



Milena Silva Campos

**AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE
DA SEIVA DO *CROTON LECHLERI*
(SANGUE DE DRAGÃO) EM TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS**

**ARAÇATUBA – SP
-2009-**

Milena Silva Campos

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DA SEIVA DO
CROTON LECHLERI (SANGUE DE DRAGÃO) EM TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, para obtenção do grau de “Mestre em Odontologia” – Área de Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Roberto Poi

ARAÇATUBA – SP
-2009-

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Campos, Milena Silva

C198a Avaliação da biocompatibilidade da seiva do *Croton lechleri*
(sangue de dragão) em tecido subcutâneo de ratos / Milena Silva Campos. -
Araçatuba : [s.n], 2009
68 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009
Orientador: Prof. Wilson Roberto Poi

1. Teste de materiais 2. *Croton* 3. Tecido subcutâneo 4. Ratos

Black D2
CDD 617.6



Dedicatória

*Dedico esta conquista aos meus Pais,
Euval e Marildete
Como forma de reconhecimento por toda dedicação,
amor e sacrifício que fizeram para que eu
realizasse este sonho.*



Agradecimentos Especiais

A Deus,

*Por me guiar nesta caminhada, iluminando meus caminhos,
me guardando dos perigos, e me fortalecendo para que eu
superasse os obstáculos e chegasse hoje com felicidade plena
a esta realização.*

Aos meus irmãos, Marcel e Mayara

*Pela paciência de me agüentarem nos momentos difíceis,
especialmente à minha irmã, pelo incentivo e colaboração
quando me mudei para Araçatuba.*

À minha família,

*Mesmo longe incentivaram minha caminhada, e se
felicitararam pelas minhas conquistas.*

Ao meu Orientador Wilson Roberto Poi,

*Pela paciência, compreensão e carinho dedicados a mim no
decorrer destes anos, pela amizade que levarei para o resto de
minha vida, pela dedicação e sabedoria condições
imprescindíveis para realização deste trabalho, enfim*

agradeço por todo o seu apoio, sempre me lembrarei de você como o meu Grande mestre.

Aos Professores da Clínica Integrada, Celso, Sônia, Denise, Daniela e José Carlos pelo apoio e incentivo, por me receberem de braços abertos, por estarem sempre dispostos a ajudar, e pela colaboração neste trabalho, a minha gratidão e admiração pelas pessoas e profissionais que são.

A minha amiga Lucieni Campoli, sempre presente desde o início desta jornada, nos momentos difíceis e alegres, obrigada pela força, carinho e amizade, e pela colaboração na elaboração do meu e TGGQ.

Ao meu amigo, Rodrigo

Pela força e incentivo para que eu continuasse a buscar a realização deste sonho.

Aos meus colegas de trabalho da UNIRP, Angélica, Ary, André, Celina, Landucci, Leandro, Heloísa, Aimeé, Gilberto, Yara, Dario, Fábio, Alexandre pelo apoio, amizade e

incentivo, especialmente o Prof. Elyseu Sícoli e Prof. Rodrigo Ventura pela compreensão nas vezes que tive que me ausentar.

Ao Prof. Tetuo Okamoto, pela atenção e colaboração na análise histológica do material.



Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba/UNESP, na pessoa do seu diretor o Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, pela acolhida e por permitir o meu crescimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do seu Coordenador Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, pela oportunidade do aprendizado.

Às Faculdades Adamantinenses Integradas por ceder seus laboratórios e fornecer os animais para realização deste trabalho.

A professora Graziela Garrido Mori pela disponibilidade, apoio e colaboração no início deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório da FAI pela colaboração durante a execução deste trabalho.

À Luciana Crepaldi pela gentileza e colaboração na inclusão corte e coloração das lâminas.

À Daniele Clapes Nunes pela colaboração durante a realização da parte prática deste trabalho.

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp: Marina, Valéria e Diogo, que sempre nos auxiliam com boa vontade..

A Catarina Silveira, pela iniciativa, colaboração e incentivo na execução deste trabalho.

Aos funcionários da Clínica Integrada, Antônia e Paulo, pela colaboração durante as clínicas e pela amizade.



Επίγραφε

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as abaixam para a terra, sua mãe”.

Leonardo da Vinci



Resumo

Resumo

CAMPOS MS. Avaliação da biocompatibilidade da seiva do *Croton lechleri* (Sangue de Dragão) no tecido subcutâneo de ratos [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2009.

Introdução: O sangue de dragão é um látex extraído de árvores da porção ocidental da Amazônia. Apresenta propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias e antitumorais. No entanto, faltam dados sobre a sua biocompatibilidade.

Proposição: Este trabalho objetivou avaliar a biocompatibilidade da seiva do *Croton lechleri* (sangue de dragão) em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

Material e método: Foram utilizados 15 ratos, nos quais foram implantados tubos de polietileno em seu dorso, divididos em dois grupos: Grupo I (controle) luz do tubo selada com guta percha; Grupo II (sangue de dragão) luz do mesmo tubo preenchida com sangue de dragão. Passados 7, 15 e 30 dias do procedimento, os animais foram sacrificados e as peças obtidas, processadas em laboratório para análise microscópica. Os cortes histológicos foram realizados com a espessura de 5 micrometros. Foram observados a presença de inflamação e o tipo de células predominantes em cada implante.

Resultados: Na análise histológica, alguns animais do Grupo II apresentaram tecido conjuntivo diferenciado, bem vascularizado e com pequeno número de células inflamatórias aos 15 dias, resultado este superior ao grupo I (controle). Aos 30 dias, o Grupo II mostrou tecido conjuntivo bem desenvolvido rico em fibras colágenas, pequeno número de vasos sanguíneos e alguns linfócitos.

Conclusão: Em razão da semelhança da resposta inflamatória com o grupo controle, o sangue de dragão mostrou-se biocompatível em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e abre a perspectiva para a realização de outros estudos.

Palavras-chave: Teste de materiais, Croton, Tecido subcutâneo, Ratos.



Abstract

Abstract

CAMPOS MS. Evaluation of the biocompatibility on the *Croton lechleri* sap (Dragon blood) in the rats subcutaneous tissue [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2009.

Introduction: The blood of dragon is a latex extracted from trees in the western portion of the Amazon. It has healing properties, anti-inflammatory and anti-tumor. However, there are just a few data on its biocompatibility.

Proposition: This study aimed to evaluate the biocompatibility of *Croton lechleri* sap (dragon blood) in subcutaneous tissue of rats. **Material and**

method: We used 15 rats, in which polyethylene tubes were implanted in his back, divided into two groups: Group I (control) light tube sealed with gutta percha, Group II (blood the dragon) light of the same tube filled with blood of dragon. After 7, 15 and 30 days of the procedure, the animals were sacrificed and the pieces collected, were processed in the laboratory for microscopic analysis, the histological sections were performed with a thickness of 5 micrometers. We observed the presence of inflammation and the predominant cell type in each implant. **Results:** In histological analysis, some animals from Group II had differentiated tissue and vascularized with small numbers of inflammatory cells at 15 days, a result higher than group I (control). At 30 days, Group II showed well-developed connective tissue rich in collagen fibers, a small number of blood vessels and some lymphocytes. **Conclusion:** Because of the similarity of the inflammatory response to the control group, the blood of dragon proved to be biocompatible in subcutaneous tissue of rats and opens the prospect for the realization of other studies.

Key-words: Materials testing, Croton, Subcutaneous tissue, Rats.

Sumário

Lista de Figuras	18
Introdução	21
Proposição	26
Material e método	28
Resultados	32
Discussão	36
Conclusão	41
Referências	43
Anexo A – Comitê de Ética em Pesquisa	50
Anexo B – Normas para a Publicação	51
Anexo C – Ilustrações da fase experimental	59
Anexo D - Ilustrações dos achados histológicos	60
Anexo E – Escores da distribuição celular por Grupos	63

Lista de Figuras

Figura 1 –	Forma de análise da luz de cada tubo, dividida em 10 campos com aumento de 400 vezes, avaliando as áreas próximas e as mais afastadas	30
Figura 2 –	Controle – 7 dias. Moderado número de fibroblastos, linfócitos e vasos sanguíneos. HE. Aumento 400X.	34
Figura 3 –	Sangue de dragão – 7 dias. Tecido conjuntivo pouco desenvolvido e moderado número de linfócitos. HE. Aumento 400X.	34
Figura 4 –	Controle – 15 dias. Elevada quantidade de linfócitos e raros fibroblastos. HE. Aumento 400X.	34
Figura 5 –	Sangue de dragão – 15 dias. Pequeno número de linfócitos, alguns macrófagos e moderado número de fibroblastos. HE. Aumento 400X.	34
Figura 6 –	Controle – 30 dias. Tecido conjuntivo organizado com grande quantidade de fibroblastos e poucos vasos sanguíneos. HE. Aumento 400X.	34
Figura 7 –	Sangue de dragão – 30 dias. Tecido conjuntivo desenvolvido com discreta quantidade de fibroblastos, poucos vasos sanguíneos e alguns linfócitos. HE. Aumento 400X.	34
Figura 8 –	Tricotomia no dorso dos animais.	59
Figura 9 –	Início da incisão.	59
Figura 10 –	Fase final da incisão.	59
Figura 11 –	Divulsão dos tecidos.	59
Figura 12 –	Inserção do tubo de polietileno.	59
Figura 13 –	Sutura das bordas da ferida.	59
Figura 14 –	Grupo I – Controle: 7 dias. Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.	60
Figura 15 –	Grupo II – Sangue de dragão: 7 dias. Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.	60
Figura 16 -	Grupo I – Controle: 7 dias. Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.	60
Figura 17 -	Grupo II – Sangue de dragão: 7 dias. Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.	60

Figura 18 -	Grupo I – Controle: 7 dias. Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.	60
Figura 19 -	Grupo II – Sangue de dragão: 7 dias. Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.	60
Figura 20 -	Grupo I – Controle: 15 dias. Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.	61
Figura 21 -	Grupo II – Sangue de dragão: 15 dias Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.	61
Figura 22 -	Grupo I – Controle: 15 dias. Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.	61
Figura 23 -	Grupo II – Sangue de dragão: 15 dias Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.	61
Figura 24 -	Grupo I – Controle: 15 dias. Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.	61
Figura 25 -	Grupo II – Sangue de dragão: 15 dias. Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.	61
Figura 26 -	Grupo I – Controle: 30 dias. Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.	62
Figura 27 -	Grupo II – Sangue de dragão: 30 dias. Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.	62
Figura 28 -	Grupo I – Controle: 30 dias. Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.	62
Figura 29 -	Grupo II – Sangue de dragão: 30 dias. Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.	62
Figura 30 -	Grupo I – Controle: 30 dias. Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.	62
Figura 31 -	Grupo II – Sangue de dragão: 30 dias. Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.	62



Introdução

Introdução*

Produtos naturais com propriedades terapêuticas têm sido usados há séculos. Por um longo período, as plantas, minerais e produtos animais eram as únicas fontes de drogas (De Pasquale, 1984).

Segundo Kong et al. (2003), as plantas medicinais são um elemento importante da medicina indígena e, os índios da Amazônia usam pelo menos 1.300 espécies de plantas no seu dia-a-dia. A visão econômica dos serviços de saúde tem motivado o interesse do mercado farmacêutico para o reconhecimento de pesquisas que envolvem plantas medicinais usadas pela população, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que o benefício obtido com o uso de fitoterápicos está diretamente relacionado ao diagnóstico preciso. O uso desta terapêutica inclui baixo custo, eficácia e acesso à população (Conasems, 2005).

A grande biodiversidade do Brasil, aliada às bases universitárias do país, necessita apenas de subsídios financeiros públicos ou privados para aumentar as pesquisas na área que vão beneficiar a população em geral com a descoberta de novas medicações. A família *Euphorbiaceae* Juss é uma das maiores das *Angiospermae*, com cerca de 300 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies, distribuídas em todo o mundo e dentre seus principais gêneros está a espécie *Croton lechleri*. *Euphorbiaceae* tem se destacado como uma família de importância econômica, especialmente na alimentação humana, produção de látex e óleos, e ainda na medicina popular que é contemplada com diversas espécies da família *Euphorbiaceae*: pelo uso do chá de efeito antilítico, diurético, antihepatóxico e antiespasmódico, de efeito terapêutico cicatrizante, tônico e antidiarréico, dentre outros. A família *Euphorbiaceae* ainda é pouco estudada considerando sua complexidade e número de representantes (Webster, 1994).

* O texto está de acordo com as normas da revista *Journal of Ethnopharmacology*, para qual o trabalho será enviado (Anexo B).

De acordo com Barroso et al. (1999) ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies no Brasil, difundidas em todos os tipos de vegetação e apresentando diversas formas de vida.

Extratos ou infusões de diferentes partes de plantas pertencentes ao gênero *Croton* como *C. lechleri*, *C. palanostigma*, *C. draconoides* e *C. urucurana* são utilizados tradicionalmente como remédios no tratamento de ferimentos infectados e são bem conhecidos os efeitos que aceleram a cura de ferimentos (Tropical Plant Database 2007).

Croton lechleri, um dos maiores gêneros das Euphorbiaceae, é uma espécie de árvore monóica da porção mais ocidental da Amazônia, com 8 a 20 m de altura e 15 a 30 cm de diâmetro (Guevara e Villacorta, 1998) que produz um látex viscoso cor de sangue conhecido por este motivo como sangue de dragão (Desmarchelier et al., 1997; Guevara e Villacorta, 1998; Lopes e Lopes et al., 2004; Milanowski et al., 2002; Rossi et al., 2003). Possui cerca de 1.200 espécies nos trópicos e subtropicais, a maioria distribuída nas Antilhas e América do Sul, e poucas na América do Norte (Govaerts et al., 2000).

O primeiro relato do seu uso foi em 1600, pelo padre espanhol naturalista Bernabé Cobo, no tratamento de ferimentos (Govaerts et al., 2000). Durante séculos a seiva foi usada em feridas para estancar a hemorragia, acelerar a cura, e proteger de infecções.

Segundo Randau et al. (2004), o *Croton lechleri* é administrado, por via oral, no tratamento de câncer, reumatismo, hemorragias, gripes, úlceras estomacais, cólicas intestinais, diarreia e no combate a infecções. A sua forma tópica é usada nas infecções herpéticas, após extração dentária, em úlcera da mucosa bucal, úlceras e feridas na pele. Também pode ser utilizado diluído em água para banhos de assento em casos de hemorragia vaginal (Itokawa et al., 1991; Ubillas, 1994). Os estudos realizados com o extrato da planta diluído em água e administrado oralmente em ratos de laboratório demonstraram baixa toxicidade aguda por esta via (Randau et al., 2004).

Estudos de diversos autores demonstram as atividades biológicas de compostos químicos isolados do látex do *Croton lechleri* como a tarpina, que apresenta atividade cicatrizante, anti-inflamatória e antitumoral (Cai et al, 1993; Itokawa et al., 1991; Ubillas, 1994). Em estudo de Chen et al. (1994) em

ensaios *in vitro* para examinar a citotoxicidade e a atividade antibacteriana, o sangue de dragão revelou-se estimulante da contração de feridas, ajudando na formação de uma crosta local, reparando a área mais rapidamente, e ajudando na formação de novo colágeno.

Além da ação cicatrizante, o sangue de dragão apresenta propriedades antiinflamatórias, anti-virais, antimicrobianas, anti-tumorais (Chen et al. 1994; Desmarchelier et al., 1997;; Gonzáles e Valerio, 2006; Jones, 2003; Lopes and Lopes, 2004; Middleton et al., 2000; Salatino et al., 2007; Sandoval et al., 2002; Williams, 2001).

Vários compostos são extraídos do sangue de dragão, entre eles: o alcalóide taspina (Cai et al., 1993; Itokawa et al., 1991; Pieters et al., 1993; Ubillas, 1994) e o 3',4-O-dimethyl–cedrusin (Guevara e Villacorta, 1998; Milanowski et al., 2002, Salatino et al., 2007) que atua sobre os radicais livres associados a processos patológicos (Guevara e Villacorta, 1998; Lopes e Lopes et al., 2004; Middleton et al., 2000), além de apresentar características que ajudam no reparo de áreas alteradas (Desmarchelier et al., 1997; Guevara e Villacorta, 1998; Lopes e Lopes et al., 2004; Milanowski et al., 2002;). Além das proantocianidinas e os diterpenos, que demonstram atividades antiviral, anti-diarréica, antibacteriana e cicatrizante (Itokawa et al., 1991; Ubillas, 1994); também apresentou atividade antibacteriana frente ao *Helicobacter pylori* (Tamariz et al., 2003).

Fischer et al. (2004) constatou que o SP-303 obtido do látex da casca do *Croton lechleri* é um potente inibidor da toxina da cólera.

Wallace (2007) demonstrou que o sangue de dragão bloqueia a ativação de fibras nervosas que transmitem sinais de dor ao cérebro, funcionando assim como limitador da sensação dolorosa.

Na Odontologia o *Croton lechleri* (sangue de dragão) pode ser uma alternativa no tratamento de diversas patologias, e como não existem muitos relatos do seu uso, é importante a avaliação da sua biocompatibilidade.



Proposição

Proposição

O trabalho objetivou avaliar a biocompatibilidade da seiva do *Croton lechleri*, popularmente conhecido como sangue de dragão, implantado no tecido subcutâneo de ratos.



Material e Método

Material e Método

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (Resolução nº 1 de 13/06/98 Conselho Nacional de Saúde) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, para apreciação (Processo FOA 2007 - 004731) recebendo o parecer favorável (Anexo A).

A seiva foi obtida na cidade de Humaitá (AM). Após a realização de cortes diagonais no tronco da árvore a seiva escorre rapidamente e é armazenada em um recipiente plástico que é vedado após a obtenção. O material foi mantido ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, transportado logo em seguida por via aérea para a cidade de Adamantina (SP) onde foi realizada a parte experimental deste estudo.

Para a realização deste trabalho foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) machos com peso corporal entre 180-200 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas identificadas de acordo com o tempo experimental, as quais foram limpas em dias alternados. Os animais foram alimentados, antes e durante o experimento, com ração sólida, com exceção das primeiras doze horas pré-operatórias, e água à vontade.

Para a realização das intervenções cirúrgicas os animais foram anestesiados com uma associação de anestésico - cloridrato de ketamina (Dopalen – Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí, SP, Brasil) e relaxante muscular - cloridrato de xilazina (Anasedan – Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil) por via intramuscular, na dosagem de 0,05ml/100g de peso para cada substância citada. A anestesia foi realizada com o auxílio de uma seringa descartável para insulina.

Logo após, 30 tubos de polietileno, esterilizados, medindo 1,3 mm de diâmetro interno com 10 mm de comprimento, tiveram uma das extremidades seladas com guta percha branca (Odahcam Dentsply Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil) e a outra preenchida com o sangue de dragão; para preenchimento dos tubos foi utilizada a parte precipitada da seiva, de

consistência macia e coloração vermelho escura que estava alojada na tampa do recipiente que continha o material, utilizando para isto, um rollemback.

Em seguida, os ratos tiveram os seus dorsos tricotomizados e a antissepsia da área foi realizada com clorexidina a 0,12% (Periogard Pfizer Ltda, São Paulo, SP, Brasil). A região dorsal recebeu uma incisão na região mediana com o auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 (Becton Dickinson, Curitiba, PR, Brasil). Lateralmente às incisões, o tecido cutâneo foi pinçado e divulsionado com uma tesoura romba. Na seqüência, os tubos foram introduzidos no tecido subcutâneo dos animais. As bordas da ferida foram suturadas com fio de nylon 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil).

Aos 7, 15 e 30 dias, cinco animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico. Os tecidos contendo os tubos foram removidos e fixados em formol a 10% por 48 horas. Os tubos foram retirados e as peças foram incluídas em parafina para posterior microtomia, deixando a porção preenchida com a guta percha voltada para o lado direito. Os cortes histológicos foram realizados com a espessura de 5 micrometros, sendo um corte a cada 50 micrometro. Os mesmos foram corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscópico de transmissão de luz.

Foram observados a presença de inflamação e o tipo de células predominantes em cada implante. As reações foram classificadas utilizando os seguintes escores: 0 - ausência ou raras células - sem reação inflamatória; 1 - menos de 25 células - reação leve; 2 - de 25 a 125 células - reação moderada; 3 - mais de 125 células - reação severa (Ozbas et al., 2003).

Essa análise foi feita utilizando um aumento de 400 vezes. A luz de cada tubo foi dividida em 10 campos, avaliando as áreas próximas e as áreas um pouco mais afastadas (Figura 1). A avaliação foi realizada por dois examinadores.

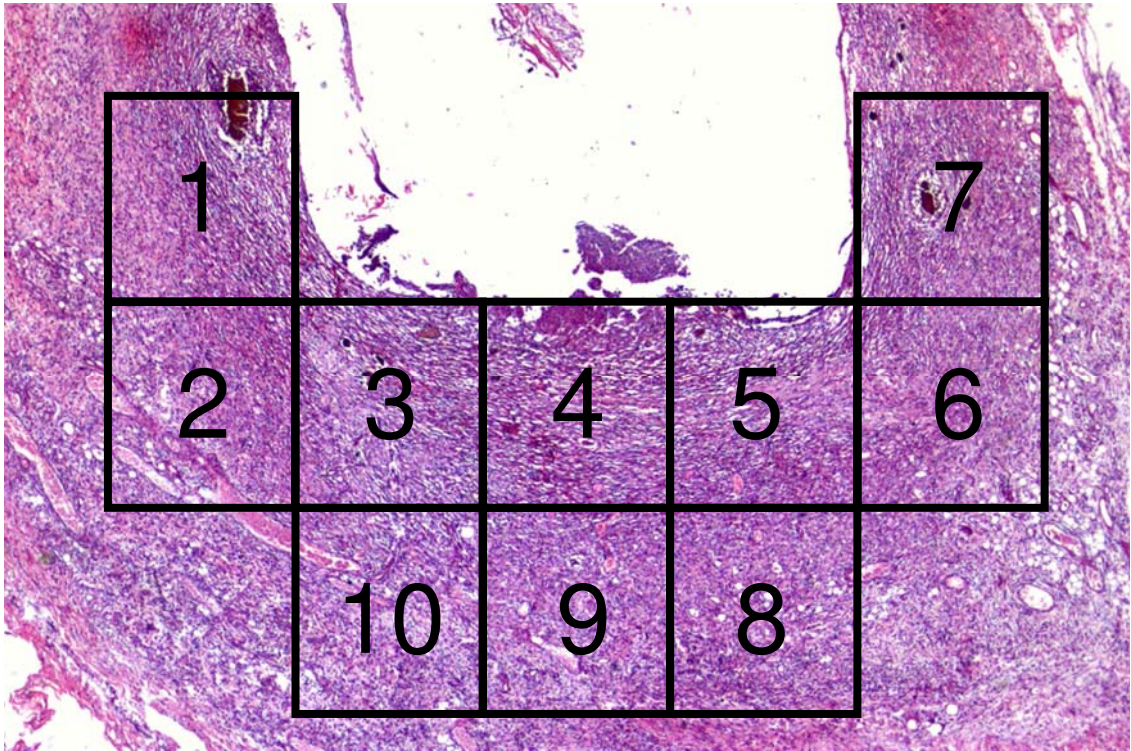


Figura 1 – Forma de análise da luz de cada tubo, dividida em 10 campos com aumento de 400 vezes, avaliando as áreas próximas e as mais afastadas.



Resultados

Resultados

Análise qualitativa e comparativa

7 dias

Grupo I (controle) – Em alguns espécimes, evidencia-se, junto às bordas do material, áreas ocupadas por remanescentes do coágulo sanguíneo com numerosos macrófagos em seu interior. Adjacente a esta área, notam-se extensas áreas com tecido conjuntivo pouco organizado exibindo vasos sanguíneos, raros fibroblastos, macrófagos e linfócitos.

Nos demais espécimes, evidencia-se, na mesma região, a presença de tecido conjuntivo discretamente mais evoluído com pequeno número de fibroblastos ao lado de macrófagos e linfócitos (Figura 2).

Grupo II (Sangue de dragão) - Observa-se, junto ao material, áreas ocupadas por tecido conjuntivo pouco desenvolvido, exibindo moderado número de fibroblastos. São encontrados macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares neutrófilos (Figura 3). Mais afastado da superfície do material nota-se tecido conjuntivo com discreto número de fibroblastos e raros linfócitos.

15 dias

Grupo I (controle) – Na maioria dos espécimes, evidencia-se, junto ao material, extensas áreas ocupadas por tecido conjuntivo pouco vascularizado com raros fibroblastos e numerosos macrófagos e linfócitos.

Em alguns casos, nota-se a ausência quase total de vasos sanguíneos e fibroblastos, evidenciando-se elevado número de macrófagos e linfócitos (Figura 4).

Grupo II (Sangue de dragão) – Em alguns casos, próximo ao material, são observadas extensas áreas ocupadas por tecido conjuntivo pouco diferenciado exibindo numerosos macrófagos e linfócitos ao lado de alguns fibroblastos. Pequeno número de vasos sanguíneos pode ser notado na região.

Nos demais espécimes, observa-se na mesma região, a presença de tecido conjuntivo bem vascularizado com moderado número de fibroblastos e raros linfócitos e macrófagos (Figura 5).

30 dias

Grupo I (controle) – Na maioria dos espécimes observa-se tecido organizado com grande quantidade de fibroblastos, poucos vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias (Figura 6).

Grupo II (Sangue de dragão) – Em alguns espécimes observa-se, adjacente ao material, extensas áreas mostrando tecido conjuntivo bem desenvolvido rico em fibras colágenas e discreto número de fibroblastos. Nota-se ainda pequeno número de vasos sanguíneos e alguns linfócitos (Figura 7).

Figuras (próximas da luz do tubo) e Legendas

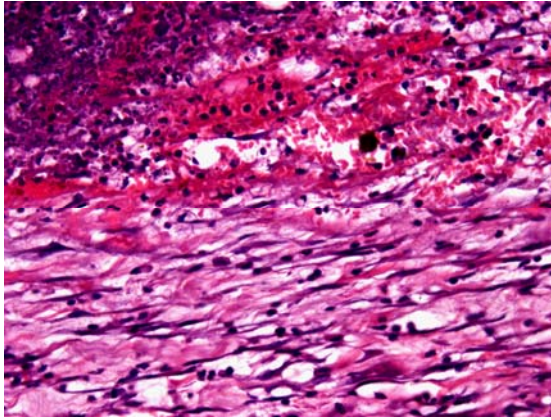


Figura 2 – Controle – 7 dias. Moderado número de fibroblastos, linfócitos e vasos sanguíneos. HE. Aumento 400X.

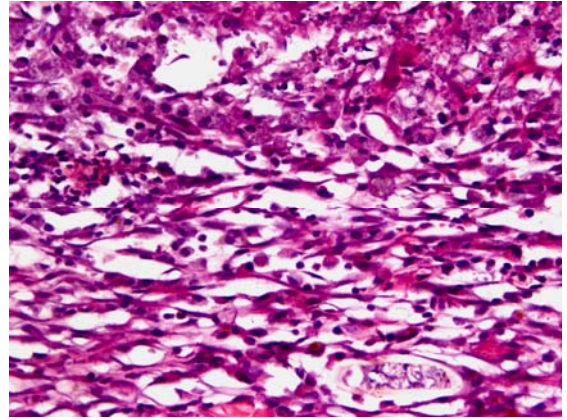


Figura 3 – Sangue de dragão – 7 dias. Tecido conjuntivo pouco desenvolvido e moderado número de linfócitos. HE. Aumento 400X.

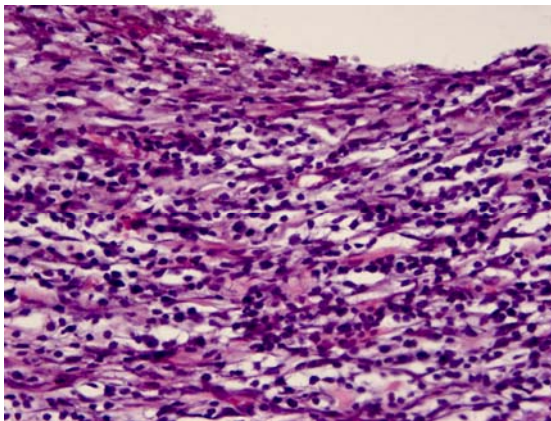


Figura 4 – Controle – 15 dias. Elevada quantidade de linfócitos e raros fibroblastos. HE. Aumento 400X.

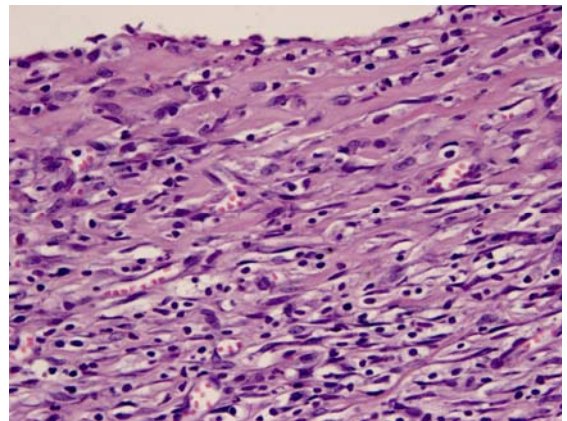


Figura 5 – Sangue de dragão – 15 dias. Pequeno número de linfócitos, alguns macrófagos e moderado número de fibroblastos. HE. Aumento 400X.

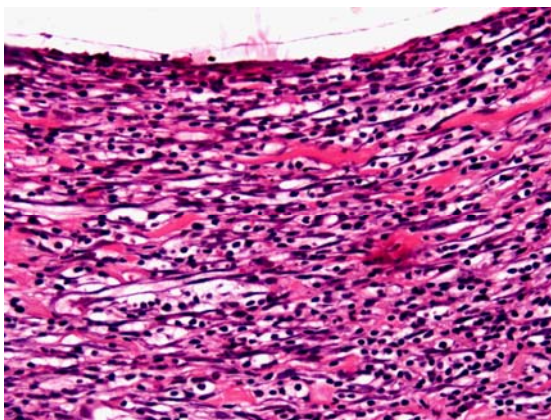


Figura 6 – Controle – 30 dias. Tecido conjuntivo organizado com grande quantidade de fibroblastos e poucos vasos sanguíneos. HE. Aumento 400X.

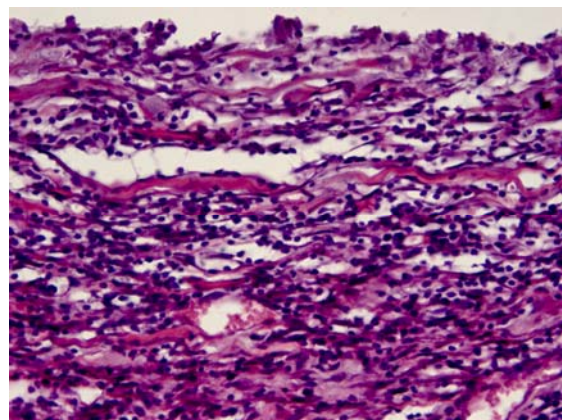


Figura 7 – Sangue de dragão – 30 dias. Tecido conjuntivo desenvolvido com discreta quantidade de fibroblastos, poucos vasos sanguíneos e alguns linfócitos. HE. Aumento 400X.



Discussão

Discussão

A metodologia empregada para avaliar a biocompatibilidade da substância foi baseada no trabalho de Olsson et al. (1981) e Torneck (1966) que deu origem a um expressivo número de pesquisas (Gomes-Filho et al. 2008; Ozbas et al. 2003). Nesse modelo experimental é possível, guardadas as proporções de resistência do animal e cronologia do processo de reparo tecidual, simular as situações que poderiam ocorrer em seres humanos.

As normas divulgadas pela *American Dental Association* (1982) e *Fédération Dentaire Internationale* (1980) consideram os métodos de implante como testes válidos para a pesquisa da biocompatibilidade de materiais. Assim, de acordo com estas instituições, o implante de materiais no tecido conjuntivo de pequenos animais é considerado um teste adequado para a avaliação da biocompatibilidade dos mesmos.

Sclafani e Romo (2000) descreveram que todo material, sintético ou natural, biológico ou não, deve exibir a capacidade de ser bem tolerado pelo organismo. A pesquisa de material biocompatível busca encontrar um substituto do tecido humano que não desencadeie efeitos nocivos ao organismo, e que tenha a capacidade de interagir favoravelmente com os tecidos.

O uso de plantas medicinais na arte de curar é uma forma de tratamento que vem sendo estudada ao longo do tempo, relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações por sucessivas gerações, sendo que por séculos os produtos de origem vegetal constituíram as bases para o tratamento de diferentes doenças (Conasems, 2005).

Chen et al. (1994) apontam as atividades anticancerígenas e anti-inflamatórias do *Croton lechleri*, bem como propriedades cicatrizantes. Testes de quimioluminescência demonstram a eficiência da seiva do *Croton lechleri* em eliminar grandes concentrações de peroxyl e os radicais de hidróxilo (Desmachelier et al., 1997). Estudos de Middleton et al. (2000) apontam resultados significativos no uso da seiva como atividade antioxidante e redução dos efeitos tóxicos de radicais livres. Para Sandoval et al. (2002) sugerem que o *Croton lechleri* seja avaliado como mais uma potencial fonte de agente anticancerígeno.

Estudos de Risco et al. (2003) relatam que a seiva do *Croton lechleri* apresenta bons resultados na cura de desordens cutâneas e orais, assim como sua fácil diluição em líquidos possibilita a ingestão, auxiliando no tratamento de úlcera gástrica com redução do tamanho da lesão e conteúdo bacteriano. A seiva ainda apresenta atividades antioxidante, antiviral, antibacteriana e anti-inflamatória.

Os resultados apresentados nos estudos de Tamariz et al. (2003) demonstram a atividade curativa da seiva do *Croton lechleri* em úlceras gástricas. Estudos de Lopes e Lopes et al. (2004) mostraram que a seiva do *Croton lechleri* possui a atividade antioxidante significativa contra os danos oxidativos induzidos pela apomorfina em *Saccharomyces Cerevisiae* sob todas as circunstâncias estudadas. Wallace (2007), por sua vez, descreve a promoção do uso da seiva do *Croton lechleri* no alívio de dor e inchaços, e no tratamento de dor e inflamação do sistema gastrointestinal como em gastrites, úlceras e diarreia infecciosas.

Apesar do grande número de estudos sobre a seiva *Croton lechleri* e das demais espécies de crotons, os relatos são embasados em dados de observação dos autores, experiência de sua utilização pela população local e alguns estudos experimentais. Contudo, nenhum estudo relata a observação e resultados da terapêutica desta seiva em humanos, com acompanhamento, nem comprovam a eficácia dos resultados apontados.

Dessa forma, considerando que a Seiva do *Croton lechleri* (sangue de dragão) apresenta resultados satisfatórios na cura de desordens cutâneas e no processo de reparo tecidual, este se apresenta como terapêutica para diversas patologias. A resposta inflamatória observada aos 30 dias, no Grupo II, confirma esta hipótese, uma vez que adiantado processo de reparação tecidual foi observado, com resultados semelhantes quando comparados com o Grupo I.

Considerando que o processo inflamatório pode ser desencadeado em consequência de microrganismos, por agressores químicos e físicos, a presença de células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos, polimorfonucleares) parece natural quando o tubo de polietileno, mesmo vazio, é implantado no dorso dos animais.

A metodologia empregada neste estudo, na qual os grupos controle e tratado encontram-se no mesmo animal, reduz significativamente o número de animais envolvidos no experimento, o que demonstra a eficácia do estudo e a preocupação com o excesso de animais em experimentos. Por outro lado, essa

metodologia pode trazer dúvidas, exigindo padronização da inclusão das peças, pois após a remoção dos tubos e confecção das lâminas a análise dos resultados pode ser comprometida. Neste estudo, a porção do tubo preenchida com guta-percha ficou voltada, sempre, para o lado direito.

As reações na “luz” do tubo preenchido com guta percha (Grupo I), neste trabalho, foram similares aquelas encontradas por Batista et al. (2006) onde os tubos de polietileno vazios introduzidos no dorso dos animais, bem como aqueles preenchidos com cones de guta-percha, não causaram reação inflamatória, o que justifica a utilização deste controle neste experimento.

Ozbas et al. (2003), demonstraram que os tubos de polietileno vazios provocaram pouca reação em tecido conjuntivo subcutâneo, não havendo diferença estatisticamente significativa da quantidade de infiltrado inflamatório no transcorrer dos dias, apesar de existir predominância na quantidade de macrófagos no 15º dia e de fibroblastos no 30º dia. Isso se justifica porque em região discreta ou intensamente inflamada ocorre o acúmulo de células provenientes do sistema imunológico, seguido da ingestão e digestão dos antígenos pelos macrófagos e síntese de fibras estruturais para recuperar o tecido pelos fibroblastos.

Ainda no experimento de Batista et al. (2006), a inflamação encontrada no grupo tratado endofill, aos sete dias, variou de discreta a moderada na região A (próxima à luz do tubo) e moderada a severa na região B (mais afastada da luz do tubo). Estes achados mostram uma reação inflamatória significativa. Aos 30 dias em algumas áreas ainda era encontrada reação inflamatória de moderada a intensa.

O estudo de Veloso et al. (2006) mostrou que os grupos controle, constituídos pelos tubos de polietileno vazios, apresentaram número de células inflamatórias inferior aos grupos experimentais.

Andersson et al. (2007) em seus achados histológicos relata diminuição do número de células inflamatórias ao longo do tempo (1, 3 e 28 dias), ausência de exsudato e ferida curada aos 28 dias.

O estudo de Bodrumlu et al. (2007) mostra, aos 7 e 15 dias, a presença de macrófagos, células plasmáticas e células gigantes multinucleadas. Aos 30 dias foi menos comum a presença de células mononucleadas.

A reação histológica observada Mori et al. (2009a) com pasta de acetazolamida, nos tempos de 7 e 15 dias, apresentou redução acentuada do

infiltrado inflamatório e sinais de reparação tecidual ilustrada pela presença de tecido conjuntivo com vasos sanguíneos, fibras colágenas e fibroblastos.

Outro experimento de Mori et. al. (2009b), com pasta de alendronato, apresentou inflamação nos tempos de 7 e 15 dias, e redução desta aos 45 dias.

Aos 15 dias, o sangue de dragão apresentou um tecido conjuntivo bastante diferenciado e uma menor quantidade de células inflamatórias o que sugere uma ação benéfica deste quando comparado ao grupo controle.

Os resultados do presente experimento mostram que o sangue de dragão, em razão da sua biocompatibilidade, merece novos estudos, principalmente relacionados à reparação tecidual no interior da cavidade bucal.



Conclusão

Conclusão

Em razão da semelhança da resposta inflamatória com o grupo controle, a seiva do *Croton lechleri* (sangue de dragão) mostrou-se biocompatível em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e abre a perspectiva para a realização de outras pesquisas.



Referências

Referências*

1. American Nacional Standards/ American Dental Association, 1982. Document no. 41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. New York, ANSI/ADA.
2. Andersson, M. Suska, F. Johansson, A. et al. 2007. Effect of molecular mobility of polymeric implants on soft tissue reactions: An in vivo study in rats. *J. Biom Mat Res. Part A*, 653-660.
3. Barroso, G.M. Morim, MP, Peixoto, AL, et al. 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: UFV. 443 p. il.
4. Batista, R.F.C., Hidalgo, M.M., Hernandez, L., et al., 2006. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. *J Biomed Mater Res. 81A*, 171-177.
5. Bodrumlu, E., Muglali, M., Sumer, M, et al., 2007. The Response of Subcutaneous Connective Tissue to a New Endodontic Filling Material. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater. 84*, 463–467.
6. Cai, Y., Chen, Z.P., Phillipson, J.P., 1993. Diterpene from *Croton lechleri*. *Phytochemistry. 32*, 755-760.
7. Chen, Z.P., Cai, Y., Phillipson, J.P., 1994. Studies on the anti-tumour, anti-bacterial, and wound-healing properties of dragon's blood. *Planta med. 60*, 541-545.

* O texto está de acordo com as normas da revista *Journal of Ethnopharmacolgy*, para qual o trabalho será enviado (Anexo B).

8. Conasems, 2005. Política Nacional de Medicina e Práticas Complementares – PMNPC, Brasília. Disponível: URL: <http://www.conasems.org.br>. Acessado em 08/07/2009.
9. De Pasquale, A., 1984. A pharmacognosy: the oldest modern science. J Ethnopharmacol. 11, 1-16.
10. Desmarchelier, C., Witting Schaus, F., Coussio, J., et al., 1997. Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell.-Arg. on the production of active oxygen radicals. J Ethnopharmacol. 58, 103-108.
11. Federation Dentaire International, 1980. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Part 4.11; subcutaneous implantation test, Int Dent J. 30, 173-174.
12. Fischer, H., Machen, T.E., Widdicombe, J.H., et al. 2004. A novel extract SB-300 from the stem bark latex of *Croton lechleri* inhibits CFTR-mediated chloride secretion in human colonic epithelial cells. J of Ethnopharmacol. 93, 351-357.
13. Gomes-Filho, J.E., Faria, M.D., Bernabé, P.F.E., et al., 2008. Mineral Trioxide Aggregate but not Light-cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. J Endod. 4, 62-65.
14. Gonzales, G.F., Valerio, L.G., 2006. Medicinal plants from Peru a review of plants as potential agents against cancer. Anticancer Agents Med Chem. 6, 429-444.
15. Govaerts, R., Frontin, D.G., Radcliffe-Smith, A., 2000. World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae) 1-4. The Royal Botanic Gardens, Kew.

16. Guevara, A.Q., Villacorta, O.G., 1998. Efecto de la intensidad de luz, metodo de conservación y tiempo de almacenamiento en la germinacion de *Croton lechleri* Muell Arg. *Folia Amazonica*. 9, 45-62.
17. Itokawa, H., Ichiara, Y., Mochizuka, M., et al., 1991. A cytotoxic substance from sangre de grado. *Chem Pharm Bull*. 39, 1041–1042.
18. Jones. K., 2003. Review of sangre de drago (*Croton lechleri*) – a South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and wounds: traditional uses to clinical research. *J Altern Complement Med*. 9, 877-896.
19. Kong, J., Chia, L., Goh, N., et al., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64, 923-933.
20. Lopes e Lopes, M.I., Saffi, J., Echeverrigaray, S., et al., 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *J Ethnopharmacology*. 95, 437-445.
21. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Rev*. 52, 673-751.
22. Milanowski, D.J., Winter, R.E., Elvin-Lewis, M.P., et al., 2002. Geographic distribution of three alkaloid chemotypes of *Croton lechleri*. *J Nat Prod*. 65, 814-819.
23. Mori, G.G., Moraes, I.G., Nunes, D.C., et al., 2009a. Biocompatibility of Acetazolamide Pastes in the Subcutaneous Tissue of Rats. *Braz Dent J*. 20, 17-21.

24. Mori, G.G., Moraes, I.G., Nunes, D.C., et al., 2009b. Biocompatibility evaluation of alendronate paste in rat's subcutaneous tissue. *Dent Traumatol.* 25, 209-212.
25. Olsson, B., Sliwowski, A., Langeland, K., 1981. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 7, 355-369.
26. Ozbas, H., Yaltirik, M., Bilgic, B., et al., 2003. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J.* 36, 281-287.
27. Pieters, L., De Bruyne, T., Van Dell, B., et al., 1993. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from South American dragon's blood (*Croton* sp.) as an inhibitor of cell proliferation. *J Nat Prod.* 56, 899-906.
28. Randau, K.P., Florêncio, D.C., Ferreira, C.P., et al., 2004. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. *Rev Bras Farmacogn.* 14, 89-96.
29. Risco, E., Ghia, F., Vila, R., et al., 2003. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangue de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. *Planta Med.* 69, 785-794.
30. Rossi, D., Bruni, R., Bianchi, N., et al., 2003. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg), latex. *Phytomedicine.* 10, 139-144.
31. Salatino, A., Salatino, M.L.F., Negri, G., 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Braz Chem Soc.* 18, 1-33.

32. Sandoval, M., Okuhama, N.N., Clark, M., et al., 2002. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 80, 121-129.
33. Sclafani, A.P., Romo, T., 2000. 3rd Biology and facial implants. *Facial Plast Surg.* 16, 3-6.
34. Tamariz, O.J.H., Capcha, M.R., Palomino, C.E.J.. et al., 2003. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Rev Med Hered.* 14, 81-103.
35. Torneck, C.D., 1966. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part 1. *Oral Surg.* 21, 378-387.
36. Tropical Plant Database. Sangre de drago 2007. Disponível em: URL: http://www.raintree.com/sangre_htm.
37. Ubillas, R., 1994. SP 303, an antiviral oligomeric proantocyanidin from the sap of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). *Phytomedicine.* 1, 77–106.
38. Veloso, H.H.P., Santos, R.A., Araújo, T.P., et al. 2006. Histological analysis of the biocompatibility of three different calcium hydroxide-based root canal sealers. *J Appl Oral Sci.* 14, 376-381.
39. Wallace, J., 2007. South American tree sap is a pain killer, anti-inflammatory and antibiotic. Disponível: URL: <http://naturalscience.com/ns/news/news27.html>
40. Webster, G.L., 1994. Classification of the Euphorbiaceae, *Annals of Missouri Botanical Garden.* 81, 3-32.

41. Williams, J.E., 2001. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. *Altern Med Rev.* 6, 567-579.

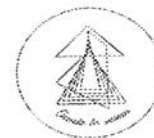


Anexos

Anexo A – Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DO SANGUE DE DRAGÃO EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATO”** sob responsabilidade da **Profa Dra GRAZIELA GARRIDO MORI** e colaboração de **Prof. WILSON ROBERTO POI** e **MILENA SILVA CAMPOS**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 06 de julho de 2007, de acordo com o protocolo no. 2007- 004731.

Araçatuba, 31 de julho de 2007.

Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Anexo B – Normas para publicação (Journal of Ethnopharmacology)

Guide for Authors

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs The Official Journal of the International Society for Ethnopharmacology

INTRODUCTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.
7. Conference announcements and news.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study

design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language Services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/journals>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, et al. *Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'*. J Ethnopharmacol 2006, 106: 290-302.

Matteucci, E., Giampietro, O. *Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 163-172.

T.S.A. Froede and Y.S. Medeiros *Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity*. J Ethnopharmacol 2008, 115: 173-183.

PREPARATION

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

*Article structure**Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

- *Title*. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations*. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- *Corresponding author*. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- *Present/permanent address*. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Authors must supply a graphical abstract for all types of articles at the time the paper is submitted. The abstract should summarize the contents of the paper in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership and for compilation of databases. Carefully drawn figures that serve to illustrate the theme of the paper are desired. The content of the graphical abstract will be typeset and should have the dimensions 5 cm by 17 cm. Authors must supply the graphic separately as an electronic file. For examples of graphical abstracts, please visit the home page of *Fitoterapia* at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/0367326X>.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and

present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see ☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

*References**Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Please use full journal names.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communication*. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose

any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

Anexo C – Ilustrações da fase experimental

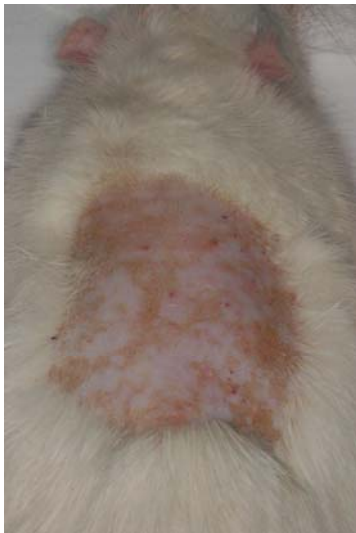


Figura 8 – Tricotomia no dorso dos animais.



Figura 9 – Início da incisão.



Figura 10 – Fase final da incisão.



Figura 11 – Divulsão dos tecidos.



Figura 12 – Inserção do tubo de polietileno.



Figura 13 – Sutura das bordas da ferida.

Anexo D – Ilustrações dos achados histológicos das áreas próximas à luz do tubo e mais afastadas.

Grupo I – Controle: 7 dias

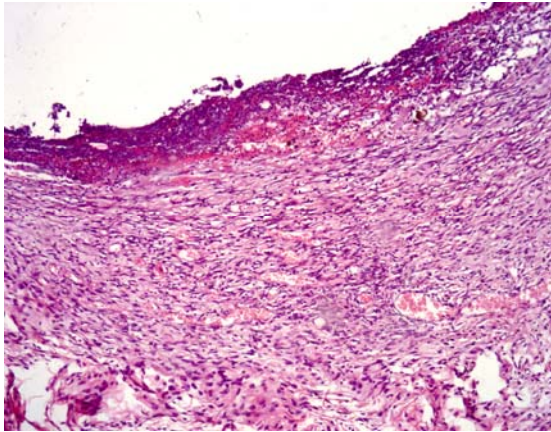


Figura 14 – Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.

Grupo II – Sangue de dragão: 7 dias

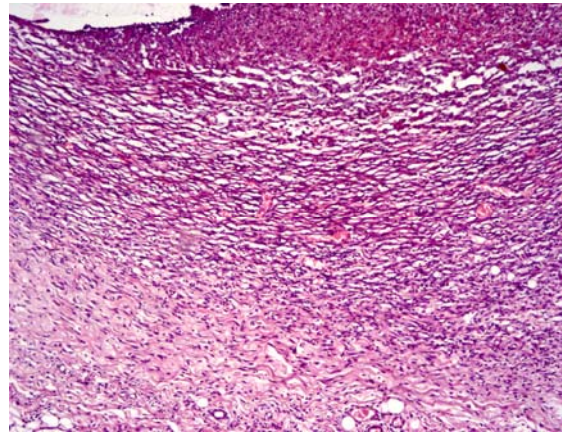


Figura 15 – Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.

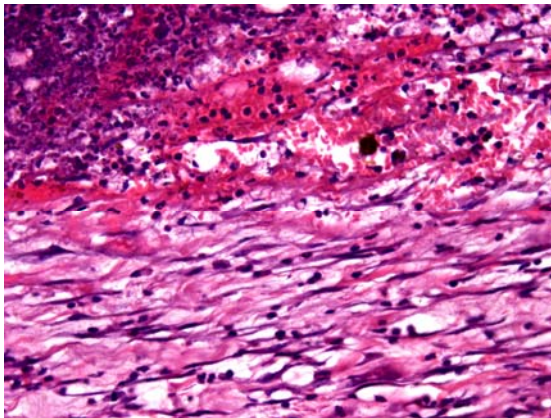


Figura 16 - Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.

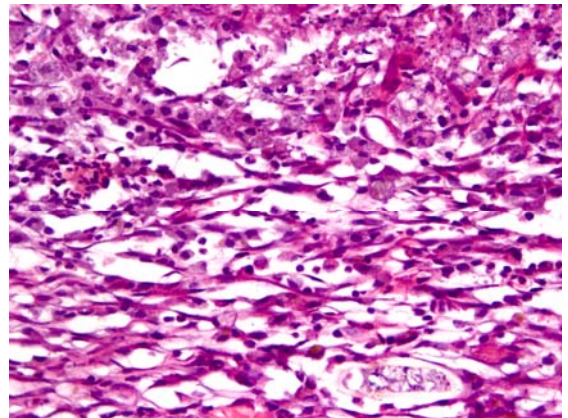


Figura 17 - Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.

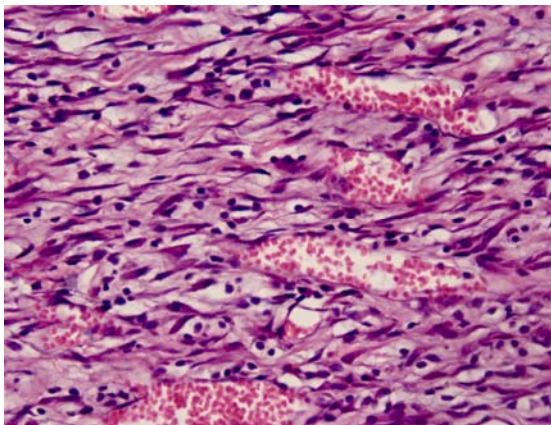


Figura 18 - Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.

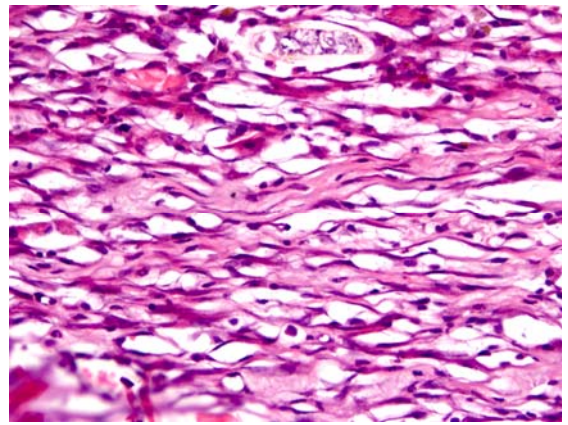


Figura 19 - Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.

Grupo I – Controle: 15 dias

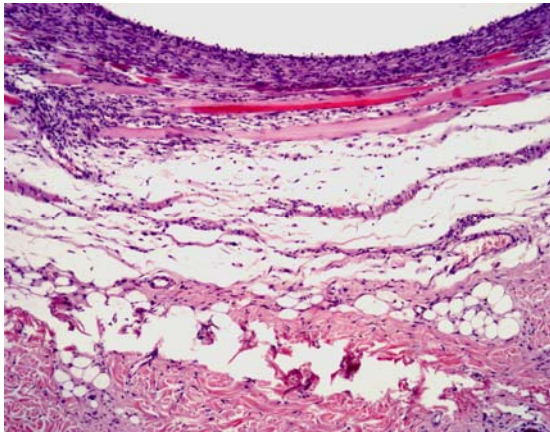


Figura 20 – Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.

Grupo II – Sangue de dragão: 15 dias

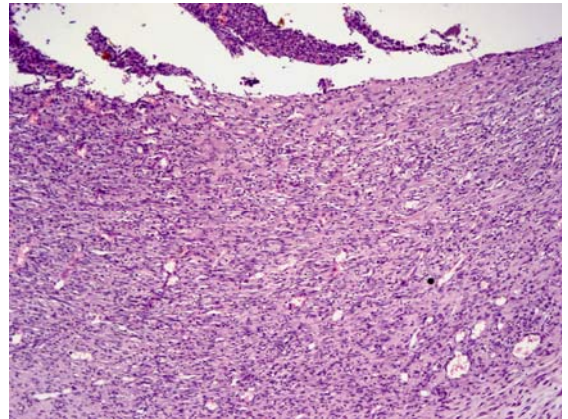


Figura 21 – Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.

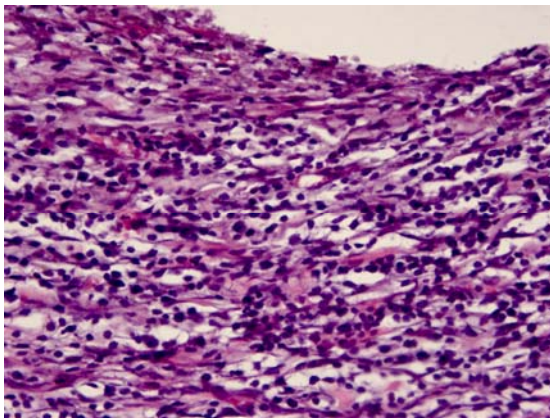


Figura 22 - Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.

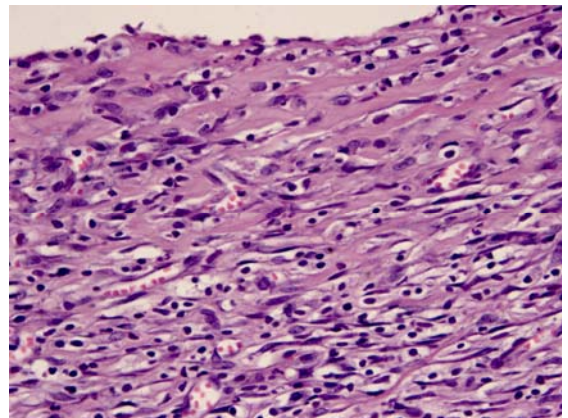


Figura 23 - Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.

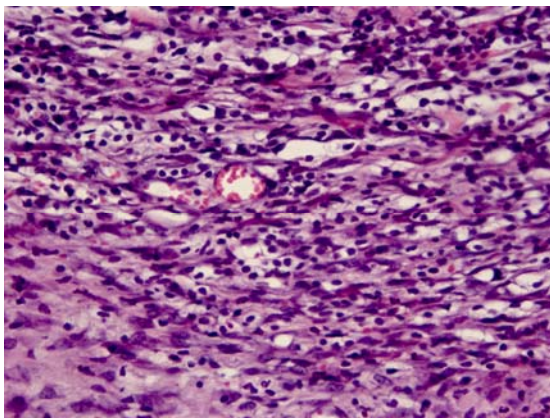


Figura 24 - Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.

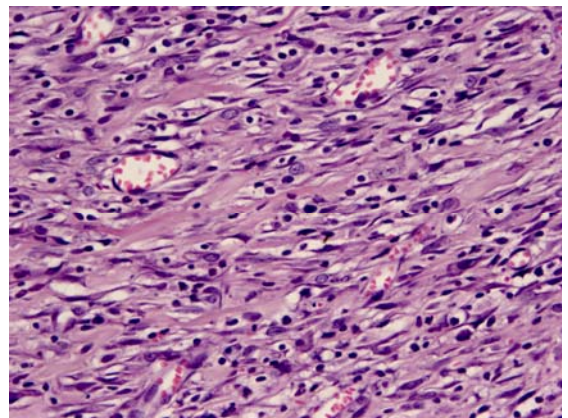


Figura 25 - Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.

Grupo I – Controle: 30 dias

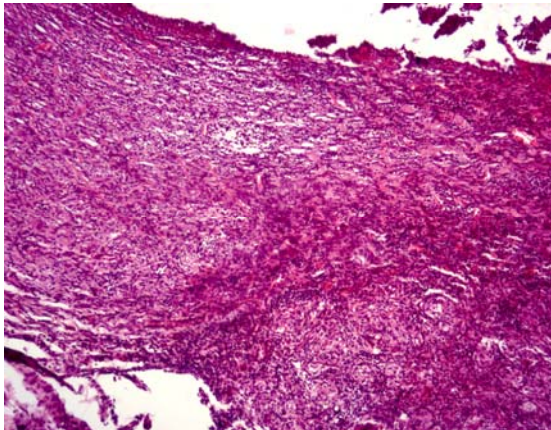


Figura 26 – Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.

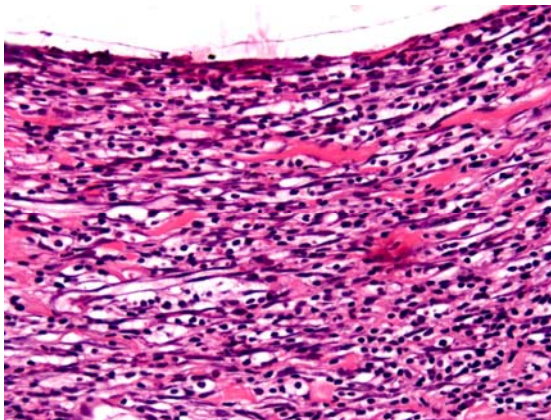


Figura 28 - Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.

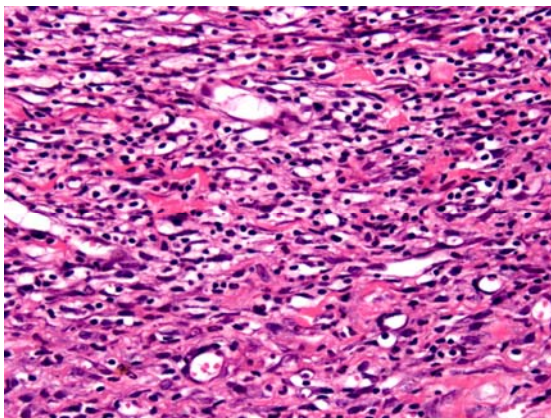


Figura 30 - Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.

Grupo II – Sangue de dragão: 30 dias

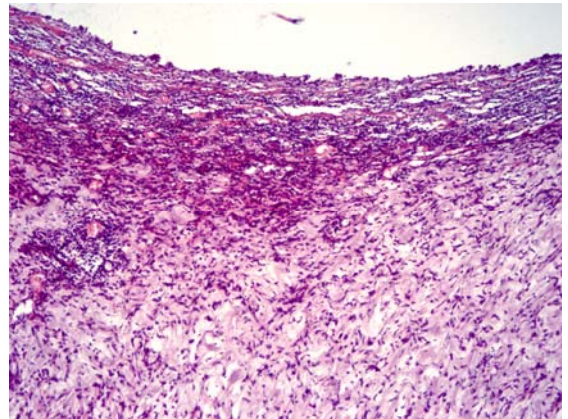


Figura 27 – Vista parcial da luz do tubo em menor aumento. Aumento original 100X.

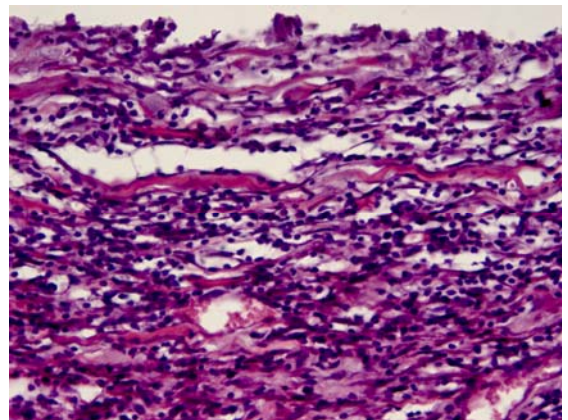


Figura 29 - Área próxima à luz do tubo. Aumento original 400X.

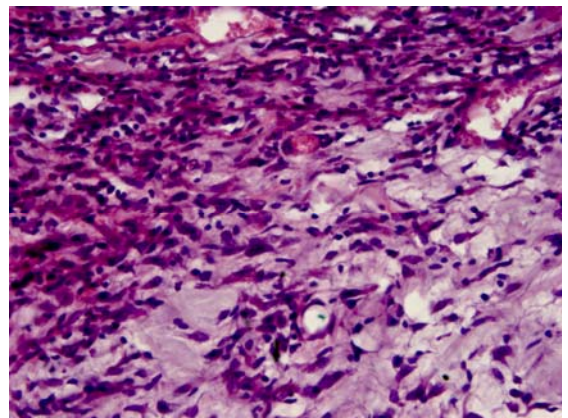


Figura 31 - Área mais afastada da luz do tubo. Aumento original 400X.

Anexo E – Escores da distribuição celular por Grupos (Ozbas et al., 2003).

