:

Técnicas cirúrgicas e anestésicas, patologia clínica cirúrgica e cirurgia experimental

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Neusa Margarida Paulo – EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes – DPA/UFG

Prof.^a Dr.^a Liliana Borges de Menezes – IPTSP/UFG

GOIÂNIA

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Melo Oliveira, Leticia

AÇÃO DA CALENDULA OFFICINALIS 6CH E SPRAY DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATAS DIABÉTICAS [manuscrito] / Leticia Melo Oliveira. - 2016. xii, 37 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo; co-orientador Dr. Romão da Cunha Nunes; co-orientador Dr. Liliana Borges de Menezes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Diabetes mellitus. 2. Feridas crônicas. 3. Homeopatia. 4. Quitina.
I. Margarida Paulo, Neusa, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **451** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **14h00min** do dia **05/08/2016**, reuniu-se na sala
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo
6 (a) Pós-Graduando (a) **Letícia Melo Oliveira**, intitulada: “*Ação da Calendula officinalis 6CH e*
7 *spray de quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas*”, apresentado para
8 obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Patologia,**
9 **Clínica e Cirurgia Animal**, desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Profa. Dra.**
10 **Neusa Margarida Paulo**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Letícia**
11 **Melo Oliveira** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente
12 concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a)
13 candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para
14 responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos
15 regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a)
16 candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

17 Profª. Dra. Neusa Margarida Paulo (Orientador (a))

aprovada

18 Dra. Leila Maria Parente Leal

aprovada

19 Dr. Apóstolo Ferreira Martins

aprovada

20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Letícia Melo**
21 **Oliveira**, habilitado [(**Habilitado(a)** ou **não Habilitado(a)**] pelo(s)
22 motivo(s) abaixo exposto(s):

23 _____
24 _____
25 _____
26 _____
27 _____
28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____
33 _____

34 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

35 _____

36 _____

37 _____

38 _____

39 _____

40 _____

41 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo** lavrei a presente ata que, após
42 lida e achada conforme foi por todos assinada.

43 Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo
44 Dra. Leila Maria Parente Leal
45 Dr. Apóstolo Ferreira Martins

Neusa Margarida Paulo
Leila Maria Parente Leal
Apóstolo

Dedico este trabalho à minha família e aos meus pacientes que me inspiram a ser a cada dia uma médica veterinária melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela benção que é realizar mais um sonho: concluir o mestrado, pela oportunidade de crescimento pessoal e por me cercar de pessoas queridas que não mensuraram esforços para me ajudar na realização deste trabalho.

Ao meu marido Higor André Quintão por sempre estar ao meu lado dando força e conselhos, pela compreensão nos momentos em que estive ausente para me dedicar aos estudos e por me auxiliar na formatação deste trabalho.

Ao meu filho Matheus Melo Quintão, que me ensinou a amar incondicionalmente, me acompanhou durante a escrita deste trabalho, me dando sempre força e motivação.

Aos meus pais, Maria Alexandrina da Silva Melo de Oliveira e José Ubirajara de Oliveira, pelo amor, pela educação que me forneceram e por terem se esforçado incessantemente para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu irmão Raul Melo Oliveira e a toda minha família pelo apoio que me ofereceram, principalmente nos momentos de maior dificuldade.

À minha orientadora Prof.^aDr.^a Neusa Margarida Paulo por acreditar e confiar no meu trabalho, pela amizade e carinho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes por todos os ensinamentos e por sempre acreditar no meu potencial.

À minha co-orientadora Prof.^aDr.^a Liliana Borges de Menezes pelo auxílio no processamento e leitura das lâminas, pelos ensinamentos e pela paciência e disponibilidade.

À Prof.^a Dr.^a Leonice Manrique F. Tresvenzol pelos ensinamentos, pela disponibilidade de sempre e por ter manipulado o medicamento homeopático que utilizei.

Aos meus queridos amigos Thamiza Carla Costa dos Santos, Léo Lindsay Sousa Galvão, Fernanda Figueiredo Mendes, Danilo Ferreira Rodrigues, Taís Andrade Dias de Souza e Cibelle Cunha dos Santos por toda a ajuda na execução deste trabalho. Sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

A todos os meus amigos que torceram por mim, me deram força e me ajudaram a realizar este sonho. Obrigada por entenderem os momentos de ausência e cansaço.

À Universidade Federal de Goiás por ter oferecido as instalações onde foram realizadas todas as etapas deste trabalho, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás pelo apoio financeiro.

E por fim a todos os animais, que contribuíram valiosamente na execução deste estudo.

“Quanto mais palpável é uma verdade, mais tempo requer para conquistar o lugar a que tem direito. Os obstáculos, que se colocam em seu caminho, se devem a que essa verdade desencadeia ao seu redor um verdadeiro ódio. Pois, ela anuncia uma revolução, uma perturbação dos interesses existentes e dos lugares conquistados.”

Samuel Hahnemann

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Princípios da Homeopatia.....	4
2.2. Pele	6
2.2.1. Epiderme.....	6
2.2.2. Derme	8
2.3. Cicatrização	8
2.3.1. Fase Inflamatória	8
2.3.2. Fase Proliferativa.....	10
2.3.3. Fase de Remodelamento.....	11
2.4. Diabetes Mellitus.....	11
2.4.1. Diabetes tipo 1	12
2.4.2. Diabetes tipo 2.....	12
2.4.3. Diabetes x Cicatrização	13
2.5. Quitosana.....	14
2.6. Calendula officinalis.....	14
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO 2 - CALENDULA OFFICINALIS 6 CH E SPRAY DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATAS DIABÉTICAS	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	24
Resultados.....	26
Discussão	31
Conclusão	33
Referências	34
CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	37

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO 1**

- FIGURA 1 - Corte histológico da epiderme mostrando os cinco estratos: córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e basal.7
- FIGURA 2 - Imagem da *Calendula officinalis*.. 15

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 - Gráfico representativo da evolução da redução de feridas cutâneas em ratas Wistar diabéticas tratadas com solução salina 0,9% (GC), Spray de Quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH) no período de 14 dias.26
- FIGURA 2 - Acompanhamento macroscópico da contração de feridas em ratas diabéticas aos dois, seis e 14 dias de pós-operatório. GC – Grupo Controle, GQ – Grupo Quitosana e GH – Grupo Homeopatia.27
- FIGURA 3 - Fotomicrografias (20X) da epiderme de feridas cutâneas de ratas diabéticas. Reepitelização ausente (seta preta) no terceiro dia pós-operatório nos animais do GC – Grupo Controle, GQ – Grupo Quitosana e GH – Grupo Homeopatia. Reepitelização parcial (seta preta) nos animais do GC e GQ no sétimo dia pós-operatório. Reepitelização total (seta preta) nos animais do GH no sétimo dia pós-operatório. Reepitelização total (seta preta) no 14º dia pós-operatório nos animais do GC, GQ e GH.28

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Porcentagem de contração da ferida em ratas Wistar diabéticas tratadas com solução salina 0,9% (GC), Spray de Quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH), 14 dias pós-operatório.27
- TABELA 2 - Escores de lesões microscópicas observadas na epiderme de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), Spray de Quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH).28
- TABELA 3 - Escores de lesões microscópicas observadas na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), Spray de Quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH), três dias pós-operatório.....29
- TABELA 4 – Escores de lesões microscópicas observadas na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), Spray de Quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH), sete dias pós-operatório.30
- TABELA 5 – Escores de lesões microscópicas observadas na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), Spray de Quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH), 14 dias pós-operatório.30

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	- Adenosina difosfato
ANOVA	- Análise de variância
EGF	- Fator de crescimento epitelial
EVZ	- Escola de Veterinária e Zootecnia
GC	- Grupo Controle
GH	- Grupo Homeopatia
GP	- Glicoproteína
GQ	- Grupo Quitosana
IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
MCA	- Membrana corioalantóide
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaqueta
TGF- β	- Fator de crescimento transformador β
TLR-2	- Receptor do tipo Toll 2
TLR-4	- Receptor do tipo Toll 4
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
TxA2	- Tromboxano A2
UFG	- Universidade Federal de Goiás

RESUMO

Uma das complicações do diabetes é a dificuldade de cicatrização de feridas. Vários estudos estão sendo realizados no intuito de encontrar um medicamento capaz de otimizar a cicatrização tendo ao mesmo tempo um baixo custo. A *Calendula officinalis* na matéria médica homeopática é citada como agente cicatrizante, porém não há na literatura trabalhos avaliando sua ação sobre feridas em pacientes diabéticos. A quitosana é um biopolímero que apresenta potencial anti-inflamatório, antibacteriano e antioxidante e contribui no processo cicatricial. Objetivou-se com este estudo avaliar e comparar o efeito da *Calendula officinalis* 6 CH e do Spray de Quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas. Para isto, foram utilizadas ratas Wistar divididas aleatoriamente em três grupos (GC, GH e GQ). Os animais foram tratados de acordo com o grupo a qual pertenciam: os do GC com solução salina 0,9%, os do GH com *Calendula officinalis* 6 CH e os do GQ com o Spray de Quitosana. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos (n=6) correspondente aos períodos de avaliação microscópica (três, sete e 14 dias). As ratas foram induzidas ao diabetes por meio de aplicação intraperitoneal de Aloxana (120mg/kg) e então anestesiadas para a realização do punch de 9,0 mm na região dorsal às vertebrae torácicas. Foram realizadas avaliações macroscópicas e microscópicas. Macroscopicamente os animais tratados com *Calendula* 6 CH e Spray de Quitosana tiveram suas feridas cicatrizadas em um menor tempo quando comparados ao GC. Microscopicamente foi possível observar que a *Calendula* 6 CH foi capaz de promover maior recrutamento de células mononucleares, apresentar fibroplasia no estágio inicial de cicatrização e promover formação de tecido conjuntivo denso espesso e organizado ao final de 14 dias, demonstrando superioridade ao grupo Controle e ao grupo Quitosana. O Spray de Quitosana se mostrou eficaz e superior na otimização da cicatrização de feridas em relação ao GC.

Palavras – chave: Diabetes mellitus, Feridas crônicas, Homeopatia, Quitina

ABSTRACT

One of the complications of diabetes is the difficulty of wound healing. Several studies are being conducted in order to find a drug to optimize healing while taking a low cost. *Calendula officinalis* in homeopathic materia medica is cited as a healing agent, but no studies in the literature evaluating its effect on wounds in diabetic patients has been performed. Chitosan is a biopolymer that has anti-inflammatory, antibacterial, and antioxidant potential and helps in the healing process. The objective of this study was to evaluate and compare the effect of Calendula officinalis 6 CH and Chitosan Spray on the healing of skin wounds in diabetic rats. For this, we used 54 female rats randomly assigned into three groups (CG, GH, and GQ) 18 animals each satisfaction. The animals were treated according to the group to which they belonged: the CG with 0.9% saline, the GH with Calendula officinalis 6 CH, and GQ with Chitosan Spray. Each group was divided into three subgroups (n = 6) corresponding to periods of microscopic evaluation (three, seven, and 14 days). The rats were diabetes- induced by intraperitoneal application of Aloxana (120mg / kg) and then anesthetized for holding the punch of 9.0 mm in the dorsal thoracic vertebrae. Macroscopic and microscopic evaluations were performed. Macroscopically, animals treated with Calendula 6 CH and Chitosan Spray had their wounds healed in a shorter time when compared to the CG. Microscopically, we observed that the Calendula 6 CH was able to promote increased recruitment of mononuclear cells present in fibroplasia in the initial healing stage and promote formation of thick dense connective tissue and organized at the end of 14 days, demonstrating superiority to the control group and to the Chitosan group. The Chitosan Spray was effective and superior in optimizing wound healing compared to the control group.

Key words: Chitin, Chronic wounds, Diabetes mellitus, Homeopathy

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A pele, o maior órgão do corpo, representa aproximadamente 16% do peso corporal do ser humano¹, 24% do peso do cão filhote e 12% do cão adulto². É a primeira barreira de proteção do organismo e se encontra exposta a agressões que podem resultar na perda de sua continuidade³. A ferida é o resultado da ruptura da integridade da pele, de mucosas ou órgão⁴ e a cicatrização é um processo complexo que envolve fenômenos fisiológicos e bioquímicos no intuito de restaurar as estruturas celulares e camadas teciduais e de preservar suas funções^{5, 6}. Ocorre uma sequência de eventos envolvendo as células de constituição do tecido e a matriz extracelular. Esses eventos podem ser descritos em fases sequenciais e interdependentes: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento^{7, 8}. Existem fatores que podem interferir negativamente nesse processo, como uma inadequada perfusão tecidual⁹, presença de debris, sistema imunológico ineficiente, quimioterapia, idade e o diabetes¹⁰.

O diabetes é uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países, e sua importância e número de casos é crescente devido a vários fatores, como o crescimento populacional, o envelhecimento, a urbanização, aumento da obesidade e sedentarismo^{11, 12}. As complicações do diabetes envolvem isquemia, espessamento da membrana basal dos capilares, alteração na síntese do colágeno e na morfologia celular, diminuição da proliferação e diferenciação anormal de queratinócitos, o que pode prejudicar o processo de cicatrização¹³. As feridas de pacientes diabéticos ficam estagnadas na fase inflamatória, com contínuo influxo de neutrófilos que liberam enzimas citotóxicas, radicais livres e mediadores inflamatórios, que causam danos ao tecido¹⁴.

Estudos envolvendo medicamentos alopáticos^{15, 16}, fitoterápicos¹⁷⁻¹⁹ e homeopáticos^{20, 21} estão sendo realizados no intuito de encontrar um tratamento que possa otimizar o tempo de cicatrização. A maioria dos fármacos utilizados atualmente são importados, o que representa um alto custo do tratamento^{16, 22}. A homeopatia surge como uma indicação eficaz²³.

A homeopatia é uma ciência que foi desenvolvida por Hahnemann no ano de 1796, baseada em preceitos de Hipócrates e Paracelso²⁴. Passou a ser utilizada no mundo inteiro rapidamente devido ao seu sucesso na cura de grandes epidemias²⁵. A porcentagem de pessoas que se tratam com homeopatia cresceu significativamente desde a década de 1980, isso é demonstrado pelo aumento do número de novos homeopatas, de pacientes tratados e de medicamentos vendidos²⁴. Na medicina veterinária a homeopatia é considerada uma

especialidade desde 1995, por meio da Resolução nº 625/95 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Zootecnia²⁶.

De acordo com Vijnovsky²⁷ vários medicamentos homeopáticos podem ser utilizados no tratamento de feridas: Apis, Arnica, Calêndula, Echinacea, Hypericum, Lachesis, Ledum, Phosphorus, Staphysagria e Sulphuric Acidum. Trabalhos com Arnica montana, Calendula officinalis e Delphinium staphysagria demonstraram o efeito positivo da utilização de medicamentos homeopáticos na cicatrização de feridas^{20, 21, 28-30}. Franco e Pinto²⁰ compararam o uso de Arnica montana e Delphinium staphysagria com a utilização de Penicilina e Rifamicina no pós-operatório de cirurgias eletivas de histerectomia e orquiectomia, nas espécies canina e felina, e concluíram que os homeoterápicos se mostraram mais eficientes por promoverem uma otimização do tempo de cicatrização, além de maior facilidade de aplicação terapêutica, aceitabilidade pelo paciente e baixo custo.

A *Calêndula officinalis* é uma planta herbácea anual que pertence à família botânica Asteraceae e possui cerca de 30-50 cm de altura. Foi cultivada por egípcios, gregos, hindus e árabes. Vêm sendo amplamente utilizada com finalidade medicinal, baseada durante muito tempo em conhecimentos empíricos, mas hoje sua utilização tornou-se embasada nos conhecimentos científicos^{31, 32}. É muito utilizada como fitoterápico por sua ação cicatrizante, anti-inflamatória, antibacteriana e tranquilizante^{18, 19}. Como medicamento homeopático possui ação positiva sobre a cicatrização de acordo com sua patogenesia³³, porém não foram encontrados trabalhos na literatura avaliando a eficácia do medicamento homeopático Calendula officinalis 6 CH na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos.

A quitosana, um polissacárido linear obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, é considerada um biomaterial biocompatível e biodegradável^{34, 35}. Como medicamento alopático não apresenta efeitos adversos após aplicação nos tecidos e tem sido empregado na medicina e na medicina veterinária^{16, 36, 37}. Suas propriedades antimicrobianas, cicatrizantes, hemostáticas e analgésicas já foram relatadas^{37, 38}. A quitosana é uma opção eficaz no tratamento de feridas em ratas diabéticas, porém o seu grau de desacetilação pode influenciar no processo de cicatrização¹⁶.

A quitosana tem despertado o interesse de diversos pesquisadores que buscam obter curativos que atuem no processo de cicatrização de feridas crônicas ou de difícil tratamento, como é o caso de feridas em pacientes diabéticos. O medicamento homeopático Calendula officinalis 6 CH já é utilizado na prática médica homeopata, porém faltam na literatura científica trabalhos que comprovem a sua eficácia em feridas de difícil tratamento. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar e comparar o potencial terapêutico da Calendula

officinalis 6 CH e do spray de quitosana na cicatrização de feridas em ratas diabéticas induzidas experimentalmente.

2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 .1. Princípios da homeopatia

A homeopatia é uma ciência que foi elaborada pelo médico alemão Christian Frederick Samuel Hahnemann no século XVIII, baseada em preceitos anteriores de Hipócrates e Paracelso²⁴. Hahnemann ao traduzir a matéria médica de Cullen, discordou da interpretação que o médico escocês dava a respeito do modo de ação da China (*Cinchona officinalis*) no tratamento das febres intermitentes. Administrou a China em si mesmo e observou o desenvolvimento de sintomas semelhantes aos da malária, que cessavam ao deixar de ingerir a substância. Foi então que o pesquisador instituiu um novo protocolo, onde as substâncias seriam experimentadas em indivíduos saudáveis, observando o desencadeamento dos sintomas gerados por cada uma e catalogando as informações (sinais e sintomas psíquicos, emocionais ou físicos). Tudo o que era relatado sobre cada substância foi publicado em livros denominados de Matérias Médicas Homeopáticas. A partir dessa publicação surgiu a possibilidade de aplicação desse conhecimento em pacientes que apresentassem os mesmos sintomas observados nas experimentações (Princípio da Similitude)^{39, 40}.

Quando desenvolvida, a homeopatia foi fundamentada em oito princípios: no da similitude (semelhante cura semelhante), na investigação dos efeitos das substâncias em indivíduos saudáveis, na utilização do medicamento altamente diluído, na prescrição de medicamentos ajustados individualmente, na força vital, na natureza como a força de cura verdadeira, na individualidade dos processos mórbidos e nos miasmas^{24, 25}.

Hahnemann demonstrou que doses extremamente baixas de determinadas substâncias potencializavam o efeito do medicamento, o que resultava em uma resposta clínica melhor. Ele afirmava que a "força vital" existente na substância seria liberada pelo processo de diluição para o veículo, que agora se comportaria como medicamento⁴⁰. Atualmente alguns conceitos foram reformulados, um deles é o da micro dose ou dose infinitesimal, pois com a descoberta da constante de Avogadro-Loschmidt que estabeleceu que as moléculas não podem ser infinitamente divididas, a ideia de dose ínfima se transformou, pois tornou-se evidente que o soluto (a tintura mãe) não pode ser infinitamente diluído²⁵.

Hipócrates já falava em cura por similares, a qual denominava reação homeostática curativa, que encontra embasamento científico no estudo do “efeito rebote” ou “reação paradoxal” das drogas modernas. No entanto existe pouca divulgação pela farmacologia moderna, pois entra em conflito com o modelo terapêutico vigente que utiliza princípios terapêuticos alopáticos²⁴.

Após a sua criação, a homeopatia passou a ser utilizada no mundo inteiro rapidamente, graças ao seu sucesso na cura de três grandes epidemias: tifo, cólera e febre escarlate²⁵. No Brasil, a primeira farmácia homeopática foi introduzida pelo médico francês Benoit Mure em 1843. Mas somente em 1980 após a resolução nº1000 do Conselho Federal de Medicina a homeopatia foi reconhecida como especialidade médica. Na medicina veterinária a homeopatia passou a ser especialidade em 1995, por meio da Resolução nº 625/95 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Zootecnia²⁶. Mas apesar do seu grande crescimento, os homeopatas enfrentam um dilema, pois não possuem muitos fundamentos teóricos e tendem a escolher entre a especulação metafísica ou a identificam como ciência natural, abstendo-se de uma opinião definitiva até que se tenha condições, materiais e instrumentos experimentais disponíveis²⁵.

Davenas et al.⁴¹ sugeriram a possível existência do medicamento em substâncias ultradiluídas sob a forma de moléculas de “memória”, que são capazes de induzir mudanças no organismo como a própria substância de origem. Por meio da física quântica é possível comprovar que a conformação das moléculas de solvente é alterada quando uma porção de soluto mínima é adicionada a uma solução que é dinamizada. Com a dinamização a informação existente no soluto diluído é transferida para o solvente, justificando o efeito de um remédio pouco concentrado. Dessa forma, a dinamização pode alterar pontes de hidrogênio, ligações dipolo-dipolo além de forças intermoleculares mais fracas, podendo formar grupos de moléculas de solvente denominadas “clusters”⁴². Outra hipótese foi proposta por Khuda-Bukhsh⁴⁰, que os medicamentos homeopáticos atuam por meio da regulação da expressão genética das células, desencadeando ativações ou inativações de genes relevantes para a cura de doenças. Existem atualmente outros modelos que tentam explicar a cura pela homeopatia, dentre eles está o modelo biocibernético que sugere que a medicação homeopática promova uma resposta de cura indireta no organismo. Dessa forma o medicamento atuaria ativando um centro responsável pela cura. Existem cinco potenciais centros: o sistema reticulo-endotelial, o sistema nervoso central, supressão e ativação do código genético, a sensibilidade bioeletromagnética mediada pela transmissão biofóton ou sinalização de água, e a reação de adaptação endócrina ao stress²⁵.

O interesse pela medicina veterinária complementar por médicos veterinários e tutores de animais tem aumentado nos últimos anos, principalmente para os pacientes com doenças crônicas, cujos sinais clínicos não estão sendo aliviados por tratamentos convencionais. Por isso é importante para os médicos veterinários se familiarizarem com a procura de tratamentos complementares^{43, 44}.

Apesar de não se saber ao certo como ocorre a cura pela homeopatia, diversas enfermidades estão sendo tratadas por profissionais que adotam essa especialidade. Estudos mostram que alergias⁴⁵, fibromiomas⁴⁶, hiperatividade⁴⁷ e muitas doenças crônicas⁴⁸ podem ser tratadas com sucesso pela homeopatia. Além da sua crescente utilização na cicatrização de feridas^{20, 21, 30}.

2.2. Pele

A pele, o maior órgão do corpo, correspondendo a aproximadamente 16% do peso corporal do ser humano, 24% do peso do cão filhote e 12% do cão adulto. É um envoltório impermeável que atua como barreira de proteção entre o meio externo e interno, controla a perda de água, a movimentação de moléculas, atua na termorregulação corporal e filtra uma faixa da radiação ultravioleta. É composta pela epiderme e pela derme. Abaixo da derme localiza-se a hipoderme, uma camada de tecido conjuntivo frouxo que não é considerada componente da pele, mas é responsável pela união desta aos demais órgãos e funciona como reservatório de energia e isolante térmico^{1, 2, 49, 50}.

2.2.1. Epiderme

É a camada mais externa, avascular e tem origem no ectoderma. A sua arquitetura é semelhante em todos os mamíferos, mas existem algumas diferenças. A espessura, o tipo de camada córnea e a presença ou ausência do estrato lúcido são influenciados pela densidade da pelagem⁵¹. A epiderme é constituída pelo epitélio estratificado escamoso queratinizado que contém cinco estratos: basal, lúcido, espinhoso, granuloso e córneo (Figura 1)¹⁰.

A camada basal, também conhecida por estrato germinativo, é formada por células tronco e células proliferativas dispostas em uma única camada. É uma região de constante mitose, pois essas células são responsáveis pela constante reposição de células escamosas da epiderme. As células troncoepidérmicas não diferenciadas apoiadas na membrana basal migram para a superfície e durante essa migração ocorrem modificações bioquímicas e morfológicas que resultarão na diferenciação das células que irão formar os estratos subsequentes^{2, 51, 52}.

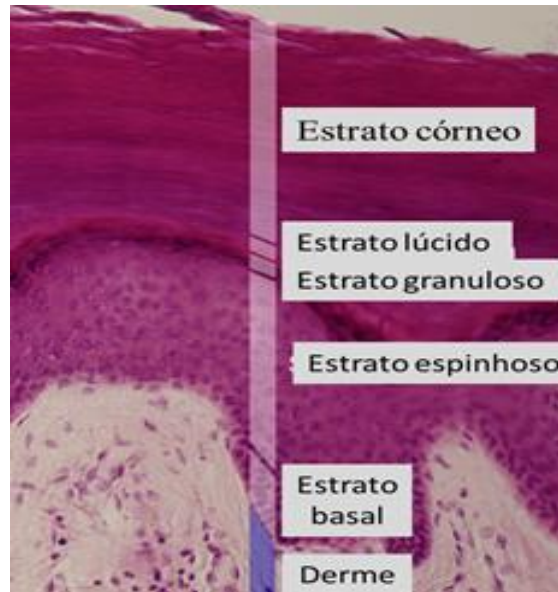


FIGURA 1 - Corte histológico da epiderme mostrando os cinco estratos: córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e basal.
Fonte: Adaptado de Gantwerker et al.¹⁰

O estrato espinhoso está logo acima do estrato basal e possui um número variável de camadas dependendo da região do corpo⁵². As células da camada espinhosa são células em diferenciação, poligonais com núcleos vesiculosos e nucléolos pouco evidentes, possuem desmossomos que são responsáveis pela manutenção da integridade da epiderme, conferindo coesão e resistência ao atrito. Durante o processamento histológico essas células se contraem deixando pontes citoplasmáticas presas aos desmossomos, conferindo um aspecto de espinho que caracteriza o estrato⁵¹⁻⁵³.

A camada granulosa é uma zona de transição entre células vivas e células mortas rombóides ou pavimentosas que possuem grânulos de cerato-hialina. O estrato granuloso não está presente em todas as regiões. Na pele das regiões mandibular e temporal, do dorso da cabeça, do ouvido externo e do plano nasal, o estrato granuloso é fino ou ausente. Na região dos coxins o estrato granuloso é bem desenvolvido^{2, 51}.

O estrato lúcido é constituído por camadas de células anucleadas, pavimentosas e translúcidas. Essas células possuem grânulos de uma substância chamada eleidina. Ocorre em cães e gatos somente nas regiões mais espessas da pele, como coxins e plano nasal⁵¹.

O estrato córneo é formado por várias camadas de células queratinizadas, anucleadas e achatadas. A descamação gradual desse estrato é equilibrada pela proliferação de células basais e sua principal função é o controle da perda transepidérmica de água^{2, 51}.

2 .2. 2. Derme

A derme, camada mais interna da pele, é vascularizada e composta por tecido conjuntivo, nervos e anexos cutâneos, além de células inflamatórias como linfócitos, histiócitos e mastócitos. Divide-se em derme papilar e derme reticular. A derme papilar é delimitada superiormente pela epiderme e inferiormente pela derme reticular e pelo plexo vascular. É altamente irregular e contém as papilas dérmicas. A derme reticular repousa entre a derme papilar e a hipoderme^{51, 52}.

2 .3. Cicatrização

A cicatrização é um fenômeno altamente complexo e dinâmico de restauração de estruturas celulares e camadas teciduais, no intuito de preservar suas funções⁶. Resulta da interação entre células, citocinas, matriz extracelular e fatores de crescimento e se caracteriza pelo desenvolvimento de uma sequência de eventos interdependentes que envolvem as células de constituição do tecido e a matriz extracelular, concentrando-se especialmente nos tecidos conjuntivos que formam a arquitetura da pele dos vertebrados^{5, 54}.

Embora o tipo de ferimento, o tempo de evolução, o órgão ou tecido envolvido interfiram, o processo de reparo é basicamente o mesmo, ocorrendo em todo o organismo. Em termos clínicos a cicatrização pode ser classificada em primeira, segunda e terceira intenção. A cicatrização por primeira intenção ocorre quando as bordas da ferida são deixadas unidas e quase não há perda de tecido; a cicatrização é rápida e a cicatriz é praticamente imperceptível. Quando ocorre perda de substância significativa, a cicatrização se processa mais lentamente (cicatrização por segunda intenção), é necessária a formação do tecido de granulação, rico em elementos vasculares e celulares, que preenchem o vazio resultante dos tecidos perdidos. Nesse modelo as bordas da ferida permanecem separadas durante o processo de cicatrização. Existe ainda a cicatrização por terceira intenção que ocorre quando o ferimento está evoluindo por segunda intenção e sutura-se a região com o intuito de auxiliar no processo⁵⁵.

Existem classificações didáticas utilizadas para facilitar o entendimento do processo de cicatrização. São considerados três estágios: fase inflamatória, fase de proliferação e fase de remodelamento^{1, 10}.

2 .3. 1. Fase inflamatória

Na divisão do processo de reparo cutâneo em fases, são considerados os aspectos macroscópicos e histológicos predominantes. As características assumidas pela lesão, ao longo

de sua evolução, resultam da sucessão e sobreposição de eventos, resultantes da ativação celular por mediadores químicos⁵⁴.

A fase inflamatória tem início logo após o trauma, primeiramente como uma reação caracterizada por vasoconstrição, devido às descargas adrenérgicas e a ação de mediadores oriundos da degranulação de mastócitos^{54, 56}. A ruptura ou fissura do endotélio ativa uma sequência de eventos, que se inicia com a deposição e recrutamento de plaquetas, formando um coágulo. A formação do coágulo serve para aderir as bordas da ferida e auxiliar na constituição da matriz provisória, para que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida^{5, 56}.

A adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre devido à presença de proteínas de adesão. As principais são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa que possuem uma distribuição restrita sendo encontradas apenas nas plaquetas e em outras células de linhagem megacariocítica^{10, 54}.

Após a adesão, as plaquetas são ativadas por um grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e na corrente sanguínea, como o colágeno e a trombina gerada pelos processos de coagulação. O ADP liberado das hemácias e grânulos densos das próprias plaquetas aumenta a agregação plaquetária e induz a exposição do receptor GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de Von Willebrand. O ácido araquidônico da membrana das plaquetas em processo de agregação é convertido em TxA2 pelas enzimas ciclooxigenase e tromboxane sintetase. O TxA2 tem efeito vasoconstritor além de induzir a exposição dos sítios de ligação da GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de Von Willebrand⁵⁴. O ácido hialurônico interage com receptores de superfície celular, como o CD-44, o RHAMM (Receptor de ácido hialurônico Mediated Mobility) e com os Toll-like receptors TLR-4 e TLR-2. Essa interação induz eventos importantes no reparo de feridas: modulação da inflamação, quimiotaxia, a migração celular, secreção de colágeno e angiogênese⁶. Outros mediadores como a noradrenalina e serotonina ativam diferentes cascatas de ativação plaquetária⁵⁴.

As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento, quimiocinas e também outras proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina. A interação das proteínas dos grânulos plaquetários com as proteínas da matriz extracelular mais os corpos plaquetários agregados formam uma matriz provisória, que se torna mais consistente à medida que a fibrina se polimeriza pelas vias intrínseca ou extrínseca da coagulação. Os fatores de crescimento TGF- β e PDGF e os tromboxanos se difundem pela matriz provisória formando um gradiente

quimiotático que orienta a migração de células que estão envolvidas com resposta inflamatória^{1, 54}.

Ainda na fase inflamatória, ocorre a migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos para a ferida, mediada pelas selectinas expressadas do endotélio ativado. Ao saírem do vaso sanguíneo os polimorfonucleares migrarão em resposta a elementos do sistema complemento (C3a e C5a), da degranulação das plaquetas, de produtos bacterianos e interleucina-8 produzida por macrófagos e fibroblastos¹. Posteriormente, monócitos se infiltram na região em resposta a estímulos semelhantes aos de neutrófilos, e se diferenciam em macrófagos que atuam na eliminação de micro-organismos e de fragmentos teciduais, produzem e exportam eicosanóides, citocinas, fatores de crescimento, frações do complemento, fatores de coagulação e enzimas^{1, 54, 55}.

2.3.2. Fase proliferativa

A presença local de macrófagos intensifica a migração e ativação de fibroblastos, que são os principais componentes do tecido de granulação. O aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local faz com que a matriz provisória seja substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico. Em paralelo ocorre a angiogênese devido à ação direta de fatores de crescimento e à baixa tensão de oxigênio no local da lesão^{1, 10, 54}.

O tecido de granulação é composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e II. É edematoso e os vasos são extremamente exudativos e sangram com facilidade⁵⁴.

Nesta fase, a migração e proliferação de fibroblastos ocorre a partir das margens livres da ferida e de células mesenquimais, estímulos pelo EGF e o PDGF. Por outro lado, PDGF e TGF- β induzirão a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, os quais expressam α -actina, α -miosina e desmina. Os miofibroblastos possuem capacidade de se contrair e se expandir, movimentando-se pela ferida. Durante essa movimentação, ocorre deposição de fibronectina sobre o arcabouço de fibrina. Assim, começa a deposição de colágeno na ferida que se liga à fibronectina. Este aos poucos substitui os proteoglicanos e a fibronectina até se tornar o principal componente da cicatriz em formação^{1, 54}.

2 .3. 3. Fase de remodelamento

Na fase de remodelamento, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, que vai sendo enriquecido com mais fibras de colágeno e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Nesta etapa, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I. O colágeno tipo III, inicialmente mais abundante que o tipo I, vai sendo degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto que o tipo I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos. Ocorre simultaneamente uma alteração na organização do colágeno; as fibras paralelas dispostas aleatoriamente tornam-se entrelaçadas e organizadas ao longo das linhas de stress^{1, 7, 10}.

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento. Os linfócitos, nesta fase, são efetores imunes e produtores de fatores de crescimento⁵⁴.

A resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada após concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Esse processo pode ocorrer durante muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal^{1, 7, 54}.

Os fenômenos descritos acima se referem ao processo de cicatrização fisiológica, porém em algumas situações ocorre diminuição da resposta do organismo, como no diabetes mellitus, na exposição excessiva à radiação, corticoterapia e desnutrição. Ocorre também uma resposta excessiva do organismo nos casos de cicatriz queloidiana ou cicatriz hipertrófica. Para que as fases da cicatrização ocorram de forma adequada, deve existir um conjunto de condições que incluem boa perfusão tecidual, ausência de debris, sistema imunológico e fibroblástico eficientes além de bom estado nutricional^{1, 57}.

2 .4. Diabetes mellitus

O diabetes é uma doença metabólica, caracterizada por uma hiperglicemia que resulta de um defeito na secreção de insulina e/ou quando o organismo não consegue utilizar a insulina de uma forma eficaz. Quando ocorre uma deficiência de insulina, a capacidade dos tecidos periféricos de utilizar a glicose é amplamente prejudicada, o que provoca uma hiperglicemia. O açúcar é então excretado na urina envolvendo também perda de água e de eletrólitos, o que resulta em desidratação, hemoconcentração e redução do volume de sangue circulante. O metabolismo da gordura também é afetado. No animal privado de insulina, a utilização da glicose é deprimida sendo necessária a mobilização da gordura dos depósitos corporais a fim de fornecer energia para a função celular. O tecido adiposo é catabolizado e os

ácidos graxos resultantes são oxidados no fígado e posteriormente convertidos em corpos cetônicos, o que pode levar a acidose⁵⁸. A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a danos a longo prazo, como a disfunção de diferentes órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos^{59, 60}.

Existem duas principais classificações para o diabetes: diabetes tipo 1, também conhecido como diabetes mellitus dependente de insulina e o diabetes tipo 2, também denominado diabetes mellitus não dependente de insulina. O diabetes tipo 1 representa aproximadamente 10% de todos os casos em humanos, sendo o diabetes tipo 2 a forma mais comum da doença, representando 90% de todos os casos⁶¹. Praticamente todos os cães com diabetes mellitus são insulino dependentes, é muito raro o diabetes tipo 2 em cães⁶².

2.4.1. Diabetes tipo 1

Essa forma de diabetes ocorre em humanos principalmente na adolescência e juventude, porém em cães a maioria dos casos acomete animais de meia-idade e mais velhos⁶³. Resulta da destruição das células β do pâncreas com perda progressiva e eventualmente completa da secreção de insulina⁵⁹.

Em tese, todos os cães diabéticos apresentam diabetes tipo 1 no momento do diagnóstico, que é caracterizado por hipoinsulinemia. A causa do diabetes em cães foi pouco caracterizada, porém acredita-se que seja multifatorial. As principais causas são: predisposição genética, infecção, medicamentos, obesidade, imunomediada e pancreatite⁶⁴.

A sintomatologia clínica é semelhante na maioria dos casos, podendo ocorrer poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso^{59, 64}. A perda funcional das células β do pâncreas é irreversível em cães, sendo indicada uma terapia insulínica por toda a vida para manter o controle glicêmico do estado diabético⁶⁴.

2.4.2. Diabetes tipo 2

É a forma mais comum do diabetes em seres humanos, o que representa mais de 90% de todos os casos⁶¹. Nessa forma ocorre uma combinação de resistência à ação da insulina e uma resposta secretória compensatória de insulina inadequada. A maioria dos pacientes com este tipo de diabetes é obesa, a obesidade provoca certo grau de resistência à insulina. Os doentes que não são obesos podem ter um aumento da percentagem de gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal. O risco de desenvolver essa forma de diabetes aumenta também com a idade e falta de atividade física. Sabe-se que o diabetes está

associado também à predisposição genética, no entanto isso ainda não está completamente estabelecido^{12, 59, 65}.

A diabetes tipo 2 frequentemente não é diagnosticada por muitos anos, porque a hiperglicemia se desenvolve gradualmente não sendo suficiente para o paciente perceber os sintomas clássicos do diabetes. No entanto, tais pacientes têm alto risco de desenvolverem complicações macrovasculares e microvasculares⁵⁹.

2 .4. 3. Diabetes x Cicatrização

O processo cicatricial é o esforço dos tecidos para restaurar as estruturas celulares e camadas teciduais, no intuito de preservar suas funções. Resulta da interação entre células, citocinas, matriz extracelular e fatores de crescimento⁵⁵. No paciente diabético vários fatores interferem na cicatrização dificultando esse processo e tornando-o sujeito a complicações¹⁶. O diabetes pode levar a isquemia, espessamento da membrana basal dos capilares, alteração na síntese do colágeno e na morfologia celular, diminuição da proliferação e diferenciação anormal dos queratinócitos, o que pode prejudicar o processo de cicatrização¹³

Feridas e úlceras que não cicatrizam após doze semanas, são caracterizadas como crônicas. As feridas dos pacientes diabéticos começam de forma aguda, mas o processo de cura é interrompido e a reparação não ocorre devido à hiperglicemia crônica, inflamação, disfunção macro e micro circulatória, hipóxia e neuropatia autônoma e sensorial⁶⁶. As feridas dos diabéticos ficam estagnadas na fase inflamatória, que é caracterizada pela expressão e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1, IL-6 e TNF- α ⁶⁶. Ocorre um contínuo influxo de neutrófilos que liberam enzimas citotóxicas, radicais livres e mediadores inflamatórios, que causam danos ao tecido¹⁴.

A hiperglicemia crônica promove alterações no endotélio vascular causando microangiopatia diabética, os danos no endotélio levam a uma diminuição no fluxo sanguíneo com conseqüente diminuição na oxigenação, o que dificulta o processo de cicatrização⁶⁷. Pode causar também a glicação não-enzimática de colágeno e outras proteínas, os produtos finais reduzem a solubilidade da matriz extracelular e promovem alterações inflamatórias observadas no diabetes⁶⁶.

Quando ocorre uma lesão, as fibras nervosas periféricas da pele são estimuladas imediatamente e liberam vários neuropeptídeos no microambiente da ferida, tais como substância P e neuropeptídeo Y que influenciam mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos que são células envolvidas na angiogênese e vasoregulação. A expressão desses

neuropeptídios foi encontrada de forma reduzida em pacientes com diabetes, o que pode alterar o processo cicatricial⁶⁶.

2.5. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear que tem uma estrutura muito semelhante à da celulose. É o derivado mais estudado da quitina, que é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, encontrado no exoesqueleto de crustáceos, na parede celular de fungos, em algas e moluscos^{34, 38}. É obtida a partir da desacetilação da quitina em um grau superior a 50% em soluções básicas como hidróxido de sódio ou potássio¹⁶.

Esse polímero possui diversas bioatividades devido aos vários grupos amino primários na sua cadeia principal, por este motivo é extensivamente utilizada para uso biomédico, em fármacos e terapia gênica, em indústrias, no tratamento de água, floculantes de metais pesados e na alimentação³⁵. Tem sido amplamente empregada na medicina e medicina veterinária devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade e por apresentar propriedades antioxidante, antimicrobiana, angiogênica, hemostática e cicatrizante^{35, 36, 68, 69}. Pode ser aplicada na forma de membranas, hidrogéis, adesivos, biossensores e veículos de liberação controlada de drogas⁷⁰.

Mayol et al.⁷¹ avaliaram um gel esterilizado à base de quitosana na cicatrização de queimaduras em ratos e observaram um decréscimo no tempo de cicatrização, com a presença de neovascularização, proliferação tecidual e redução da fase inflamatória (redução no número de infiltrados de neutrófilos e TNF- α), confirmando o potencial de cicatrização da quitosana. O mesmo foi encontrado por Dias¹⁶, que avaliando o potencial de cicatrização do gel de quitosana a 2% em feridas cutâneas de ratas diabéticas, concluiu que esse polímero acelera a reepitelização e contração da ferida. No entanto, relata que o grau de desacetilação da quitosana pode influenciar na cicatrização.

2.6. *Calêndula officinalis*

A *Calendula officinalis* (Figura 2) pertence à família Compositae (Astereacea), possuindo cerca de 50 cm de altura. É conhecida popularmente como Calêndula, “malmequer” e “maravilhas dos jardins”. Suas folhas são grossas e pilosas, as flores são amarelas e o fruto é seco e do tipo aquênio. Apresenta como composição química: calendulina, ácido málico, flavonoides, mucilagem, resinas, carotenoides, óleo essencial, ácido salicílico, tanino e saponina triterpênica⁷².



FIGURA 2 - Imagem da *Calendula officinalis*.
Fonte: Wendt¹⁸

Algumas propriedades medicinais foram atribuídas às flores da *Calendula officinalis*: anti-inflamatória, analgésica, antitumoral, bactericida, diurética, cicatrizante, sedativa e imunomoduladora^{18, 31, 72-74}. A atividade angiogênica da Calêndula foi estudada por Patrick et al.⁷⁵. A ação da *Calendula officinalis* sobre a membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinhas foi avaliada e foi observado um aumento na microvascularização da MCA em relação ao grupo controle. Parente et al.¹⁹ avaliaram o efeito do extrato etanólico das flores da *Calendula officinalis* na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. Foi feita avaliação morfométrica e histológica das feridas e observou-se uma otimização do processo cicatricial em ratos. Porém quando se trata da sua utilização como medicamento homeopático, existem poucos estudos mostrando sua eficácia.

Para a confecção do medicamento homeopático são utilizadas as sumidades floridas da *Calendula officinalis*. A tintura-mãe é preparada por maceração ou percolação e a partir dela são feitas as diluições homeopáticas que podem seguir os seguintes métodos: Hahnemanniano, Korsakoviano e de fluxo contínuo. O medicamento homeopático Calêndula possui como sinonímia os nomes: *Caltha officinallis* e *Caltha vulgaris*⁷⁶.

Campos et al.²¹ avaliaram a utilização da Calêndula officinalis 12 CH via oral e via tópica (pomada e tintura) em feridas traumáticas infectadas na pele de cães e gatos. Nas avaliações clínicas da ferida, independentemente da extensão, profundidade e tempo da lesão, todas as feridas tiveram resposta efetiva ao tratamento com a Calêndula. Nas avaliações in vitro, observou-se que a inibição do crescimento de *Streptococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Hafnia alvei*, *Corynebacterium* sp, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus* sp e *Proteus* sp. Os autores concluíram que a Calêndula pode ser utilizada no tratamento de feridas infectadas.

Pinto⁷⁷ avaliou o uso de *Calêndula officinalis* 6 CH, *Arnica montana* 3 CH e *Silicea* 30 CH no protocolo pós-operatório de mastectomia radical em cadelas e gatas. Observou que os medicamentos mostraram-se eficazes em relação à recuperação cicatricial da ferida cirúrgica, além de serem medicamentos de fácil aceitação pelos pacientes, de fácil administração e de baixo custo de aquisição.

REFERÊNCIAS

1. Isaac C, Ladeira PRSd, Rêgo FMPd, Aldunate JCB, Ferreira MC. Physiological wound healing. *Rev Med.* 2010;89(3/4):125-31.
2. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. 332 p.
3. Oliveira IVP, Dias RVC. Wound healing: stages and influencing factors. *Acta Vet Bra.* 2012;6(4):267-71.
4. Harper D, Young A, McNaught C. The physiology of wound healing. *Surgery.* 2014;32(9):445-50.
5. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. *An Bras Dermatol.* 2003;78(4):393-408.
6. Maquart FX, Monboisse JC. Extracellular matrix and wound healing. *Pathol Biol.* 2014;62:91-5.
7. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Wound healing. *Arq Bras Cir Dig.* 2007;20(1):51-8.
8. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49:35-43.
9. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25:19-25.
10. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clin Plast Surg.* 2012;39:85-97.
11. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94:311-21.
12. Kumar S, Singh R, Vasudeva N, Sharma S. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:1-13.
13. Tsourdi E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. *Biomed Res Int.* 2013;2013:1-6.
14. Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan SK, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Immunopharmacol.* 2014;20(2):322-30.
15. Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;52(2):105-15.
16. Dias TA. Gel de Quitosana à 2% na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2012.

17. Fernandes AV. Efeitos do uso tópico de *Calendula officinalis* na cicatrização de feridas em mucosa palatina: estudo histológico em ratos. [Dissertação] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2003.
18. Wendt SBT. Comparação da eficácia da *Calendula* e do Óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais.[Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
19. Parente LML, Silva MSB, Brito LAB, Lino-Jr RS, Paula JR, Trevenzol LMF, Zatta DT, Paulo NM. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. Rev. Bras. Pl. Med. 2009;11(4):383-91.
20. Franco DE, Pinto LF. Comparative Study between Homeotherapy and Antibiotictherapy in Surgical Wounds Treatment in Medicine Veterinary. Bra Homeopathy J. 2000;6:73-6.
21. Campos MCPS, Coelho MCOC, Silva LBG, Monteiro VLC, Lima ET, Aceto ML. Tratamento de feridas infectadas utilizando *Calendula officinalis*. Bra Homeopathy J. 2000;6(1):22-8.
22. Ferreira E, Lucas R, Rossi LA, Andrade D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. Rev Esc Enferm USP. 2003;37(1):44-51.
23. Coelho MCOC, Almeida EL, Tenório AP, Cavalcante-Jr H, Silva SZ. Processo cicatricial utilizando *Staphisagria* e *Penicilina* após rumenotomia experimental em caprinos. Bra Homeopathy J. 1998;4(1):500-4.
24. Teixeira MZ. Homeopathy: science, philosophy and art of cure. Rev Med São Paulo. 2006;85(2):30-43.
25. Guajardo G, Wilson J. Models for explaining the homeopathic healing process: a historical and critical account of principles central to homeopathy. Homeopathy 2005;94:44–8.
26. Rosenbaum P. Fundamentos de homeopatia para estudantes de medicina e de ciências da saúde. São Paulo: Roca; 2002. 480p.
27. Vijnovsky B. Tratado de matéria médica homeopática. Buenos Aires: AMHA; 1978.
28. Alecu A, Alecu M, Mărcus G, Brezeanu R, Cojocar A. Effect of the homeopathic remedies *Arnica montana* and *Staphisagria* on the time of healing of surgical wounds. Cult. homeopát. 2007(20):19-21.
29. Sousa APB, Passos JPG, Padilha FF, Albuquerque-Jr RLC, Cardoso JC. Efetividade da *Delphinium staphysagria* 6cH e 30cH em ensaios biológicos para cicatrização. Bra Homeopathy J. 2009;11:13-4.
30. Castro FC, Magre A, Cherpinski R, Zelante PM, Neves LM, Esquisatto MA, Mendonça FA, Santos GM. Effects of microcurrent application alone or in combination with topical *Hypericum perforatum* L. and *Arnica montana* L. on surgically induced wound healing in wistar rats. Homeopathy. 2012;101(3):147-53.

31. Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract*. 2012;18(3):173-6.
32. Diego MP. Las tinturas madre homeopáticas de *Calendula officinalis* y *Echinacea angustifolia* como antiséptico oral. *Rev Med Homeopat*. 2013;6(3):112-26.
33. Vannier L, Poirer J. *Tratado de Matéria Médica Homeopática*. São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda; 1987. 446 p.
34. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006;31:603-32.
35. Choi C, Nam J, Nah J. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *J Ind Eng Chem*. 2016;33:1-10.
36. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(10):1467-80.
37. Dragostin OM, Samal SK, Dash M, Lupascu F, Pânzariu A, Tuchilus C, Ghetu N, Danciu M, Dubruel P, Pieptu D, Vasile C, Tatia R, Profire L. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. *Carbohydr Polym*. 2016;141:28-40.
38. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*. 2000;46:1-27.
39. Corrêa AD, Siqueira-Batista R, Quintas LEM. *Similia Similibus Curentur*: historical backgrounds of homeopathic medicine. *Rev Assoc Med Bras*. 1997;43(4):347-51.
40. Khuda-Bukhsh AR. Towards understanding molecular mechanisms of action of homeopathic drugs: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;253:339-45.
41. E. Dayenas, Beauvais F, Amara J, Oberbaum M, Robinzon B, Miadonna A, Tedeschit A, Pomeranz B, Fortner P, Belon P, Sainte-Laudy J, Poitevin B, Benveniste J. Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE. *Nat*. 1988;333:816-8.
42. Marques MF. *Estudo da resposta imunológica induzida por Arnica montana L.* [Tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2006.
43. Budgin JB, Flaherty MJ. Alternative Therapies in Veterinary Dermatology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2013;43:189-204.
44. Pesch L. Holistic pediatric veterinary medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2014;44(2):355-66.
45. Iturri AB. La homeopatía en las alergias animales. *Rev Med Homeopat*. 2009;2(2):81-6.
46. Popov AV. Homœopathy in treatment of patients with fibromyoma of the uterus. *Br Homeopath J*. 1992;81(4):164-7.

47. Frei H, Thurneysen A. Treatment for hyperactive children: homeopathy and methylphenidate compared in a family setting. *Br Homeopath J.* 2001;90(4):183–8.
48. Mathie RT, Baitson ES, Hansen L, Elliott MF, Hoare J. Homeopathic prescribing for chronic conditions in feline and canine veterinary practice. *Homeopathy.* 2010;99(4):243–8.
49. Slatter D. *Manual de cirurgia de pequenos animais.* 2ed. São Paulo: Manole; 1998.
50. Conceição M. Aspectos histológicos e morfométricos da pele de cães do nascimento aos 70 dias, clinicamente saudáveis.[Tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2003.
51. Souza TM, Figuera RA, Kommers GD, Barros CSL. Histological aspects of canine and feline skin as a tool for dermatopathology. *Pesq Vet Bras.* 2009;29(2):177-90.
52. Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin N Am.* 2011;19:229–34.
53. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery.* 2011;29(10):471–4
54. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mechanisms involved in wound healing: a revision. *Bra J Pharm Sci.* 2005;41(1):27-51.
55. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Wound biology and healing. *Rev Med Ribeirão Preto.* 2008;41(3):259-64.
56. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25:9-18.
57. Ono MCC. Influência de dieta imunomoduladora na cicatrização cutânea em ratos. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2009.
58. Swenson MJ, Reece WO. *Dukes: fisiologia dos animais domésticos.* 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. 856 p.
59. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2014;37:81-90.
60. Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;78:13–31.
61. Cefalu WT. Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. *ILAR J.* 2016;186-98.
62. Lustoza AC. Potencial visual evocado por flashes de luz em cães diabéticos com catarata. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
63. Catchpole B, Adams JP, Holder AL, Short AD, Ollier WER, Kennedy LJ. Genetics of canine diabetes mellitus: Are the diabetes susceptibility genes identified in humans involved in breed susceptibility to diabetes mellitus in dogs? *Vet J.* 2013;195:139–47.

64. Nelson RW, Couto CG. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010. 1504p.
65. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*. 2005;36:197-209.
66. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther*. 2014;31:817-36.
67. Akbari CM, LoGerfo FW. Diabetes and peripheral vascular disease. *J Vasc Surg*. 1999;30(2):373-84.
68. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol*. 2009;3(2):203-30.
69. Chien R, Yen M, Mau J. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydr Polym*. 2016;138:259-64.
70. Honarkar H, Barikani M. Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatsh Chem*. 2009;140(12):1403-20.
71. Mayol L, De Stefano D, Campani V, De Falco F, Ferrari E, Cencetti C, Matricardi P, Maiuri L, Carnuccio R, Gallo A, Maiuri MC, De Rosa G. Design and characterization of a chitosan physical gel promoting wound healing in mice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(6):1483-93.
72. Parente LML, Paula JR, Costa EA, Silveira NA. *Calendula officinalis*: características, propriedades químicas e terapêuticas. *Arq Cien Saude UNIPAR*. 2002;6(2):165-9.
73. Brown DJ, Dattner AM. Phytotherapeutic approaches to common dermatologic conditions. *Arch Dermatol*. 1998;134(11):1401-4.
74. Fronza M, Heinzmann B, Hamburger M, Laufer S, Merfort I. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J Ethnopharmacol*. 2009;126(3):463-7.
75. Patrick KF, Kumar S, Edwardson PA, Hutchinson JJ. Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L. the european marigold. *Phytomedicine*. 1996;3(1):11-8.
76. *Farmacopéia homeopática brasileira*. 3ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
77. Pinto LF. Homeopathic pos-surgical protocol of radical mastectomy in canine and feline. *Bra Homeopathy J*. 2000;6:18-21.

CAPÍTULO 2 - CALENDULA OFFICINALIS 6 CH E SPRAY DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATAS DIABÉTICAS

Resumo

A cicatrização é um processo complexo que envolve fenômenos fisiológicos e bioquímicos. Alguns fatores podem interferir negativamente nesse processo, como o diabetes. A homeopatia surge como uma indicação que pode garantir a eficácia e o baixo custo do tratamento. Objetivou-se com este trabalho avaliar e comparar o efeito da Calendula officinalis 6 CH e do Spray de Quitosana na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas. Foram utilizadas ratas Wistar divididas aleatoriamente em três grupos (Grupo Controle - GC, Grupo Quitosana - GQ e Grupo Homeopatia - GH, n=6). Foram confeccionadas feridas cutâneas e os animais foram tratados de acordo com o grupo ao qual pertenciam. Análises macroscópicas e microscópicas (três, sete e 14 dias) das feridas foram feitas. Macroscopicamente as feridas tratadas com Calendula 6 CH e Spray de Quitosana cicatrizaram em um menor tempo quando comparados ao GC. Microscopicamente foi possível observar que a Calendula 6 CH foi capaz de promover maior recrutamento de células mononucleares, apresentar fibroplasia no estágio inicial de cicatrização e promover formação de tecido conjuntivo denso espesso e organizado ao final de 14 dias, demonstrando superioridade aos demais tratamentos. O Spray de Quitosana se mostrou eficaz e superior na otimização da cicatrização de feridas em relação ao GC.

Palavras-chave: Homeopatia, Diabetes, Ferida, Quitina.

CALENDULA OFFICINALIS 6 CH AND CHITOSAN SPRAY ON SKIN WOUND HEALING IN DIABETIC RATS

Abstract

Wound healing is a complex process involving biochemical and physiological phenomena. Some factors may negatively interfere in this process, such as diabetes. Homeopathy appears as an indication that can ensure effectiveness and low cost of treatment. The objective of this study was to evaluate and compare the effect of Calendula officinalis 6 CH and Chitosan Spray on the healing of skin wounds in diabetic rats. random female Wistar rats were divided into three groups (Control Group - CG, Chitosan Group - GQ and Homeopathy Group - GH). skin wounds were made and the animals were treated according to the group to which they belonged. Macroscopic and microscopic analyzes of the wounds were made. Macroscopically the wounds treated with Calendula 6 CH and Chitosan Spray healed in less time when compared to the CG. Microscopically was observed that the Calendula 6 CH was able to promote increased recruitment of mononuclear cells present fibroplasia in the early stages of healing and promote formation of thick dense connective tissue and organized at the end of 14 days, demonstrating superiority to other treatments. The Spray Chitosan was effective and superior in optimizing wound healing compared to the control group.

Keywords: Homeopathy, Diabetes, Wound, Chitin.

Introdução

A cicatrização corresponde a um fenômeno altamente complexo e dinâmico de restauração de estruturas celulares e camadas teciduais, no intuito de preservar suas funções¹. É caracterizada pelo desenvolvimento de uma sequência de eventos interdependentes que envolvem as células de constituição do tecido e a matriz extracelular^{2,3}. Para que as etapas da cicatrização ocorram de forma adequada, deve existir um conjunto de condições que incluem boa perfusão tecidual⁴, ausência de debris, sistema imunológico e fibroblástico eficientes além de bom estado nutricional. Alguns fatores como a presença de sujidades, diabetes mellitus, uso prolongado de corticoides, infecções e radioterapia, podem influenciar negativamente o reparo cicatricial, retardando esse processo^{5,6}.

O diabetes é uma das doenças crônicas mais comuns no mundo, e sua importância e número de casos é crescente devido ao aumento da obesidade e sedentarismo⁷. As complicações do diabetes envolvem as interações entre os fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, células inflamatórias, e a matriz extracelular. A interrupção dessas interações prejudica a angiogênese e diminui a síntese de colágeno. Além disso, ocorre alteração na proliferação de fibroblastos e menor produção de fatores de crescimento retardando o reparo tecidual⁸. As feridas diabéticas ficam estagnadas na fase inflamatória, com contínuo influxo de neutrófilos que liberam enzimas citotóxicas, radicais livres e mediadores inflamatórios, que causam danos ao tecido^{9,10}. As feridas dos pacientes diabéticos começam de forma aguda, mas o processo de cura é prejudicado e a reparação não ocorre devido à hiperglicemia crônica, inflamação, disfunção macro e micro circulatória, hipóxia e neuropatia autônoma e sensorial⁹.

Apesar de existir no mercado inúmeras opções de medicamentos para feridas crônicas, a maioria dos produtos utilizados são importados, o que resulta em altos custos para o proprietário devido ao tratamento ser prolongado, sendo assim vários estudos estão sendo realizados na tentativa de encontrar tratamentos eficazes e com menor custo^{11,12}.

A homeopatia aparece com destaque no mundo globalizado e surge como uma alternativa que pode assegurar o baixo custo¹³. É uma ciência que foi elaborada por Samuel Hahnemann no século XVIII e se baseia em quatro noções: no princípio da similitude (semelhante cura semelhante), na investigação dos efeitos das substâncias em indivíduos saudáveis, na utilização do medicamento altamente diluído e na prescrição de medicamentos ajustados individualmente¹⁴. Atualmente, a homeopatia é considerada um ramo da medicina e da medicina veterinária, além de poder ser utilizada no tratamento de pestes agrícolas em

plantações^{14, 15}. Apesar de a homeopatia já ser bastante utilizada tanto em humanos como em animais, e de existir vários trabalhos que comprovam a sua eficácia em certos tratamentos há poucos estudos mostrando sua eficácia na cicatrização de feridas^{16, 17}.

A *Calendula officinalis* é uma planta herbácea anual que pertence à família botânica Asteraceae, possui cerca de 30-50 cm de altura, vêm sendo amplamente utilizada com finalidade medicinal, baseada durante muito tempo em conhecimentos empíricos, mas hoje sua utilização tornou-se embasada nos conhecimentos científicos. É muito usada como fitoterápico por sua ação cicatrizante, anti-inflamatória, antibacteriana e tranquilizante^{18, 19}. Também é utilizada na homeopatia e possui ação positiva sobre a cicatrização²⁰, porém não há na literatura trabalhos avaliando a eficácia do medicamento homeopático Calêndula 6 CH na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos.

A quitosana, um polissacárido linear obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, é considerada um biomaterial biocompatível e biodegradável^{21, 22}. É um medicamento alopático e por não apresentar efeitos adversos tem sido amplamente empregado na medicina e na medicina veterinária^{23, 24}. Diversos autores relatam suas propriedades antimicrobianas, cicatrizantes, hemostáticas e analgésicas^{12, 22, 25, 26}. Desta forma a quitosana é uma opção eficaz no tratamento de feridas em pacientes diabéticos¹².

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar e comparar o potencial terapêutico da Calêndula 6 CH e do Spray de Quitosana em feridas cutâneas de ratas diabéticas.

Material e Métodos

Todas as etapas do experimento foram realizadas de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e após a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás, sob protocolo nº 124/14.

A Calêndula 6 CH foi manipulada e fornecida pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. O spray de Quitosana foi fornecido pelo laboratório Medovent GmbH® (Heinz, Alemanha). O experimento foi conduzido na unidade de experimentação em roedores e lagomorfos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ-UFG). Foram utilizadas 54 ratas Wistar, adultas, pesando entre 180-200g. As ratas foram divididas aleatoriamente em três grupos: Grupo Homeopatia (GH), Grupo Quitosana (GQ) e Grupo Controle (GC). Cada grupo com 18 animais foi subdividido em três subgrupos contendo seis animais cada, de acordo com o tempo experimental para a análise microscópica da ferida (três, sete e 14 dias pós-operatório). Os animais do GC receberam sobre as feridas somente

solução fisiológica, as do GH receberam duas gotas de Calêndula 6 CH em solução de água destilada e as do GQ receberam uma borrifada do Spray de Quitosana. Os animais do GH receberam também quatro gotas de Calêndula 6 CH diluídas em sua água para consumo, os grupos GC e GQ receberam somente água.

Para indução do diabetes, os animais ficaram de jejum alimentar por 12h e posteriormente receberam uma única dose de Aloxana (120 mg/kg) diluída em solução fisiológica por via intraperitoneal. Após, permaneceram em jejum por mais quatro horas. 72h depois da aplicação de Aloxana foi realizada a dosagem glicêmica de cada rata por meio do kit comercial Contour TS (Bayer®). Foram considerados diabéticos os animais com glicemia maior que 300 mg/dL. A dosagem do nível glicêmico foi realizada semanalmente até o fim do experimento a fim de verificar a permanência do estado diabético.

O procedimento cirúrgico foi realizado na sala de técnica operatória da EVZ-UFG. Após a confirmação do diabetes, os animais foram submetidos à confecção das feridas cutâneas. Foi realizada a tricotomia e antissepsia da região dorsal às vertebrae torácicas e então foram feitas feridas com o auxílio de um punch para biópsia de 9 mm. Foi retirada a pele e tecido subcutâneo, ficando a fáscia muscular exposta. O protocolo anestésico utilizado na indução foi cetamina (80 mg/kg), midazolam (3 mg/kg) e cloridrato de tramadol (2 mg/kg) via intraperitoneal, para manutenção foi utilizado isoflurano. Após o procedimento os animais receberam cloridrato de tramadol (2 mg/kg) por via oral durante três dias a fim de garantir analgesia. Os curativos foram realizados a cada 24 horas, não sendo necessária sedação para a contenção dos animais.

A área da ferida foi fotografada a cada 48 horas e posteriormente foi determinada e analisada por meio do software Image J®.

Ao final do período de tratamento estabelecido para cada subgrupo (três, sete e 14 dias) os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de isoflurano no setor de Patologia da EVZ-UFG. A área da ferida cirúrgica foi dissecada e colocada em recipiente contendo formol a 10%. Com as amostras foram confeccionadas lâminas histológicas que receberam coloração de hematoxilina eosina. Foram avaliados os seguintes parâmetros: células mononucleares, polimorfonucleares, fibroplasia, tecido fibrovascular frouxo e denso, reepitelização, crosta, fibrose e neovascularização. Para a crosta foi atribuída a classificação presente ou ausente, para a reepitelização foram considerados: ausente, parcial e total. Para a neovascularização foi considerada a média do número de vasos encontrada em cada grupo. Para os demais parâmetros foram admitidos quatro escores: 0 (ausente), 1 (discreto, 1 a 25% do campo), 2 (moderado, 26 a 50% do campo) e 3 (acentuado, 51 a 100% do campo).

Os dados quantitativos referentes à redução da área das feridas foram analisados por Análise de Variância (ANOVA). Sendo a ANOVA significativa, foi realizado o teste Scott-Knott para duas médias. Para os dados referentes à avaliação microscópica foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Para todos os testes foi considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

A área das feridas foi obtida pelo software Image J® e foi calculada a porcentagem de redução da ferida nos dois, seis e 14 dias pós-operatório. Ao avaliar a evolução da contração da área da ferida no decorrer de 14 dias pode-se observar que nos 10 primeiros dias a redução no GQ ocorre de forma mais acentuada (Figura 1). Observamos também que do quarto ao décimo dia a contração da ferida no GH comporta-se de forma mais lenta que nos demais grupos voltando a acelerar após o décimo dia. Aos 12 dias os grupos GQ e GH se igualam.

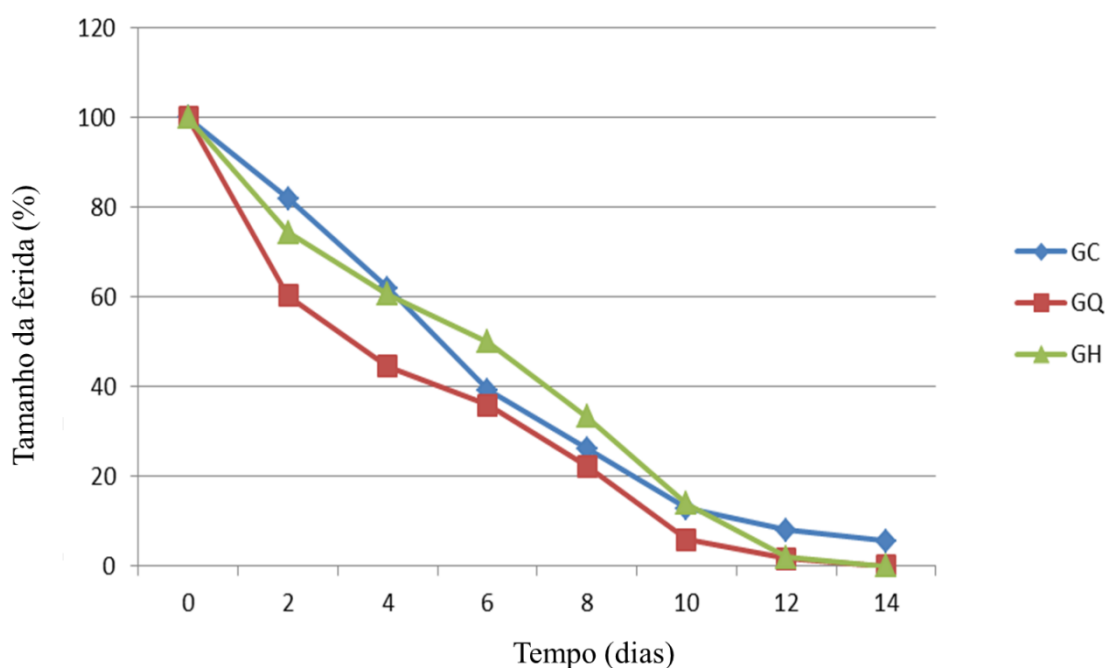


FIGURA 1 - Gráfico representativo da evolução da redução de feridas cutâneas em ratos Wistar diabéticos tratadas com solução salina 0,9% (GC), Spray de Quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH) no período de 14 dias.

Aos dois e seis dias não foram encontradas diferenças estatísticas na contração das feridas entre os três tratamentos pela ANOVA ($p > 0,05$). No dia 14 pós-operatório o GH e o GQ tiveram uma redução da ferida significativamente maior que a do GC (Tabela 1). Não houve diferença estatística entre os grupos GH e GQ (Figura 2).

TABELA 1- Porcentagem de contração da ferida em ratas Wistar diabéticas tratadas com solução salina 0,9% (GC), Spray de Quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH), 14 dias pós-operatório

Grupo	Média ± Desvio padrão
GC	94,29 ± 4,85 ^b
GQ	99,95 ± 0,10 ^a
GH	100 ± 0 ^a

a e b indicam diferença estatística entre os grupos. Nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

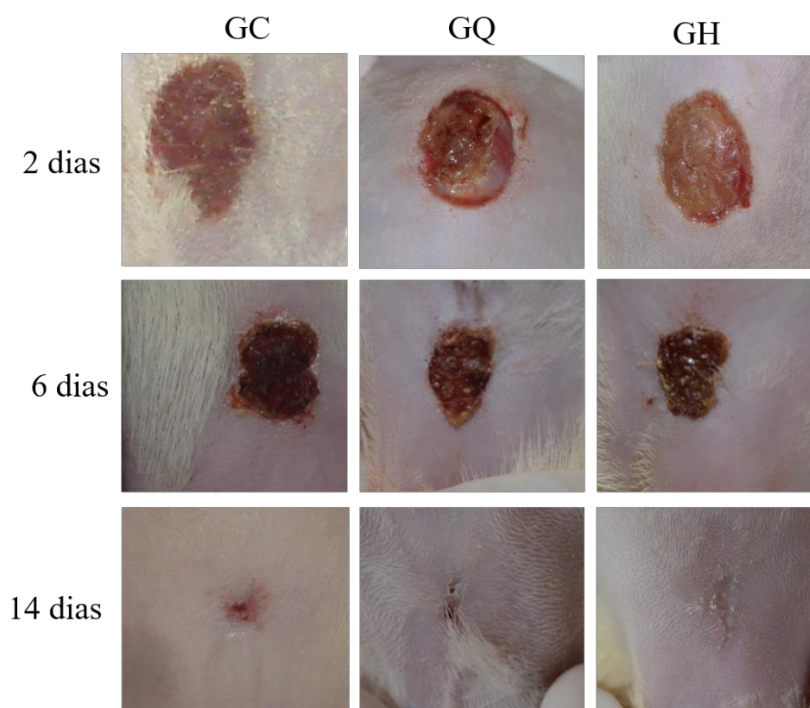


FIGURA 2 - Acompanhamento macroscópico da contração de feridas em ratas diabéticas aos dois, seis e 14 dias de pós-operatório. GC – Grupo Controle, GQ – Grupo Quitosana e GH – Grupo Homeopatia.

As lâminas histológicas foram analisadas de acordo com o período pós-operatório (três, sete e 14 dias) e os dados foram tabulados divididos em parâmetros relacionados à derme (superficial e profunda) e epiderme.

Considerando os parâmetros relacionados à epiderme, aos três dias foi possível observar presença de crosta e ausência de reepitelização em todos os grupos (Tabela 2). No sétimo dia somente o GH apresentou reepitelização total, enquanto que os GQ e GC apresentaram somente reepitelização parcial (Figura 3). Nesse mesmo período o GH foi o único a apresentar ausência de crosta. Aos 14 dias de pós-operatório não houve diferença entre os grupos, todos tiveram reepitelização total e ausência de crosta.

TABELA 2- Escores de lesões microscópicas observadas na epiderme de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), spray de quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH)

Grupos/ Tempo	Reepitelização total	Reepitelização parcial	Crosta
GC/3d	A	A	P
GQ/3d	A	A	P
GH/3d	A	A	P
GC/7d	A	P	P
GQ/7d	A	P	P
GH/7d	P*	A*	A*
GC/14d	P	A	A
GQ/14d	P	A	A
GH/14d	P	A	A

Escores: A=ausente; P= presente. * indica diferença estatística entre os grupos, na mesma coluna. Nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

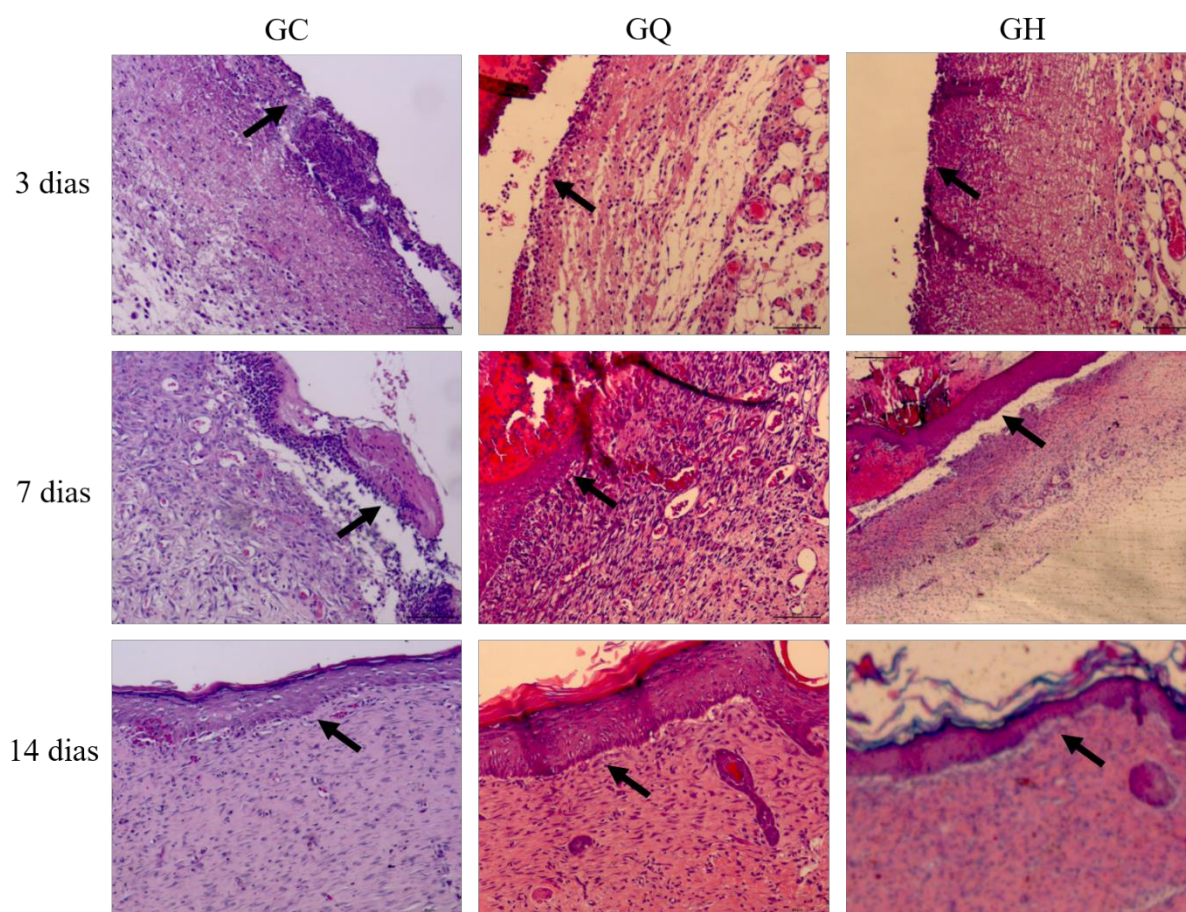


FIGURA 3 - Fotomicrografias (20X) da epiderme de feridas cutâneas de ratas diabéticas. Reepitelização ausente (seta preta) no terceiro dia pós-operatório nos animais do GC – Grupo Controle, GQ – Grupo Quitosana e GH – Grupo Homeopatia. Reepitelização parcial (seta preta) nos animais do GC e GQ no sétimo dia pós-operatório. Reepitelização total (seta preta) nos animais do GH no sétimo dia pós-operatório. Reepitelização total (seta preta) no 14º dia pós-operatório nos animais do GC, GQ e GH.

Na derme foram observados os seguintes parâmetros: células mononucleares, polimorfonucleares, fibroplasia, tecido fibrovascular frouxo e denso, fibrose e neovascularização. No terceiro dia pós-operatório foi observada presença acentuada de polimorfonucleares na derme superficial em todos os grupos, porém na derme profunda essas células se encontravam de forma discreta nos GQ e GH, diferenciando estatisticamente do GC (Tabela 3). As células mononucleares foram encontradas de forma discreta nos GQ e GH e ausentes no GC, na derme superficial. Na derme profunda o GH apresentou células mononucleares, fibroplasia e tecido fibrovascular frouxo de forma acentuada diferenciando dos demais tratamentos. Nesse período não foi encontrada presença de tecido fibrovascular denso e fibrose em todos os grupos. Não foi encontrada diferença estatística na contagem de vasos em nenhum dia de pós-operatório.

TABELA 3- Escores de lesões microscópicas observadas na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), spray de quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH), três dias pós-operatório

GRUPOS	REGIÃO	PMN	MN	FIBROP	TFVF	TFVD	FIBROSE	NV
GC	Superficial	3	0 ^a	0	0 ^a	0	0	9,68
	Profunda	2 ^a	1 ^c	1 ^a	1 ^c	0	0	
GQ	Superficial	3	1 ^b	0	0 ^a	0	0	6,92
	Profunda	1 ^b	2 ^{cd}	1 ^a	1 ^c	0	0	
GH	Superficial	3	1 ^b	1	1 ^b	0	0	10,08
	Profunda	1 ^b	3 ^d	3 ^b	3 ^d	0	0	

PMN: células polimorfonucleares; MN: células mononucleares; FIBROP: fibroplasia; TFVF: tecido fibrovascular frouxo; TFVD: tecido fibrovascular denso; NV: neovascularização (média de vasos presentes). Escores: 0=ausente; 1= discreto; 2=moderado; 3= acentuado. Números seguidos por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Aos sete dias foi observada presença de polimorfonucleares de forma moderada a acentuada na derme superficial e discreta na derme profunda de todos os grupos (Tabela 4). As células mononucleares foram encontradas de forma acentuada na derme superficial de todos os tratamentos, porém na derme profunda somente os GQ e GH tiveram essas células de forma acentuada enquanto o GC apresentou de forma moderada. A fibroplasia e o tecido fibrovascular frouxo foram encontrados de forma mais acentuada nos GQ e GH que no CG tanto na derme superficial como na derme profunda.

TABELA 4- Escores de lesões microscópicas observadas na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), spray de quitosana (GQ) e Calendula 6 CH (GH), sete dias pós-operatório

GRUPOS	REGIÃO	PMN	MN	FIBROP	TFVF	TFVD	FIBROSE	NV
GC	Superficial	Variou de 2 (50%) a 3 (50%)	3	2 ^a	2 ^a	0	0	14,48
	Profunda	1	2 ^a	2 ^c	2 ^c	0	0	
GQ	Superficial	3	3	3 ^b	3 ^b	1	0	15,84
	Profunda	1	3 ^b	3 ^d	3 ^d	1	0	
GH	Superficial	Variou de 2 (50%) a 3 (50%)	3	3 ^b	3 ^b	1	0	22,64
	Profunda	1	3 ^b	3 ^d	3 ^d	1	0	

PMN: células polimorfonucleares; MN: células mononucleares; FIBROP: fibroplasia; TFVF: tecido fibrovascular frouxo; TFVD: tecido fibrovascular denso; NV: neovascularização (média de vasos presentes). Escores: 0=ausente; 1= discreto; 2=moderado; 3= acentuado. Números seguidos por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No 14º dia pós-operatório não foi encontrada presença de polimorfonucleares na derme em todos os tratamentos. As células mononucleares foram encontradas de forma discreta na derme superficial em todos os grupos e de forma moderada na derme profunda somente no GQ. A fibroplasia no GC foi maior tanto na derme superficial quanto na profunda em relação aos demais grupos que a apresentaram de forma discreta, diferenciando estatisticamente. O GH apresentou de forma moderada a discreta presença de tecido fibrovascular denso na derme superficial e profunda, e foi o único tratamento a ter fibrose de forma acentuada, diferenciando estatisticamente dos demais grupos.

TABELA 5- Escores de lesões microscópicas observadas na derme superficial e profunda de ratas Wistar diabéticas tratados com solução salina 0,9% (GC), spray de quitosana (GQ) e calendula 6 CH (GH), 14 dias pós-operatório

GRUPOS	REGIÃO	PMN	MN	FIBROP	TFVF	TFVD	FIBROSE	NV
GC	Superficial	0	1	2 ^a	0	3 ^a	0 ^a	13,92
	Profunda	0	1 ^a	2 ^a	0	3 ^c	0 ^c	
GQ	Superficial	0	1	1 ^b	0	3 ^a	1 ^{ab}	15,12
	Profunda	0	2 ^b	1 ^b	0	2 ^{cd}	0 ^c	
GH	Superficial	0	1	1 ^b	0	2 ^b	3 ^b	14,88
	Profunda	0	1 ^a	1 ^b	0	1 ^d	3 ^d	

PMN: células polimorfonucleares. MN: células mononucleares; FIBROP: fibroplasia; TFVF: tecido fibrovascular frouxo; TFVD: tecido fibrovascular denso; NV: neovascularização (média de vasos presentes). Escores: 0=ausente; 1= discreto; 2=moderado; 3= acentuado. Números seguidos por letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Discussão

O protocolo de indução ao diabetes foi o mesmo utilizado por Duarte et al.²⁷ e Dias¹², utilizando Aloxana (120 mg/kg) e está de acordo com as orientações de Radenković et al.²⁸. Vários autores encontraram problemas na utilização da Aloxana, como resistência e reversão da indução e óbito de animais¹². Porém neste estudo somente um animal foi resistente à indução, tendo que ser substituído e não houve nenhum óbito durante a pesquisa, portanto o protocolo se mostrou eficiente.

Não houve necessidade de proteção da área da ferida, pois os animais foram acondicionados em gaiolas contendo duas ratas separadas por divisória transparente, evitando que um animal entrasse em contato com a ferida do outro.

Pouco se sabe sobre como os medicamentos homeopáticos atuam no organismo. Existem poucos estudos utilizando a Calêndula na forma homeopática para a cicatrização de feridas. Vannier e Poirier²⁹ citam esse medicamento para uso externo e interno em todas as feridas traumáticas e afirmam que sua utilização otimiza a cicatrização. Vijnovsky²⁰ afirma que ela deve ser utilizada simultaneamente de forma interna e externa e a indica para qualquer tipo de ferida. Pinto³⁰ utilizou a Calêndula de forma tópica na ferida cirúrgica de ovariectomia em cadelas e relatou que o medicamento foi eficaz e de baixo custo. Porém não foram encontrados na literatura trabalhos avaliando microscopicamente a ação da *Calendula officinalis* 6 CH em feridas cutâneas de difícil cicatrização. Neste trabalho utilizamos a *Calendula officinalis* na potência cH6 em solução de água destilada, manipulada de acordo com as normas da Farmacopéia Brasileira³¹. A quitosana já possui efeito cicatrizante comprovado cientificamente. Sabe-se que ela atua em todas as fases da cicatrização, ativando macrófagos, fibroblastos, polimorfonucleares e angiogênese. Por isso a sua escolha para comparar com o medicamento homeopático.

No acompanhamento macroscópico da evolução da cicatrização foi possível observar a superioridade dos tratamentos quitosana e homeopatia em relação ao grupo controle ao final de 14 dias, pois 100% dos animais tratados com homeopatia e 99,95% dos animais que receberam spray de quitosana já tinham suas feridas completamente cicatrizadas enquanto mais de 5% dos animais do CG ainda apresentavam área de ferida não cicatrizada. Não houve diferença estatística entre o GQ e o GH. A capacidade da quitosana em otimizar a cicatrização de feridas em pacientes diabéticos já havia sido demonstrada anteriormente na forma de gel, filmes,

membranas e esponjas, porém não foram encontrados trabalhos na literatura que a utilizassem na forma de spray.

Microscopicamente observou-se que não houve diferença estatística na neovascularização entre os grupos, apesar de os tratamentos homeopatia e quitosana terem apresentado maior quantidade de vasos que o grupo controle. Dias¹² obteve resultado semelhante avaliando um gel de quitosana a 2%. Tal fato está relacionado à dificuldade da macro e micro vascularização e diminuição de neovasos no leito da ferida em pacientes diabéticos^{12, 32}.

Os animais tratados com a homeopatia apresentaram reepitelização total da epiderme com apenas sete dias o que demonstra um avanço na cicatrização em comparação aos demais grupos que apresentaram reepitelização parcial. Alguns autores^{12,33} encontraram resultados semelhantes para a quitosana nesse mesmo período, porém nesses trabalhos a quitosana havia se mostrado superior ao grupo controle, o que não foi observado neste trabalho. No GH foi observado também na derme profunda logo no terceiro dia de pós-operatório, células mononucleares, fibroplasia e tecido fibrovascular frouxo de forma acentuada diferenciando dos demais tratamentos indicando que este grupo estava em fase mais adiantada da cicatrização. As células mononucleares como macrófagos e linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente 48 horas após a lesão e começam a limpar os detritos e bactérias e ficam até a conclusão do estágio inflamatório, além disso a presença local de macrófagos intensifica a migração e ativação de fibroblastos que são os principais componentes do tecido de granulação^{6, 34}. Para Rodero e Khosrotehrani³⁵ os macrófagos parecem ter papéis diferentes em cada fase da cicatrização, adaptando a sua produção de citocinas e sendo assim uma peça chave em feridas crônicas, por isso há a necessidade de caracterizar ainda mais esta população.

No terceiro dia o GQ apresentou células polimorfonucleares de forma acentuada e fibroplasia ausente na derme superficial. Gopal et al.³⁶ avaliando a quitosana em feridas cutâneas em ratos encontraram resultados semelhantes. Animais tratados com quitosana mostraram grande infiltração de células inflamatórias e pouca deposição de fibroblastos.

Aos sete dias pós-operatório os grupos Q e H apresentaram fibroplasia e presença de tecido fibrovascular frouxo de forma acentuada diferenciando do grupo controle que apresentou de forma moderada, o que demonstra novamente superioridade dos tratamentos homeopatia e quitosana sobre o GC, pois os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação, e responsáveis pela produção de colágeno³⁴. Gopal et al.³⁶ também encontraram grande reação inflamatória e proliferação de fibroblastos nesse mesmo período em feridas cutâneas de ratos tratados com quitosana.

No 14º dia pós-operatório apenas o GH apresentou fibrose na derme profunda e superficial enquanto o GC não teve presença de fibrose e o GQ teve presença discreta apenas na derme superficial. O GH foi o único a apresentar fibroblastos fusiformes e tecido conjuntivo denso espesso e organizado demonstrando ter favorecido a cicatrização das feridas e foi superior aos demais tratamentos.

Conclusões

Pode-se concluir que a *Calendula officinalis* 6 CH foi capaz de promover o recrutamento de células polimorfonucleares e mononucleares, apresentar fibroplasia no estágio inicial de cicatrização e promover formação de tecido conjuntivo denso espesso e organizado ao final de 14 dias, demonstrando superioridade ao grupo Controle e ao grupo Qitosana. O spray de quitosana se mostrou eficaz e superior na otimização da cicatrização de feridas em relação ao grupo controle.

Referências

1. Maquart FX, Monboisse JC. Extracellular matrix and wound healing. *Pathol Biol.* 2014;62:91–5.
2. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care.* 2012;25(7):304-14.
3. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49:35-43.
4. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25:19-25.
5. Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery.* 2011;29(10):475–9.
6. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clin Plast Surg.* 2012;39:85-97.
7. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94:311-21.
8. Tsourdi E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. *Biomed Res Int.* 2013;2013:1-6.
9. Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights. *Adv Ther.* 2014;31:817-36.
10. Kant V, Gopal A, Pathak NN, Kumar P, Tandan SK, Kumar D. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int Immunopharmacol.* 2014;20(2):322-30.
11. Ferreira E, Lucas R, Rossi LA, Andrade D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. *Rev Esc Enferm USP.* 2003;37(1):44-51.
12. Dias TA. Gel de Quitosana à 2% na cicatrização de feridas cutâneas em ratas diabéticas. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2012.
13. Coelho MCOC, Almeida EL, Tenório AP, Cavalcante-Jr H, Silva SZ. Processo cicatricial utilizando Staphisagria e Penicilina após rumenotomia experimental em caprinos. *Bra Homeopathy J.* 1998;4(1):500-4.
14. Teixeira MZ. Homeopathy: science, philosophy and art of cure. *Rev Med São Paulo.* 2006;85(2):30-43.
15. Rosenbaum P. Fundamentos de homeopatia para estudantes de medicina e de ciências da saúde. São Paulo: Roca; 2002. 480p.

16. Alecu A, Alecu M, Mărcus G, Brezeanu R, Cojocaru A. Effect of the homeopathic remedies *Arnica montana* and *Staphisagria* on the time of healing of surgical wounds. *Cult. homeopát.* 2007(20):19-21.
17. Castro FC, Magre A, Cherpinski R, Zelante PM, Neves LM, Esquisatto MA, Mendonça FA, Santos GM. Effects of microcurrent application alone or in combination with topical *Hypericum perforatum* L. and *Arnica montana* L. on surgically induced wound healing in wistar rats. *Homeopathy.* 2012;101(3):147-53.
18. Parente LML, Paula JR, Costa EA, Silveira NA. *Calendula officinalis*: características, propriedades químicas e terapêuticas. *Arq Cien Saude UNIPAR.* 2002;6(2):165-9.
19. Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract.* 2012;18(3):173-6.
20. Vijnovsky B. *Tratado de matéria médica homeopática.* Buenos Aires: AMHA; 1978.
21. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31:603–32.
22. Ahmed S, Ikram S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achievements in the Life Sciences.* 2016: 1-11.
23. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(10):1467–80.
24. Choi C, Nam J, Nah J. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials. *J Ind Eng Chem.* 2016;33:1–10.
25. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol.* 2009;3(2):203-30.
26. Chien R, Yen M, Mau J. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydr Polym.* 2016;138:259–64.
27. Duarte VMG, State University of Paraíba B, Rodrigues AdS, Hospital São José B, Rezende LAd, Preto UoR, et al. Relationship between oxidative stress and diabetic osteopenia in premenopausal rats. *Braz J Pharm Sci.* 2010;46(3):539-49.
28. Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;78:13–31.
29. Vannier L, Poirer J. *Tratado de Matéria Médica Homeopática.* São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda; 1987. 446 p.
30. Pinto LF. Homeopathic pos-surgical protocol of radical mastectomy in canine and feline. *Bra Homeopathy J.* 2000;6:18-21.
31. *Farmacopéia homeopática brasileira.* 3ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

32. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37:81-90.
33. Bitao Lu TW, Zhiquan Li, Fangying Dai, Lingmei Lv, Fengling Tang, Kun Yu, Jiawei Liu, Guangqian Lan. Healing of skin wounds with a chitosan–gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. 2016;82:884–91.
34. Harper D, Young A, McNaught C. The physiology of wound healing. *Surgery*. 2014;32(9):445–50.
35. Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010;3(7):643-53.
36. Gopal A, Kant V, Gopalakrishnan A, Tandan SK, Kumar D. Chitosan-based copper nanocomposite accelerates healing in excision wound model in rats. *Eur J Pharmacol*. 2014;731:8-19.

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A homeopatia foi desenvolvida por Hahnemann no século XVIII, mas até hoje pouco se sabe sobre como ela atua no organismo. Na Medicina Veterinária ainda é pouco utilizada e uma das considerações feitas pelos clínicos é a falta de literatura científica que comprove sua eficácia.

Neste trabalho a *Calendula officinalis* 6 CH se mostrou eficaz na cicatrização de feridas em ratas diabéticas. Os resultados aqui apresentados abrem perspectiva para novas avaliações. É necessário avaliar mais detalhadamente as populações de células envolvidas na resposta gerada pelo medicamento homeopático. É importante lembrar também que a *Calendula officinalis* pode ser manipulada e prescrita em várias outras potências (3 CH, 12 CH, 30 CH, 100 CH, etc.) e que deve então ser avaliada se há diferença na cicatrização para cada potência e qual seria a mais adequada.

A quitosana já tem efeito cicatrizante comprovado, mas seu uso em forma de spray é pouco relatado. Neste estudo a quitosana se mostrou eficaz na cicatrização de feridas crônicas, corroborando com a literatura.

O custo do tratamento de feridas crônicas pode ser bastante elevado devido ao uso de fármacos importados e também por se tratar de um tratamento muitas vezes prolongado. O medicamento homeopático aparece como uma importante alternativa, pelo fácil acesso, pois pode ser manipulado em qualquer farmácia de manipulação homeopática, desde que tenha sido prescrito e também pelo baixo custo.

São necessários novos estudos avaliando o medicamento homeopático *Calêndula* na cicatrização de feridas.