

Diego Valentim

*Avaliação da resposta tecidual de extratos de araçá
(*Psidium Cattleianum*) associado ao hidróxido de cálcio.
Análise edemogênica e histológica em ratos.*

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Araçatuba, para obtenção do
título de MESTRE em Ciência
Odontológica – Área de Concentração:
Endodontia.*

Orientador: Prof. Adj. Eloí Dezan Júnior

Araçatuba

2013

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais ***Horácio Luiz da Silva Valentim e Solange Francisca Fernandes Valentim***, pelo amor, paciência, carinho e apoio incondicional. Obrigado pela ajuda incansável para que mais este sonho se tornasse realidade! Amo vocês!

Ao meu amor ***Priscila Leiko Watanabe***, pelo carinho, companheirismo, compreensão e apoio em todos os momentos!

Agradecimentos Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus

Pela presença constante na minha vida. Pelo auxílio nas minhas escolhas e me confortar nas horas difíceis!

Ao Professor Eloi Dezan Junior

Pela orientação, competência científica e amizade. Obrigado pela disponibilidade, apoio, correções, ensinamentos, conselhos e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho!

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” – UNESP, nas pessoas dos professores Dra. Ana Maria Pires Soubhia, digníssima diretora e Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo vice–diretor, pelo apoio. Muito Obrigado!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, muito obrigado! E aos seus docentes que lecionaram durante meu curso de Mestrado. Obrigado pelos conhecimentos compartilhados!

Aos professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Eloi Dezan Júnior, Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra, Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho, Prof. Dr. Mauro Juvenal Nery, Prof. Dr. José Arlindo Otoboni Filho, Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, Prof. Dr. Roberto Holland e Prof. Dr. Valdir de Souza, pela permissão da utilização do laboratório da disciplina de Endodontia. Obrigado pelo apoio, aprendizado e amizade!

Ao Professor Dr. Renato Nicolás Hoop pelo apoio, amizade e aos conselhos sempre oportunos. Muito obrigado!

Aos meus amigos de turma, Renata Oliveira Samuel, Aguinaldo Cândido da Silva Facundo, Índia Olinta de Azevedo Queiroz. Obrigado pela convivência, amizade e apoio!

À amiga Annelise Carrara Katrine Prieto, pela amizade, carinho, paciência, horas de conversa e apoio. Obrigado!

Aos amigos do curso de Endodontia, Ludmila Santos de Oliveira, Paulo Carvalho Tobias Duarte, Loiane Massunari, Marcelo Wayamma, Mariane Maffei Azuma, Luciana Louzada Ferreira, Simone Watanabe e Carla Sipert, pela amizade e carinho. Obrigado pela troca de experiências e apoio!

Aos demais colegas de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Obrigado!

Aos alunos de iniciação científica Camilla Pires Bruno e Gustavo Arcos Lopes pelo auxílio, apoio e amizade. Muito obrigado!

Aos funcionários da disciplina de Endodontia, Nelci Vieira, Cláudia Neves Corrêa, Grazielle Lourenço Dourado, Neuza Angélica dos Santos e Peterson Moura, pela amizade, carinho e total apoio para realização deste trabalho. Muito Obrigado!

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, Ana Paula Rímoli de Oliveira, Cláudio Hideo Matsumoto, Cláudio Maciel Júnior, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Luis Cláudio Sedlacek, Luzia Anderlini e Maria Cláudia de Castro Benez, pela paciência e disposição. Obrigado!

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Cristiane Regina Lui Matos, Diogo Luís Reatto, Lilian Sayuri Mada, Marina Midori Sakamoto Kawagoe e Valéria de Queiroz M. Zagatto. Obrigado pela atenção, paciência e apoio!

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Alan Roger Cenerine Carvalho, Camilo Roberto Venâncio e João Batista Alves Correa, pelo apoio e auxílio no tratamento dos animais!

À FAPESP e a CAPES, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho!

Muito Obrigado!!

Resumo

Valentim, D. Avaliação da resposta tecidual de extratos de araçá (*Psidium Cattleianum*) associado ao hidróxido de cálcio. Análise edemogênica e histológica em ratos. [Dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

Extratos de folhas de araçá (*Psidium cattleianum*) são biocompatíveis e quando associados ao hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2] inibe o *Enterococcus faecalis* em 24 horas. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual dos extratos da folha de araçá associado com Ca(OH)_2 , por meio da análise edemogênica e histológica. Foram utilizados 80 ratos machos (Wistar) pesando entre 200g e 280g. Para a análise edemogênica foram utilizados 30 animais divididos em 3 grupos [Extrato aquoso + Ca(OH)_2 (A), Extrato etanólico + Ca(OH)_2 (B), Propilenoglicol + Ca(OH)_2 (C)], com 10 animais sendo 5 para cada período de 3 e 6 horas. Sob anestesia geral foram injetados 0,2ml/100g de massa corporal de Azul de Evans a 1% na veia peniana, após 30 minutos foi injetado no subcutâneo da região dorsal cada associação a ser avaliada. A análise edemogênica foi realizada por meio de espectrofotometria ($\lambda=630\text{nm}$) após 3 e 6 horas. Para análise da reação inflamatória foram utilizados 50 ratos, que receberam quatro tubos de polietileno contendo os grupos experimentais citados anteriormente e um grupo controle (tubo vazio). Os períodos de avaliação foram de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. As lâminas obtidas foram analisadas na coloração de Hematoxilina e Eosina atribuindo-se escores para intensidade da resposta tecidual. Observou-se que para a análise edemogênica a associação do extrato etanólico ao Ca(OH)_2 mostrou no período de 3 horas maior edema em comparação aos outros grupos ($p<0,05$). No período de 6 horas os grupos não apresentaram diferença significativa. Para a análise histológica foi observada evolução do reparo ao longo do tempo ($p<0,05$), os extratos aquoso e etanólico apresentaram resposta semelhante aos grupos controle e Ca(OH)_2 + propilenoglicol. Pode-se concluir que a utilização de extratos de araçá como veículo do Ca(OH)_2 apresentam resposta tecidual favorável assim como o propilenoglicol associado ao Ca(OH)_2 .

Palavras-chave: Endodontia, teste de materiais, extratos vegetais

Abstract

Valentim, D. Evaluation of tissue response of extracts of araçá (*Psidium cattleianum*) associated with calcium hydroxide. Edemogenic and histological analysis in rats. [Dissertação]. Araçatuba: São Paulo State University; 2013.

Leaf extracts from 'araçá' (*Psidium cattleianum*) are biocompatible and when combined with calcium hydroxide [Ca (OH) ₂] inhibits *Enterococcus faecalis* in 24 hours. This study aimed to evaluate the tissue response of the 'araçá' leaf extracts associated to Ca(OH)₂ by edemogenic and histological analysis. Eighty male wistar rats weighing between 200 and 280g were used in this study. For edemogenic analysis, 30 animals were divided in 3 groups (n=10) – (a) aqueous 'araçá' extract + Ca(OH)₂; (b) ethanolic extract + Ca(OH)₂; (c) propylene glycol + Ca(OH)₂. Half of the specimens were evaluated after 3 hours and half after 6 hours. Under general anesthesia, 0,2ml/100g body weight of 1% Evans blue were injected in the penile vein. After 30 minutes, each studied substance was injected in the subcutaneous. Edemogenic analysis was performed through spectrophotometry ($\lambda=630\text{nm}$) after 3 and 6 hours. For the inflammatory reaction evaluation, 50 rats were used. Each rat received 4 polyethylene tubes containing the studied substances and one empty tube (control). Evaluation periods were 7, 15, 30, 60 and 90 days. The tissues were stained with Hematoxylin and Eosin and scores were attributed for intensity of tissue response. The association of ethanolic extract to Ca(OH)₂ presented larger edema after 3 hours than the other groups ($p<0.05$). After 6 hours there was no significant difference. On the histological analysis, an evolution on tissue repair was observed over time. The extract groups presented similar response to the Ca(OH)₂ + propylene glycol and control. In conclusion that the use of guava extract as vehicle of Ca (OH)₂ exhibit favorable tissue response as well as propylene associated with Ca (OH)₂.

Keywords: Endodontics, materials test, vegetable extracts

Lista de figuras e gráficos

Lista de gráficos e figuras

Tabela 1 – Média dos valores de absorvância em ambos os períodos 33
estudados de 3 e 6 horas.

Figura 1 – Representação gráfica do valor médio do edema em 33
ambos os períodos de tempo estudados, 3 e 6 horas

Figura 2 – Representação gráfica da posição ocupada pelas 34
pontuações médias dos grupos nos 4 períodos estudados.

Figura 3 – Análise histológica de todos os grupos experimentais nos 35
tempos pós-operatório de 7, 15, 30, 60 e 90 dias (Hematoxilina e
Eosina, 100x)

Sumário

Sumário

Introdução	16
Proposição	20
Artigo	22
Resumo	23
Introdução	24
Material e métodos	25
Resultados	27
Discussão	28
Referências	30
Tabela e figuras	33
Referências Gerais	36
Anexos	40
1 – Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)	41
2 – Procedimentos cirúrgicos da Análise Edemogênica	42
3 – Procedimentos cirúrgicos da Análise Microscópica	44
4 – Técnicas para inclusão em Glicol Metacrilato, coloração em Hematoxilina e Eosina	46

Introdução

Introdução

A odontologia vem alcançando grandes avanços técnico-científicos ao longo dos anos. As técnicas estão sendo aprimoradas, surgem novas maneiras de se realizar um procedimento, ocorre uma evolução em todos os sentidos. Na endodontia não é diferente, faz-se necessário o aperfeiçoamento, e a descoberta de novas técnicas e de novos materiais objetivando o maior índice de sucesso endodôntico (1,2,3).

A participação dos microrganismos, seus produtos e subprodutos, na doença pulpar e periapical têm sido amplamente comprovada (4-7). Sua presença em dentes com necrose pulpar e lesão periapical, bem como em dentes com infecções persistentes ou refratárias ao tratamento endodôntico é observada em todo o sistema de canais radiculares (8).

A elevada prevalência de microrganismos anaeróbios Gram negativos, a grande concentração de endotoxinas e suas implicações na região periapical, associado aos microrganismos aeróbios, microaerófilos e as bactérias Gram positivas, podem resultar em uma agudização do processo (9).

Com a finalidade de eliminar esses microrganismos, muitos medicamentos têm sido propostos ao longo dos anos, como o paramonoclorofenol canforado (PMCC), os derivados fenólicos, os aldeídos e os esteróides em combinação com os antibióticos, mostrando-se todos insatisfatórios do ponto de vista biológico e antimicrobiano (8).

Para controle das infecções endodônticas, o hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , é uma medicação amplamente empregada, visto que seu elevado pH (12.6), é capaz de alterar a integridade da membrana citoplasmática bacteriana através de efeitos tóxicos gerados durante a transferência de nutrientes ou através da destruição de fosfolípidios de ácidos graxos insaturados., além da capacidade de ativação de enzimas do tecido que favorecem sua restauração através da mineralização. (10).

Devido ao Ca(OH)_2 agir por contato direto sua ação pode tornar-se prejudicada frente a microrganismos que tem a capacidade de penetrar profundamente nos túbulos dentinários (11). Outro fator a ser considerado é o

tempo de contato, sendo necessário mais de 7 dias para sua ação frente a alguns microrganismos (12). Alguns microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* ainda podem resistir a sua ação (13-16).

A utilização do extrato etanólico de araçá como veículo do hidróxido de cálcio potencializou sua atividade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*, produzindo inibição total em 24 horas (17).

Devido a divergência de resultados sobre a resistência dos microrganismos ao Ca(OH)_2 , há a busca por veículos ou produtos com a finalidade melhorar e/ou potencializar suas propriedades.

A evolução dos estudos envolvendo plantas medicinais que visam a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas tem avançado ao longo dos anos. Podendo ser observado pelo crescente aumento de trabalhos publicados sobre produtos naturais ativos (18).

O araçá, *Psidium cattleianum*, pertence à família *Myrtaceae*, comumente encontrado na América tropical sendo conhecido como araçá-do-campo ou araçá comum. Trata-se de um arbusto grande, da mesma família da goiabeira (*Psidium guava*), cresce bem em vários tipos de solos e não é exigente quanto ao clima (19,20). *Psidium spp* são usadas para o tratamento do escorbuto na Ásia e África (21), para tratamento de tosse e doenças pulmonares na Bolívia e Egito (22), usado como anti-diarréico no México, e como antiinflamatório e agente hemostático na China (23,24). Sua fruta possui potencial antidiabético causando inibição R-glucosidase elevada (25). Já sua folha pode reduzir a metástase de células cancerígenas do pulmão e pode ser vantajosamente usada para controlar o processo metastático (26).

Os extratos da folha de araçá (*Psidium cattleianum*), folha da aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*) e folha da guajuvira (*Patagonula americana*), além da casca de jacarandá (*Platypodium elegans*) apresentaram atividade inibitória frente a microrganismos como *Streptococcus mutans*, anaeróbios como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, microaerófilos como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecalis*. As preparações etanólicas e aquosas mostraram a mesma atividade antimicrobiana em todas as modalidades de testes realizados, o que indica que o princípio ativo pode ser extraído por métodos simples, empregando-se água ou etanol como líquido extrator sem prejuízo para a atividade antimicrobiana (27).

Os extratos da folha de araçá também atuam na redução das expressões protéicas envolvidas com o metabolismo, glicólise e produção de ácido láctico do *Streptococcus mutans*, e diminuem o crescimento de *Streptococcus mutans* em biofilme de ratos e a desmineralização de esmalte (28).

Segundo Machado et al em 2008 (29), os extratos vegetais aquoso e etanólico de araçá apresentaram-se biocompatíveis, com resposta semelhante ao soro fisiológico e potencial para uso em odontologia. Dezan Jr et al. em 2010 (17) avaliaram a atividade antimicrobiana da associação dos extratos aquoso e etanólico de araçá ao hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*, em tubos de dentina, pela metodologia descrita por Ørstavik e Haapasalo em 1990 (13), e concluíram que ambos os extratos apresentaram maior poder antimicrobiano quando comparado à associação do Ca(OH)_2 e água destilada. O extrato etanólico associado ao hidróxido de cálcio apresentou atividade antimicrobiana máxima já no período de 24 horas (17).

A associação de extratos de araçá ao hidróxido de cálcio apresenta potencial para utilização clínica devido a excelente atividade antimicrobiana, entretanto sua resposta tecidual ainda é desconhecida, se fazendo necessária a sua avaliação.

Proposição

Proposição

O objetivo deste estudo foi analisar a resposta tecidual, dos extratos aquoso e etanólico de araçá (*Psidium cattleianum*) associados ao Ca(OH)_2 , por meio da análise edemogênica e histológica, em subcutâneo de ratos.

Artigo

Artigo

Resposta tecidual da associação dos extratos vegetais da folha de araçá (*Psidium Cattleianum*) ao Ca(OH)_2

Resumo

Extratos de folhas de araçá (*Psidium cattleianum*) são biocompatíveis e quando associados ao hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2] inibe o *Enterococcus faecalis* em 24 horas. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual dos extratos da folha de araçá associado com Ca(OH)_2 , através da análise edemogênica (teste edemogênico) e da reação inflamatória em subcutâneo (análise histológica). Foram utilizados 80 ratos machos (Wistar) pesando entre 200g e 280g. Para a análise edemogênica foram utilizados 30 animais divididos em 3 grupos [Extrato aquoso + Ca(OH)_2 (A), Extrato etanólico + Ca(OH)_2 (B), Propilenoglicol + Ca(OH)_2 (C)], com 10 animais sendo 5 para cada período de 3 e 6 horas. Sob anestesia geral foram injetados 0,2ml/100g de massa corporal de Azul de Evans a 1% na veia peniana, após 30 minutos foi injetado no subcutâneo da região dorsal cada associação a ser avaliada. A análise edemogênica foi realizada por meio de espectrofotometria ($\lambda=630\text{nm}$) após 3 e 6 horas. Para análise da reação inflamatória foram utilizados 50 ratos, que receberam quatro tubos de polietileno contendo os grupos experimentais citados anteriormente e um grupo controle (tubo vazio). Os períodos de avaliação foram de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. As lâminas obtidas foram analisadas na coloração de Hematoxilina e Eosina atribuindo-se escores para intensidade da resposta tecidual. Observou-se que para a análise edemogênica a associação do extrato etanólico ao Ca(OH)_2 mostrou no período de 3 horas maior edema em comparação aos outros grupos ($p<0,05$). No período de 6 horas os grupos não apresentaram diferença significativa. Para a análise histológica foi observada evolução do reparo ao longo do tempo ($p<0,05$), os extratos aquoso e etanólico apresentaram resposta semelhante aos grupos controle e Ca(OH)_2 + propilenoglicol. Pode-se concluir que a utilização de extratos de araçá como veículo do Ca(OH)_2 apresentam resposta tecidual semelhante ao Ca(OH)_2 com propilenoglicol.

Palavras-chave: Inflamação, edema, plantas medicinais, extratos vegetais

Introdução

Os microrganismos, seus produtos e subprodutos, estão presentes na doença pulpar e periapical (1-4), podendo ser encontrados em dentes com necrose pulpar, infecções persistentes ou refratárias e em todo o sistema de canais radiculares (5,6).

Com a finalidade de eliminar os microrganismos, muitos medicamentos têm sido testados ao longo dos anos, sendo o hidróxido de cálcio uma das medicações empregada como curativo de demora (7,8). O Ca(OH)_2 age por contato direto e sua ação pode tornar-se prejudicada frente a microrganismos com capacidade de penetrar profundamente nos túbulos dentinários (9).

Outro fator a ser considerado é o tempo de contato. Sjogren et al em 1991 (10) mostraram ser necessários períodos a partir de 7 dias para se obter uma maior eficácia. Com isso destacam-se alguns microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* mais resistentes à sua ação (6,11-13).

A utilização do extrato etanólico de araçá como veículo do hidróxido de cálcio potencializou sua atividade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*, produzindo inibição total em 24 horas (14).

Devido a divergência de resultados sobre a resistência dos microrganismos ao Ca(OH)_2 , há a busca por veículos ou produtos com a finalidade melhorar e/ou potencializar suas propriedades.

O araçá, *Psidium cattleianum*, pertence à família *Myrtaceae* e é comumente encontrado na América tropical sendo conhecido como araçá-do-campo ou araçá comum. (15, 16). *Psidium spp* são usadas para o tratamento de várias enfermidades como o escorbuto (17), tosse e doenças pulmonares (18), antiinflamatório e agente hemostático (19,20) além de reduzir a metástase de células cancerígenas (21).

O extrato da folha de araçá possui excelente atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de microrganismos como *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e o *Enterococcus faecalis*. (22).

Desta forma, julgamos necessária a avaliação da resposta tecidual frente às associações de extratos de araçá ao Ca(OH)_2 , já que esta associação se

mostrou eficaz na eliminação de microrganismos, podendo futuramente auxiliar no tratamento endodôntico.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual dos extratos aquoso e etanólico da folha de araçá utilizados como veículo do Ca(OH)_2 , através da análise edemogênica e microscópica em ratos.

Metodologia

Animais

Foram utilizados 80 ratos Wistar Albino, machos de 3 para 4 meses de idade, pesando 200 a 280g. Os animais foram alojados em salas de temperatura controlada e receberam água e comida *ad libitum*. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) de Araçatuba, (Processo nº 07457/2010).

Preparo dos extratos

As folhas de araçá (*Psidium Cattleianum*) foram obtidas na Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil. O espécime foi depositado no Herbário de Farmacognosia e Pesquisa Laboratório de Fitoterapia, São José do Rio Preto, Brasil Número HLF2006/7. As folhas coletadas apresentavam-se em bom estado livres de pragas ou doenças. As folhas foram lavadas em água e colocadas em estufa para secagem a uma temperatura de 40°C até que ficassem secas e quebradiças logo após foram trituradas até a obtenção de um pó.

Os extratos etanólico e aquoso foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Machado et al em 2012 (23). Extrato Etanólico: 20g do pó de folha foram misturadas com 250mL de etanol a 80%. Em um frasco âmbar foi agitado manualmente durante três minutos, cinco vezes por dia, durante 12 dias. Subsequentemente, a filtração foi realizada. O produto foi esterilizado por filtração em membrana de éster de celulose de 0,22 um (Millipore®). Extrato aquoso: 20g de pó de folha foram adicionados a 250mL de água destilada e fervida a 100°C durante 5 minutos, mantidos a 55°C durante 1 hora e à temperatura ambiente durante 72 horas sendo agitado a cada 24 horas. A solução foi filtrada e esterilizada, como mencionado anteriormente.

Com o preparo dos extratos as seguintes associações foram constituídas na proporção de 1g de Ca(OH)_2 para 1ml do veículo:

(A) extrato aquoso + Ca(OH)_2 , (B) extrato etanólico + Ca(OH)_2 , (C) propilenoglicol + Ca(OH)_2 .

Análise edemogênica

O edema foi quantificado em dois períodos, 3 e 6 horas. Para isso 30 animais foram anestesiados via intramuscular com xilazina (10mg/kg) e quetamina (25mg/kg). A seguir, receberam injeção intravenosa (veia peniana) de azul de Evans a 1% (Evans Blue; Difco Lab. Detroit Michigan USA), na proporção de 0,2mL da solução para 100g de massa corporal. Após 30 minutos, foram constituídos três grupos (n=10), onde 0,1mL de cada associação (A, B ou C) foi injetada, utilizando-se seringa de insulina com agulha hipodérmica 0,70 x 25mm (22G x 1 1/4"), na região dorsal próximo à região caudal, tendo a linha média como referência (23).

Após 3 e 6 horas cinco animais de cada grupo foram sacrificados por overdose anestésica. Foi realizada a tricotomia manual e a área de edema foi removida com margem de segurança. As peças foram padronizadas com 23mm de diâmetro, picotadas e colocadas em frascos individuais contendo 4ml de formamida (Vetec - Química- RJ – Brasil). Após 72h a 45°C realizou-se a filtração em gaze e análise por absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda $\lambda=630\text{nm}$ (23).

Análise histológica

Foram utilizados 10 ratos para cada período experimental, 7, 15, 30, 60 e 90 dias, totalizando 50 animais para o experimento. Cada animal recebeu quatro implantes, cada um referente a um grupo experimental (A–C) ou tubo vazio (controle - D).

Duzentos tubos de polietileno (Abbott Labs of Brasil, São Paulo, SP, Brasil), com 1,6mm de diâmetro externo e 7,0mm de comprimento, sem selamento nas extremidades, serviram para acomodação dos materiais testados, a introdução das pastas nos tubos foi realizada com o auxílio de uma seringa de insulina e agulha hipodérmica 0,70 x 25mm (22G x 1 1/4"). Os animais foram anestesiados, como descrito anteriormente, realizada tricotomia da área dorsal e antisepsia com iodo a 5% Foi realizada uma incisão longitudinal com lâmina de bisturi número 15C,

com extensão de 1cm acompanhando a linha mediana. Com o auxílio de um trocarte os tubos de polietileno foram implantados do lado direito e esquerdo no tecido subcutâneo dos animais, totalizando 4 tubos por animal, em seguida realizou-se a sutura com fio de seda 4-0 (23).

Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias do período de implantação, os animais foram sacrificados por overdose anestésica. Os tubos com os tecidos circundantes foram removidos e fixados em solução formalina 4% e pH 7,0. Os espécimes foram processados e incluídos em glicol metacrilato (GMA), cortes seriados de 3µm foram realizados para coloração por Hematoxilina e Eosina. A reação tecidual foi avaliada como: escore 0, nenhuma célula inflamatória; escore 1, menos de 25 células; escore 2, entre 25-125 células, e escore 3, 125 ou mais células. Cápsula fibrosa foi considerada fina quando a espessura foi menor que 150µm e espessa quando maior que 150µm (23,24).

Os resultados do teste edemogênico foram analisados por ANOVA dois fatores de variação e teste de Tukey, enquanto a análise histológica foi submetida ao teste de Kruskal-Wallis.

Resultados

Análise edemogênica

A associação do extrato etanólico ao Ca(OH)_2 mostrou no período de 3 horas maior edema em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$). No período de 6 horas os grupos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$), entretanto ao passar do tempo o extrato etanólico associado ao Ca(OH)_2 apresentou diminuição do edema enquanto os outros grupos apresentaram aumento ($p > 0,05$) (Figura 1).

Análise histológica.

Extrato aquoso + Ca(OH)_2 (Grupo A)

Aos 7 e 15 dias foram observados moderado número de células inflamatórias identificando a presença de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e cápsula fibrosa espessa (Fig. 3- A,E). Aos 30, 60 e 90 dias foi observado diminuição da intensidade do infiltrado inflamatório, e menor espessura

da cápsula fibrosa, aos 90 dias houve diferença significativa em relação aos 7 dias ($p < 0,05$) (Fig. 2) (Fig. 3- I,M,Q).

Extrato etanólico + Ca(OH)₂ (Grupo B)

Aos 7 e 15 dias foi observado moderado número de células inflamatórias identificando a presença de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos e a cápsula fibrosa espessa (Fig. 3- B,F). Aos 30, 60 e 90 dias foi observado menor intensidade do infiltrado inflamatório ($p < 0,05$), e cápsula fibrosa fina (Fig. 2) (Fig. 3- J,N,R).

Propilenoglicol + Ca(OH)₂ (Grupo C)

No período de 7 e 15 dias foi observado um moderado número de células inflamatórias identificando a presença de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e em algumas lâminas a presença de eosinófilos e cápsula espessa aos 7 e 15 dias (Fig. 3- C,G). A partir dos 30 dias observou-se a diminuição tanto das células inflamatórias como da espessura da cápsula, ($p > 0,05$). (Fig. 2) (Fig. 3- K,O,S).

Controle – tubo vazio (Grupo D)

Como nos grupos anteriores aos 7 e 15 dias foi observado um moderado número de células inflamatórias identificando a presença de linfócitos, neutrófilos, macrófagos e cápsula espessa. (Fig. 3- D,H). Aos 30, 60 e 90 dias houve menor quantidade de células inflamatórias, e cápsula fibrosa fina. (Fig. 3- L,P,T) (Figura 2).

Comparação entre os grupos por período

Comparando os períodos avaliados verificou-se a evolução do reparo em função do tempo, havendo uma semelhança de resultados entre os períodos iniciais de 7 e 15 dias ($p > 0,05$) e também nos finais, 30, 60 e 90 (Fig. 2).

Dentro dos períodos experimentais não houve diferença entre as associações empregadas ($p > 0,05$) (Fig. 2).

Discussão

O extrato obtido da folha de araçá foi escolhido para este estudo, devido às suas propriedades antimicrobianas, demonstradas em estudos anteriores (14,22) e sua biocompatibilidade ao ser estudada isoladamente por Machado et al em 2008 (23). O presente estudo avaliou a resposta inflamatória dos extratos aquoso e etanólico de araçá utilizados como veículo do Ca(OH)₂ em comparação ao propilenoglicol.

O teste edemogênico é realizado com o auxílio de corantes vitais (Azul de Evans), que administrado endovenosamente se liga a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. A presença deste corante nos locais edemaciados, permite quantificar o edema ocorrido (25), avaliando a resposta tecidual inicial (26).

A associação do extrato etanólico ao Ca(OH)_2 apresentou edema significativamente maior no período inicial de 3 horas provavelmente devido a presença do etanol. No período de 6 horas observou-se a diminuição do edema neste grupo enquanto o extrato aquoso e o propilenoglicol associados ao Ca(OH)_2 apresentaram aumento do edema (fig1). Esse fato também foi observado anteriormente quando avaliados isoladamente os extratos etanólicos de araçá (27) e aroeira (23).

Na análise histológica, o grupo controle (tubo vazio) apresentou reação inflamatória semelhante a resultados prévios que confirmam a pequena reação tecidual do tubo de polietileno. (28,29). Verificou-se no período inicial de 7 e 15 dias os maiores escores, provavelmente devido ainda ao trauma cirúrgico. O grupo controle e os grupos experimentais apresentaram semelhante grau de inflamação nos períodos iniciais, fato semelhante foi relatado por Torneck em 1994 (30). Aos 30 dias, com menor interferência do procedimento cirúrgico observou-se melhora significativa no quadro inflamatório em todos os grupos, característica mantida nos períodos de 60 e 90 dias.

Os resultados mostram que a associação dos extratos, da folha de araçá aquoso e etanólico, utilizados como veículo do hidróxido de cálcio, apresentam resposta tecidual semelhante ao Ca(OH)_2 associado ao propilenoglicol, e ao grupo controle. Souza et al em 1977 (31) avaliaram outros veículos utilizados (paramonoclorofenol canforado, água destilada e propilenoglicol + óxido de zinco) que também apresentaram repostas teciduais semelhantes ao grupo controle (tubo de dentina vazio).

Concluí-se que os extratos da folha de araçá, aquoso e etanólico utilizados como veículo do hidróxido de cálcio, apresentam resposta tecidual favorável, semelhante ao Ca(OH)_2 associado ao propilenoglicol, tornando promissor seu uso na odontologia.

4. Referências

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.
2. Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res.* 1982;90(2):134-44.
3. Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9(3):129-35.
4. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesq Odontol Bras.* 2003;17(4):367-71.
5. Leonardo MR, Silva LAB. “Curativo de demora”: medicação tópica entre sessões. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 978-1048.
6. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35:221-8.
7. Holland R, De Souza V, Nery MJ, De Mello W, Bernabé PFE and Otoboni Gilho JA. A histological study of the effect of calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth of dogs. *Int Endod J.* 1979 Jan:15–24.
8. Atila-Pektaş B, Yurdakul P, Gülmez D, Görduysus O. Antimicrobial effects of root canal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *Int Endod J.* 2012 Sep 11.
9. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999; 32:361-9.
10. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24:119-25.

11. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod. Dent. Traumatol.* 1990; 6:142-9.
12. Waltimo TMT, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J.* 1999; 32:421-9.
13. Estrela C, Estrela CRA, Pecora JD. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. *J. Appl. Oral Sci.* 2003 Jun; 11:(2).
14. Dezan Jr E, Sangalli J, Gomes-Filho JE, Gaetti-Jardim Jr E. *Psidium cattleianum* plus Ca(OH)₂ antimicrobial efficacy against *Enterococcus faecalis*. IADR; Jul; 15-16, 2010, *Journal of Dental Research*, 2010; 89, Special Issue B.
15. Pott A, Pott VJ. *Plantas do Pantanal*. Brasília, DF: EMBRAPA 1994;320.
16. Silva S, Tassara H. *Frutas do Brasil*. São Paulo: Empresa das Artes 1996; 230.
17. Watt JM, Branehwizk MG. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. E & S Livingstone. 1969;789–99.
18. Batick MJ. Ethnobotany of palms in the neotropics. In: Prance GT, Kallunki J.A, (Eds.), *Advances in Economic Botany: Ethnobotany in the Neotropics*. New York Botanical Garden, 1984; 9–23.
19. Lozoya X, Meckes M, Aboud- Zaid M, et al. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of spasmolytic principle. *Arch Med Res* 1994; 25:11-15.
20. Jaiarj P, Khoohaswan P, Wongkrajang Y, et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *J Ethnopharmacol* 1999; 67:203-212.
21. Im I, Park KR, Kim SM, Kim C, Park JH, Nam D, et al. The butanol fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Nutr Cancer.* 2012;64(2):255-66.
22. Gaetti-Jardim Jr E, Landucci LF, Arafat OKK, Ranieri RV, Ramos MMB, Ciesielski FIN, et al. Antimicrobial activity of six plant extracts from the

- Brazilian savanna on periodontal pathogens. *Int. J. Odontostomat.* 2011; 5(3):249-256.
23. Machado AC, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Ruvierre DB, Zoccal R, et al. Evaluation of tissue reaction to Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) extracts: a histologic and edemogenic study. *J. Appl. Oral Sci.* 2012;20(4):414-8
 24. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Filho JA, Dezan E Jr, Bernabé PF. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX® Dent Traumatol. 2012 Dec;28(6):452-6.
 25. Rutberg M, Spangberg E, Spangberg L. Evaluation of enhanced vascular permeability of endodontic medicaments in vivo. *J Endod* 1977; 3: 347-351.
 26. Canova GC, Taveira LAA, Dezan Junior E, Nishiuama CK, Spalding M. Estudo do poder flogógeno de quatro cimentos obturadores de canais radiculares por meio do teste edemogênico. *Rev. Fac. Odontol. Bauru* 2002; 10: 128-133.
 27. Machado AC, Ruvierre DB, Novaes RZ, Jardim Júnior EG, Dezan Junior E. Evaluation of the tissue response to inactivated microorganisms associated with aqueous and hydroalcoholic araçá (*Psidium cattleianum*) solutions. *J Appl. Oral Sci.* 2008; 16.
 28. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod.* 2004;30(2):95-9.
 29. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod.* 2009 Feb; 35(2):256-60.
 30. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1967;24(5):674-83.
 31. Souza V, Holland R, Mello W, Nery MJ. Reaction of rat connective tissue to the implant of calcium hydroxide pastes. *Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba* 1977; 6:39-46.

Figura 1. Coloração HE. Extrato aquoso + Ca(OH)₂, 100x: (A,E) 7 e 15 dias, infiltrado celular inflamatório moderado e cápsula fibrosa espessa. (I,M,Q) 30, 60 e 90 dias, cápsula fibrosa fina e infiltrado celular inflamatório leve. Extrato etanólico + Ca(OH)₂, 100x: (B,F) 7 e 15 dias, cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado com presença de linfócitos e macrófagos. (J,N,R) 30, 60 e 90 dias, cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina com poucas células inflamatórias crônicas. Propilenoglicol + Ca(OH)₂, 100x: (C,G) 7 e 15 dias, cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado. (K,O,S) 30, 60 e 90 dias, infiltrado celular inflamatório leve e cápsula fibrosa fina. Controle, 100x: (D,H) 7 e 15 dias, cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado. (L,P,T) 30, 60 e 90 dias, redução da cápsula fibrosa e das células inflamatórias próximas do tubo.

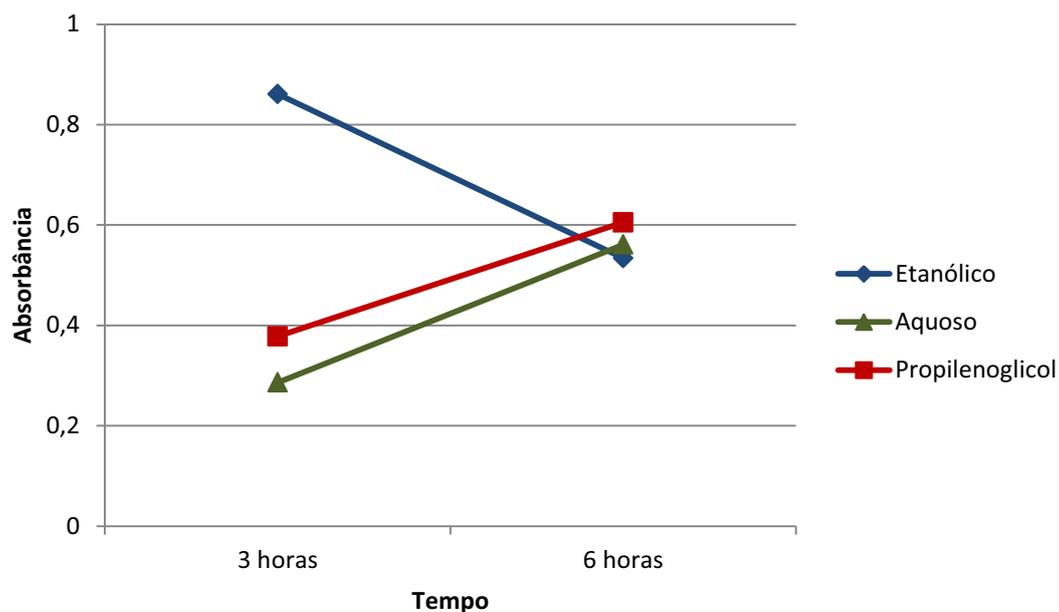


Figura 1 - Representação gráfica do valor médio do edema em ambos os períodos estudados de 3 e 6 horas

Tabela 1 - Média dos valores de absorbância em ambos os períodos estudados de 3 e 6 horas.

Grupos	3 horas	6 horas
Aquoso	0,286 ^{a*}	0,561 ^{ab}
Etanólico	0,861 ^b	0,534 ^{ab}
Propilenoglicol	0,378 ^{a*}	0,605 ^{ab}

*Símbolos diferentes apresentam significância estatística

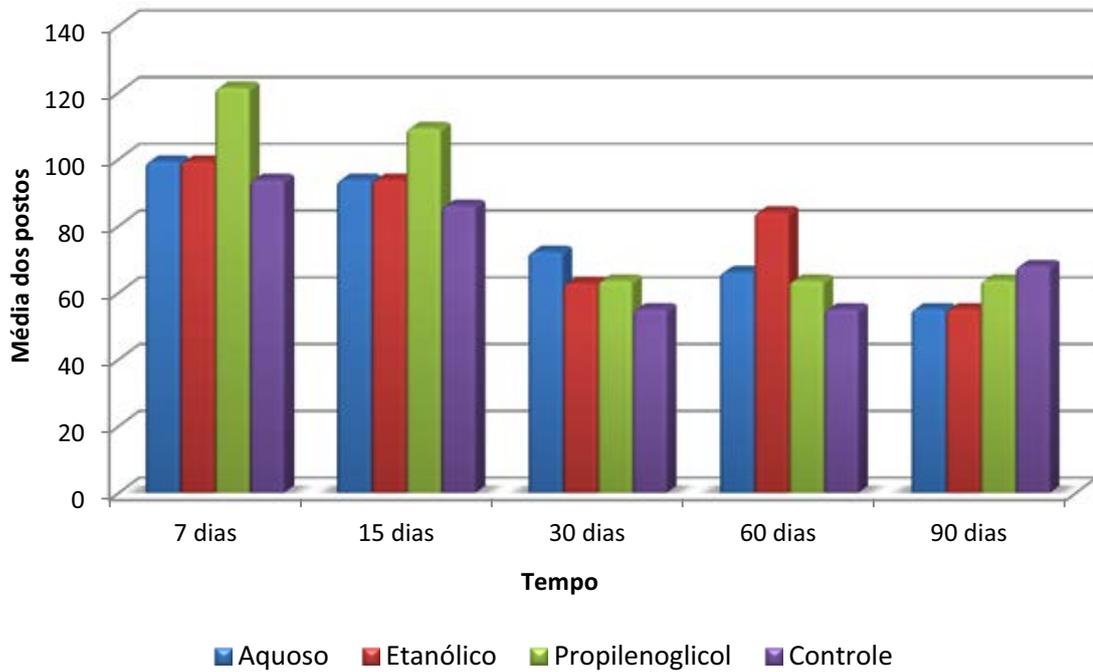


Figura 2 - Representação gráfica da posição ocupada pelas pontuações médias dos grupos nos 4 períodos estudados.

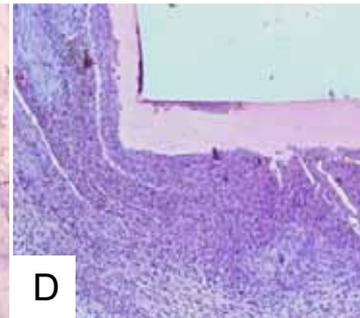
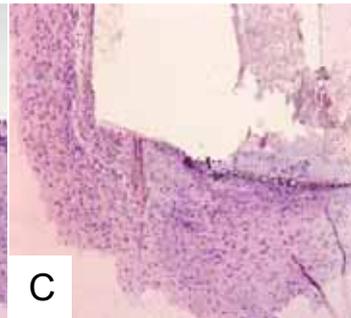
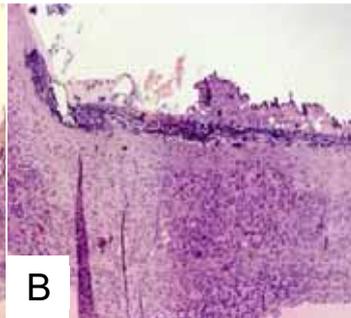
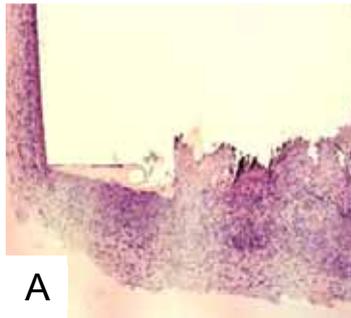
Aquoso

Etanólico

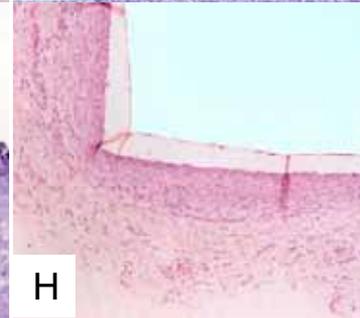
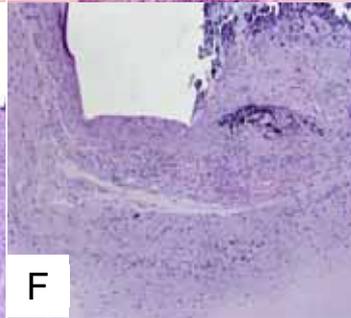
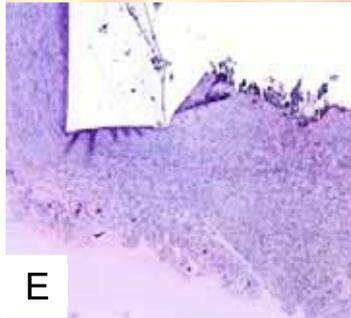
Propilenoglicol

Controle

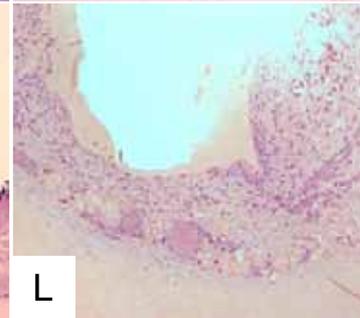
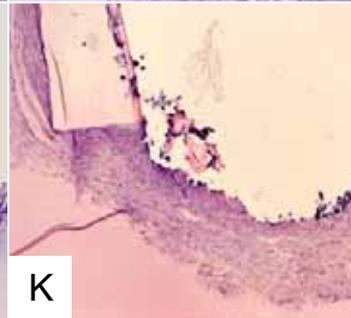
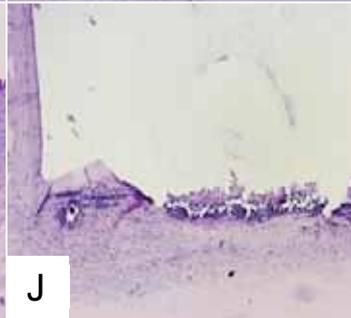
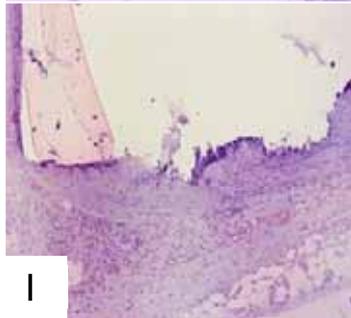
7 dias



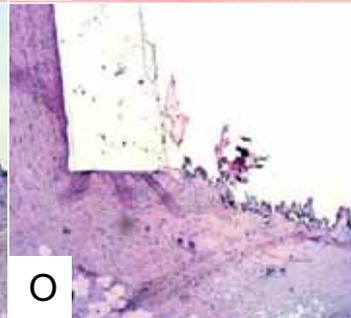
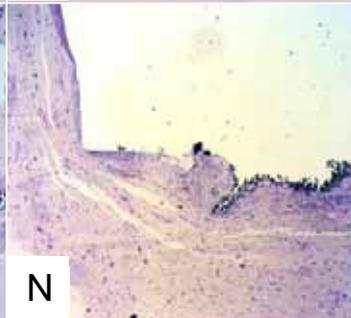
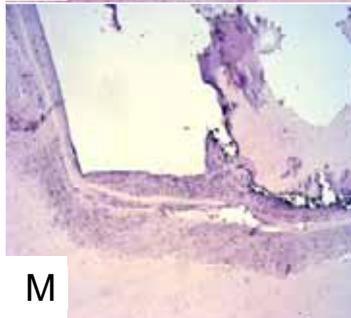
15 dias



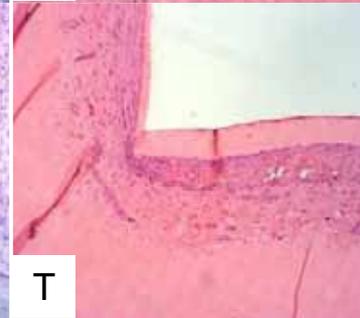
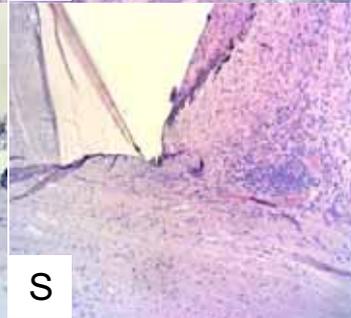
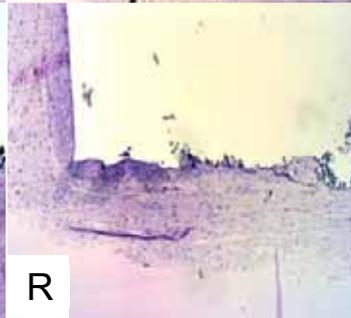
30 dias



60 dias



90 dias



Referências Gerais

Referências Gerais

1. Gomes-Filho JE, Faria MD, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, et al. Mineral Trioxide Aggregate but not Light-cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. *J Endod.* 2008; Jan; 34:(1);62-5.
2. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
3. Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* 1982;90(2):134-44.
4. Tani-Ishii N, Wang CY, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9(3):129-35.
5. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):367-71.
6. Leonardo MR, Silva LAB. “Curativo de demora”: medicação tópica entre sessões. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 978-1048.
7. Vafaie NM, Dobeck JM, Warbington ML, Dibart S, Harris M, Skobe Z. DNA analyses of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth. *J Endod.* 1999;25:290.
8. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe-Jr O. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995; 6:85-90.
9. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32:361-9.
10. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24:119-25.
11. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod. Dent. Traumatol.* 1990; 6:142-9.

12. Waltimo TMT, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 1999; 32:421-9.
13. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35:221-8.
14. Estrela, C; Estrela, CRA; Pecora, JD. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. *J. Appl. Oral Sci.* 2003; Jun; 11(2).
15. Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim Nova.* 1998; 21:99-105.
16. Pott A, Pott VJ. *Plantas do Pantanal.* Brasília, DF: EMBRAPA 1994; 320.
17. Silva S, Tassarà H. *Frutas do Brasil.* São Paulo: Empresa das Artes 1996; 230.
18. Watt JM, Branehwizk MG. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa.* E & S Livingstone. 1969;789–99.
19. Batick MJ. Ethnobotany of palms in the neotropics. In: Prance GT, Kallunki J.A, (Eds.), *Advances in Economic Botany: Ethnobotany in the Neotropics.* New York Botanical Garden, 1984; 9–23.
20. Lozoya X, Meckes M, Aboud- Zaid M, et al. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of spasmolytic principle. *Arch Med Res.* 1994; 25:11-15.
21. Jaiarj P, Khoohaswan P, Wongkrajang Y, et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *J Ethnopharmacol.* 1999; 67:203-12.
22. De Souza AESG; Lajolo FM; Genovese MI. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58;4666–74.
23. Im I, Park KR, Kim SM, Kim C, Park JH, Nam D, et al. The butanol fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract suppresses MMP-2 and MMP-9 expression and activity through the suppression of the ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Nutr Cancer.* 2012;64(2):255-66.

24. Gaetti-Jardim Jr E, Landucci LF, Arafat OKK, Ranieri RV, Ramos MMB, Ciesielski FIN, et al. Antimicrobial activity of six plant extracts from the Brazilian savanna on periodontal pathogens. *Int. J. Odontostomat.* 2011; 5(3):249-256.
25. Menezes TEC de, Delbem ACB, Brighenti FL, Okamoto AC, Gaetti-Jardim Jr E. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. *Pharmaceutical Biology* [serial online] 2010; 48:300-305.
26. Machado AC, Ruvieri DB, Novaes RZ, Jardim Júnior EG, Dezan Junior E. Evaluation of the tissue response to inactivated microorganisms associated with aqueous and hydroalcoholic araçá (*Psidium cattleianum*) solutions. In: 21ª Jornada Odontológica de Bauru, 2008. *J Appl. Oral Sci.* 2008; 16.
27. Dezan Jr E, Sangalli J, Gomes-Filho JE, Gaetti-Jardim Jr E. *Psidium cattleianum* plus Ca(OH)₂ antimicrobial efficacy against *Enterococcus faecalis*. *IADR*; Jul; 15-16, 2010, *Journal of Dental Research*, 2010; 89, Special Issue B.

Anexos

Anexo 1



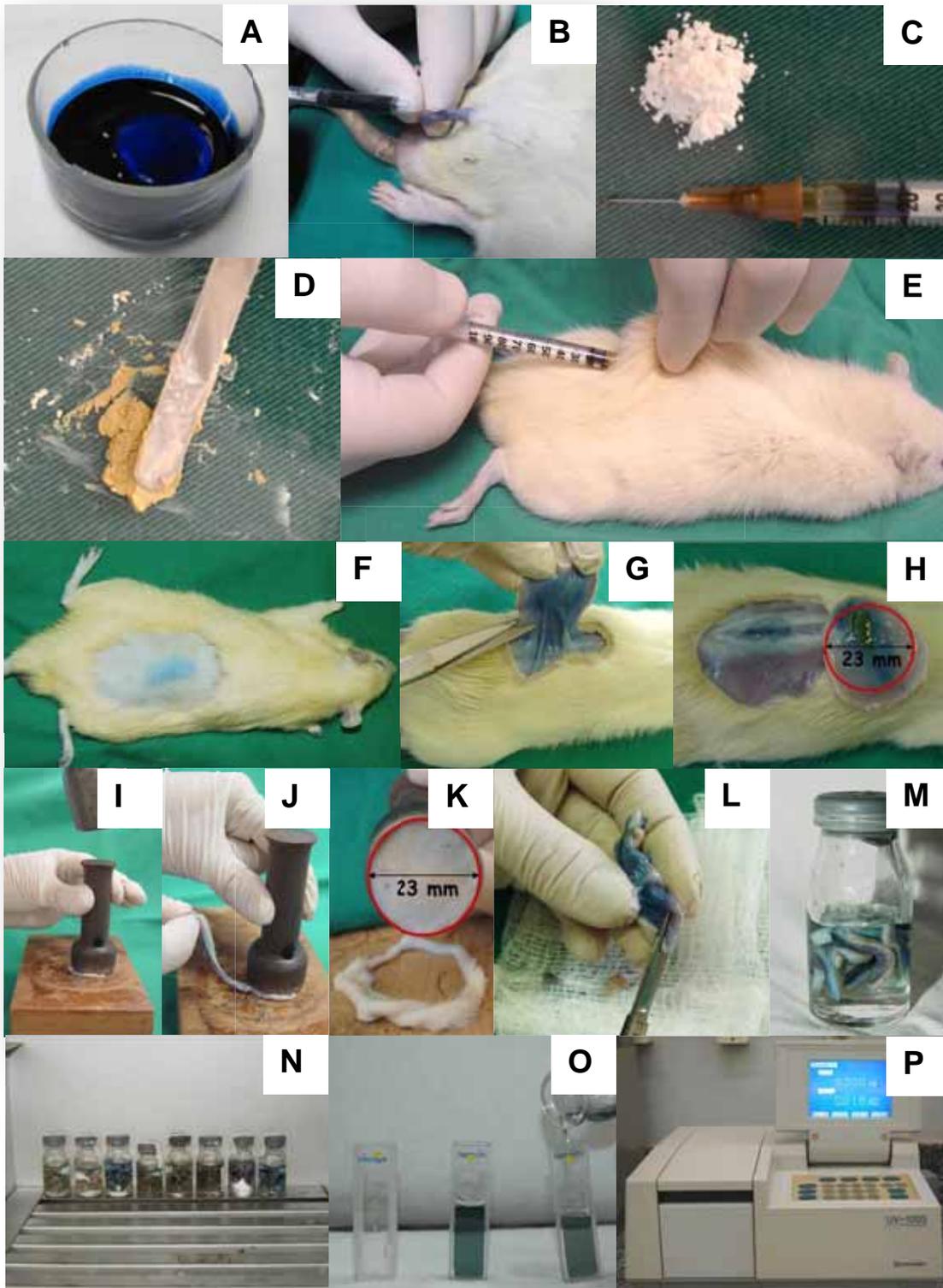
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*Avaliação in vivo da resposta tecidual dos extratos vegetais aquoso e etanólico de araçá (Psidium Cattleianum) associados ao hidróxido de cálcio. Análise edemogênica e microscópica em ratos.*" sob responsabilidade de **ELOI DEZAN JÚNIOR** e colaborador(es) Luciano Tavares Angelo Cintra está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEUA em 15/10/2010 de acordo com o Protocolo nº 07457/2010.

Araçatuba, 18 de Outubro de 2010


Prof. Adj. João Eduardo Gomes Filho
Presidente da CEUA- FOA/UNESP

Anexo 2



Anexo 2

Procedimentos cirúrgicos da Análise Edemogênica

A- Azul de Evans a 1% (Evans Blue Difco Lab.);

B- Injeção intravenosa de azul de Evans a 1% na veia peniana;

C e D- Preparo da pasta da associação dos extratos ao Ca(OH)_2 ;

E- Injeção de 0,1mL da pasta correspondente;

F- Evidenciação da área de edema após tricotomia manual da região dorsal do animal;

G e H- Remoção da pele do animal com margem de segurança;

I, J e K- Padronização da peça com 23mm de diâmetro com auxílio de um vazador de ferro;

L- Peça sendo picotada com tesoura cirúrgica;

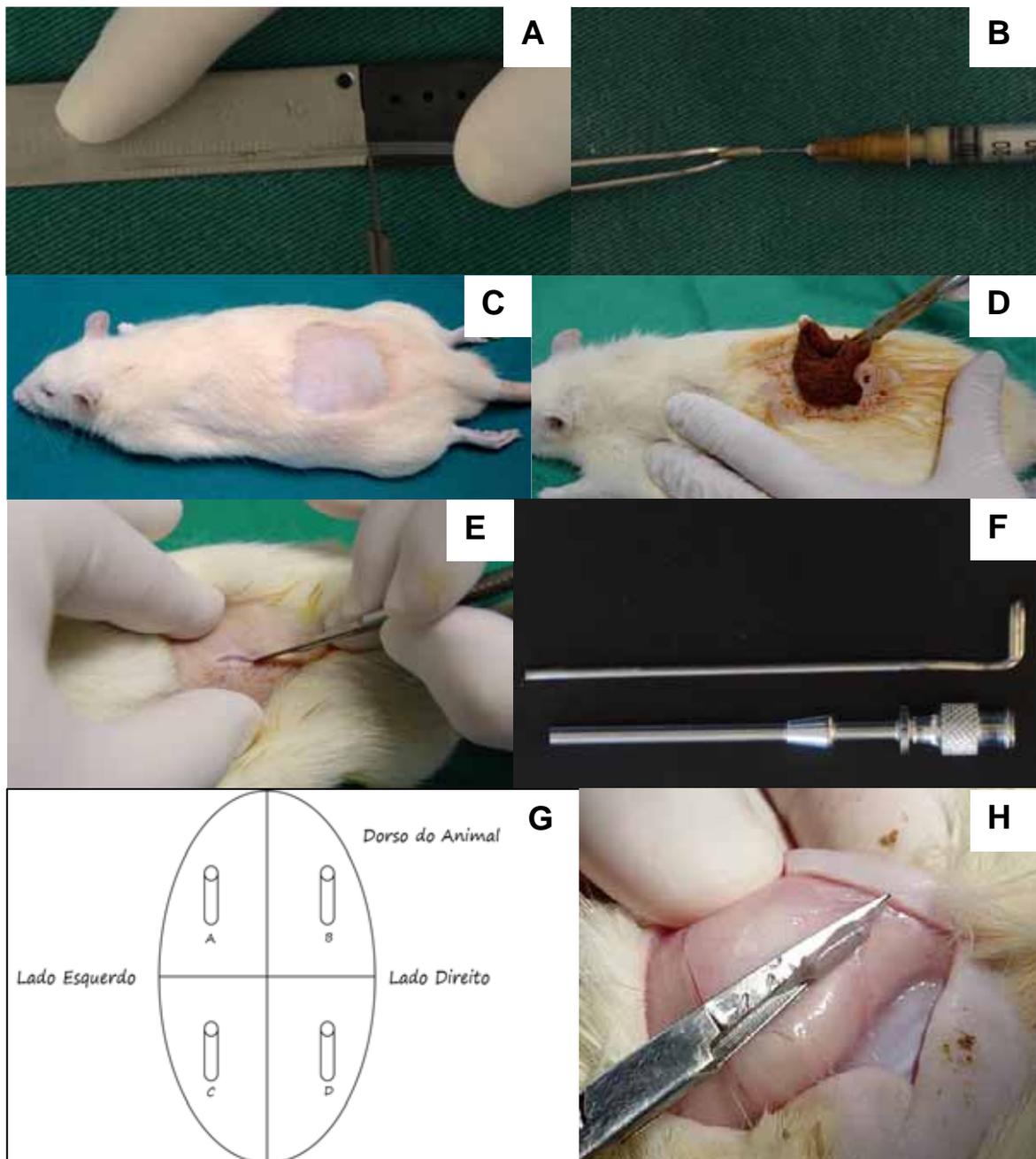
M- Frasco com 4mL de formamida (Vetec.Química.RJ.Brasil) contendo peça picotada;

N- Estufa a 45°C, contendo os frascos com 4mL de formamida mais as peças picotadas;

O- Soluções após filtração sendo introduzidas em frascos apropriados para se proceder à análise em espectrofotômetro;

P- Espectrofotômetro com comprimento de onda de 630nm.

Anexo 3



Anexo 3

Procedimentos cirúrgicos da Análise Microscópica

- A-** Preparo dos tubos de polietileno utilizados para o implante;
- B-** Inserção das pastas dentro dos tubos com auxílio de seringa de insulina e agulha hipodérmica;
- C-** Tricotomia manual da região dorsal do animal;
- D-** Anti-sepsia com polivinilpirrolidona a 1%;
- E-** Incisão longitudinal atingindo o subcutâneo com lâmina de bisturi número 15;
- F-** Trocarte, com ponta romba, para inserção dos tubos no subcutâneo;
- G-** Esquema de como foram inseridos os tubos no subcutâneo;
- H-** Remoção da peça contendo o tubo e os tecidos circundantes com auxílio de tesoura após os períodos experimentais de 7, 15, 30, 60 e 90 dias.

Anexo 4

Técnica para inclusão em Glicol Metacrilato (Leica – Historesin)

- 1) Lavar em água corrente no mínimo 5 horas;
- 2) Desidratar em álcool 70% por uma noite;
- 3) No dia seguinte:
 - A) Álcool 90% por 30 minutos;
 - B) Álcool 90% por 30 minutos;
 - C) Álcool 90% por 30 minutos;
 - D) Álcool 95% por 30 minutos;
 - E) Álcool 95% por 30 minutos;
 - F) Álcool 95% por 30 minutos;
- 4) Colocar as peças desidratadas na solução A ativada e deixar por 72 horas (temperatura ambiente);
- 5) Isolar os moldes de plástico próprio para inclusão com spray de teflon, colocar as peças no interior dos moldes, cobrir as peças com resina para inclusão (leica – historesin), depois de polimerizada, preencher com resina acrílica autopolimerizante e aguardar a polimerização.

Técnica para Coloração em Hematoxilina e Eosina (para peças incluídas em Glicol Metacrilato)

Peças cortadas em 3 μ m.

- 1) Hidratar rapidamente em água destilada;
- 2) Colocar na Hematoxilina – 30 minutos;
- 3) Lavar em água corrente até remover o excesso de corante;
- 4) Colocar na Eosina – 5 minutos;
- 5) Lavar em água corrente até remover o excesso de corante;
- 6) Deixar secar na estufa, montar com Entelan e lamínula.