

**DENISE BELUCIO RUVIÉRE**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL EM RATOS, A MICRORGANISMOS  
ANAERÓBIOS E FACULTATIVOS INATIVADOS ASSOCIADOS A SOLUÇÕES  
PREPARADAS COM EXTRATOS VEGETAIS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO DE  
*ARAÇÁ (Psidium cattleianum)*.  
ANÁLISE EDEMOGÊNICA E MICROSCÓPICA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de  
Mesquita Filho" – UNESP, para obtenção do Título  
de Doutor em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Eloi Dezan Junior  
Co-orientador: Prof. Dr. Élerson Gaetti Jardim Júnior

Araçatuba  
2008

## OFEREÇO ESTE TRABALHO

---

*Ao meu Pai Celestial,*

*"Graças, Senhor, porque me ofertaste, em nome do amor, saúde para estar aqui, o perdão para minhas imperfeições e ainda, paciência, coragem e sabedoria para que eu pudesse caminhar sempre em linha reta e alcançar os meus sonhos. A vitória, hoje alcançada, me faz testemunha de Sua presença em minha vida".*

## DEDICO ESTE TRABALHO

---

Aos **meus pais**,

*Pela educação e diretrizes de vida que subsidiaram sempre a determinação com a qual abraço tudo aquilo que acredito.*

À minha mãe **Adenir Medeiros Belucio**,

*Pelo incentivo constante, pela força que me transmite me ensinando a testar meus próprios limites e vencer minhas limitações. Por todas as renúncias e sacrifícios, pelo respeito às minhas escolhas, pela parceria e cumplicidade, pela presença constante em minha vida e, especialmente, por dividir comigo a séria missão de educar e conduzir nosso pequeno Arthur para os âtrios da honestidade e do bom caráter.*

Ao meu pai **Mario Belucio**,

*Por ter sido meu maior e melhor exemplo de luta, por me ensinar a dimensão de valores essenciais a minha vida, norteando, através de suas atitudes, a vivência de uma relação inspirada em confiança e companheirismo.*

Ao meu marido **Hedércio Augusto Ruvierre**,

*Por aceitar o desafio de trilhar junto comigo os tortuosos e imprevisíveis caminhos do crescer. Pela ajuda constante e apoio imprescindíveis nos momentos árduos. Pelas renúncias pessoais e por este olhar que diz "coragem, vá em frente". Por compreender minha ausência necessária e cumprir com perfeição a tarefa de pai e mãe ao mesmo tempo. Pela generosidade de nutrir, com seu amor, meus ideais, tornando-os nossos. A você, não dedico apenas este trabalho, mas todas as conquistas da minha vida.*

Ao meu filho **Arthur Belucio Ruvierre**,

*Por ser o ponto de força e incentivo na busca pelos meus ideais. Por me oferecer um sorriso que alegria, um olhar que transmite coragem, um carinho que mostra a força do amor e uma palavra que me faz acreditar que, apesar das dificuldades, tudo pode se transformar em realidade.*

Ao meu irmão **Mario Luis Belucio**,

*Pelo amor que repartimos, pela fé que nos une e nos completa, pelo estímulo e atitudes de apoio irrestrito e acima de tudo, pelo exemplo de garra e determinação que me demonstra que, com dedicação, honestidade e otimismo, podemos alcançar todos os nossos sonhos.*

*"Um grande estímulo na vida é saber que alguém confia em nós e de nós espera grandes coisas".*

*(Dantas)*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

Ao meu orientador **Prof. Dr. Eloi Dezan Junior**,

*Símbolo de competência, profissionalismo, seriedade e humildade. Pela grandeza em compartilhar seus conhecimentos, com uma paciência infinita em ensinar, explicar, repetir e uma capacidade quase mágica de fazer tudo parecer mais simples. Suas atitudes transcenderam, em muito, o significado da orientação acadêmica, traduzindo-se num relacionamento pautado pela confiança e pela troca de experiências. Pela disponibilidade, por ter me acolhido de forma tão atenciosa, pela confiança e por acreditar nas minhas possibilidades, manifesto meu reconhecimento e gratidão.*

*"Há amigos que nos orientam,  
Homens que nos inspiram,  
Pessoas que nos ajudam ...  
Hã, entretanto, os que a um só tempo  
Reúnem todos esses méritos".*

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Élerson Gaetti Jardim Júnior**

*Por ser exemplo de incansável pesquisador e grande genialidade. Pelos valiosos ensinamentos e inesgotável paciência frente às minhas limitações. Por me instigar a refletir, questionar e desenvolver meus próprios conceitos e por ter tanto a acrescentar a todos que tiveram a sorte e o privilégio de suas orientações. Meu respeito e admiração.*

*"O professor medócre expõe  
O bom professor explica  
O professor superior demonstra  
O grande professor inspira".  
(William Arthur Ward)*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

*"O amor faz com que tudo, de repente, pareça possível".*

*(H. Jackson Brown)*

À tia **Maria Arany Medeiros** pelo constante apoio e pela forma tão atenciosa e generosa com que me oferece tudo o que há em você. Pelo amor dispensado ao "nosso" Arthur nos momentos em que mais precisei, por tudo que significa na minha vida, por representar uma fonte de equilíbrio, dinamismo e sabedoria e, sobretudo, por este enorme afeto que nos une, meu eterno reconhecimento e todo meu amor.

À **Dirce Campregher** pela extrema disponibilidade sempre em ajudar, pela forma gentil e caridosa com que lida com o Arthur, pelas incontáveis manifestações de afeto, por todo incentivo e, pelo imenso sentimento que existe entre nós, meu eterno muito obrigada.

À tia **Nair Belucio** pelo olhar constante de admiração, pelo incentivo no meu caminhar, por me apontar a Deus a todo instante e por minha fé que constantemente alimenta me fazendo acreditar que com Jesus nos guiando, tudo, tudo é possível. À você, todo meu carinho.

Ao tio **Paulo Nogueira** e tia **Cecília Belucio Nogueira** por tantas e tão significativas demonstrações de generosidade e amor. Por terem me "adotado" de forma tão carinhosa, participando de mais uma etapa da minha formação. Meu agradecimento e carisma.

À família **Belucio Nogueira**, representada nas pessoas do **Paulo Belucio Nogueira** e **Maria do Carmo Ferreira Belucio Nogueira**, por terem me acolhido nos primeiros dias de Araçatuba oferecendo-me palavras de otimismo e de ternura. Por todo carinho e apoio, meu sincero reconhecimento.

À minha segunda família: **Sr. Olavo Ruvierre, D. Ercília Augusto Ruvierre, Grasiela Augusto Ruvierre, Cristiane Augusto Ruvierre de Souza e Marcelo José Lopes de Souza**, pelo carinho, compreensão, paciência, ajuda e constante incentivo aos meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

*“Se a vida é o que permite a satisfação dos nossos sonhos, a amizade é o que possibilita que a vida se realize em toda sua plenitude”.*

*Às amigas **Luciana Estevam Simonato** e **Ellen Greves Giovanini** por terem oferecido verdadeiro e puro amor numa época que eu mais necessitava. Por toda atenção dispensada a mim e a minha “barriguinha”, pelas dificuldades partilhadas, pelas palavras de incentivo fundamentais nos momentos difíceis. Pelo enorme afeto que restou e por tudo que significaram, meu profundo agradecimento.*

*Às amigas **Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa** e **Rebeca Lima Afonso** por estenderem suas mãos desde o primeiro dia que estive em Araçatuba, pela disposição e carinho sempre oferecidos e pela amizade demonstrada em todos os momentos em que convivemos. Vocês se fizeram especiais na minha história de vida.*

*À amiga **Renata Zocal Novais** pela atenção, desprendimento, companheirismo, motivação, colaboração direta e decisiva e, sobretudo, pela convivência, que nos tornou amigas, dividindo todas as nossas angústias, frustrações, conquistas e alegrias. Obrigada por tudo.*

*À amiga **Daniela Atili Brandini** por ter sido meu ponto de apoio nos primeiros dias de Doutorado, pela ajuda, companheirismo, simpatia e pela forma carinhosa com que me recebeu, meu muito obrigada.*

*Às amigas **Simone Watanabe** e **Alessandra Cury Machado** pela amizade, colaboração e auxílio na execução da parte laboratorial deste trabalho.*

*Aos companheiros de Turma de Doutorado, **Ana Carolina Magalhães**, **Fernanda Lourenção Brighenti**, **Juliano Pelim Pessan**, **Kélio Garcia Silva**, **Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa** e **Rebeca Lima Afonso**, que partilharam dificuldades, anseios e alegrias. Meu abraço sincero.*

## AGRADECIMENTOS

---

*Apreendi que a vida pode ser rica e reservar espaço para crescer e evoluir. Que não é tão importante a chegada quanto o caminhar. Os amigos foram os frutos que alimentaram meus sonhos e me motivaram a seguir e dos mestres eu trago o talento e o entusiasmo pelo conhecimento. Encontrei alguns obstáculos que não se constituíram em impedimentos, pois fortaleceram minha resistência e me fizeram questionar, diminuindo minhas dúvidas. Trago na mente a recordação e as experiências vivenciadas com pessoas tão especiais e no coração o sentimento de gratidão por todos os que caminharam ao meu lado.*

*À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", no nome do atual Diretor **Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé** e da Vice-Diretora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Pires Soubhia**.*

*À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Robson Frederico Cunha** e da vice-coordenadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kikue Takebayashi Sasaki**, por terem me concedido a oportunidade de ser discente desse programa e possibilitar meu engrandecimento profissional.*

*Aos docentes do Departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Prof. Dr. Célio Percinoto**, **Prof. Dr. Robson Frederico Cunha**, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosângela dos Santos Nery**, **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Maria Herondina Coelho Ávila de Aguiar**, por estenderem seus conhecimentos, pelos ensinamentos transmitidos e pelo carinho com que me receberam. Meu respeito e gratidão.*

*Aos docentes do Departamento de Odontologia Restauradora, Disciplina de Endodontia **Prof. Dr. Roberto Holland**, **Prof. Dr. Valdir de Souza**, **Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé**, **Prof. Dr. Mauro Juvenal Nery**, **Prof. Dr. José Arlindo Otoboni Filho**, **Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho** e **Prof. Dr. Eloi Dezan Junior**, pela recepção e cordialidade a mim dispensada e por ter me permitido vislumbrar perspectivas diferentes para minha vida. Meu apreço e reconhecimento.*

Ao **Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho**, que de forma despojada, compartilhou seus conhecimentos e sua experiência, contribuindo no processamento laboratorial e leitura microscópica e por nos receber com tamanha simpatia no seu "espaço" de estudos.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti**, pela disponibilidade e inestimável colaboração na avaliação microscópica das amostras.

Aos funcionários da Departamento de Odontologia Infantil e Social, **Maria dos Santos Ferreira Fernandes** e **Mário Luis da Silva**, pelo atendimento sempre eficiente e cordial.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, Disciplina de Endodontia **Nelci Vieira**, **Neuza Angélica dos Santos** e **Hermelinda de Jesus Pereira Brefore**, pela atenção, gentileza, pela contribuição e ajuda nas várias etapas laboratoriais desse trabalho e, sobretudo pela amizade que foi fundamental em muitos momentos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Marina Midori Sakamoto Kawagoe**, **Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto** e **Diogo Luís Reatto**, pela simpatia e empenho em ajudar sempre.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Camilo Roberto Venâncio** e **João Batista Alves Correa**, pela cordialidade e auxílio e pela dedicação no tratamento dos animais.

Ao assistente de laboratório da Disciplina de Fisiologia **Mauro Alberto**, pela presença insubstituível nos procedimentos cirúrgicos.

À funcionária da Biblioteca **Ana Cláudia Grieger Manzatti**, pela colaboração na formação desse trabalho.

À **CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela bolsa concedida.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, minha lembrança e minha gratidão.

*Os sonhos são como vento, você os sente, mas não sabe de onde eles vieram e nem para onde irão.*

*Eles inspiram o poeta, animam o escritor, arrebatam o estudante, abrem a inteligência do cientista, dão ousadia ao líder. Traz vida.*

*Sem sonhos, os fracassos se tornam golpes fatais e o medo triunfa soberano na sua existência.*

*Mas para sonhar é preciso ter ousadia, é preciso ter garra, ter força. Sempre.*

*Fácil é se incluir dentro de um sonho ... difícil é fazer do sonho, uma realidade.*

*O caminho inclui obstáculos, provas e também perigos.*

*É necessário arriscar.*

*É necessário entrar na arena e, com o rosto marcado de poeira, suor e sangue, lutar com valentia.*

*Por vezes haverão falhas e erros, mas com grande entusiasmo e muita determinação se alcançará os triunfos de uma grande realização.*

*Se fracassar, ao menos foi por tentar grandeza e ousadia.*

*Fica o brilho da luta e a experiência de um árduo caminho.*

*Na concretização deste trabalho, a realização de mais um sonho.*

*Com este findar, a certeza de um aprendizado dolorido e gratificante ao mesmo tempo ... de mais maturidade alcançada e, sobretudo, de olhos inundados de alegria e contentamento, de um coração que transborda de emoção e de eterna gratidão à Deus por ter-me proporcionado sabedoria, persistência, dedicação e capacidade para chegar até aqui.*

*“Nunca me deixes esquecer,  
Que tudo que tenho,  
Tudo que sou,  
E o que vier a ter,  
Vem de Ti, Senhor !”*

Ruviére DB. Avaliação da resposta tecidual em ratos, a microrganismos anaeróbios e facultativos inativados associados a soluções preparadas com extratos vegetais aquoso e hidroalcoólico de araçá (*Psidium cattleianum*). Análise edemogênica e microscópica [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP; 2008.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vivo*, a resposta biológica imediata e tardia de soluções aquosa e hidroalcoólica preparadas com extrato vegetal de Araçá (*Psidium cattleianum*) associadas a microrganismos inativados. O controle utilizado foi soro fisiológico associado aos microrganismos inativados. Foi utilizado 0,1mL de uma suspensão contendo *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Peptostreptococcus micros* ATCC 33270 e *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406 inativados por calor, a qual foi misturada a 1mL de soro fisiológico ou solução aquosa ou hidroalcoólica de araçá. Para a análise edemogênica (resposta imediata), foram utilizados 18 ratos machos (*Rattus norvegicus*). Sob anestesia geral, os animais receberam injeção intravenosa de azul de Evans a 1%. Após 30 minutos, foi injetado 0,1mL da mistura de uma das soluções ou soro (associados aos microrganismos inativados), na região subcutânea dorsal. Os animais foram sacrificados após 3 e 6 horas e as peças obtidas colocadas em formamida por 72 horas. A leitura da análise edemogênica foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630nm. Para a análise microscópica (resposta tardia), tubos de polietileno contendo as soluções ou soro fisiológico acrescidos da solução de microrganismos inativados foram implantados na região dorsal de 30 ratos machos, que foram mortos após 7 e 30 dias. Não foi observada diferença significativa ( $p>0,05$ ) na quantidade de edema dos diferentes grupos nos tempos pós-operatórios. Os resultados obtidos pela leitura das lâminas em microscópio óptico apontaram reparo no período de 30 dias significativamente superior ao de 7 dias ( $p<0,0001$ ). No período de 7 dias a solução hidroalcoólica apresentou resposta significativamente superior a solução aquosa ( $p=0,05$ ) e uma tendência de melhor resultado que o controle. Pôde-se concluir que as soluções aquosa e hidroalcoólica de extrato de araçá associadas a microrganismos inativados apresentaram respostas biológicas semelhantes ao controle, indicando que não exercem interferência sobre os efeitos tóxicos advindos dos componentes bacterianos no sentido de favorecer o reparo, contudo, as associações não impediram o mesmo.

**Palavras-chave:** Teste de materiais. Extratos vegetais. Psidium. Edema. Inflamação. Bactérias anaeróbias.

Ruvière DB. Evaluation of the tissue answer in mice the inactivated anaerobic and facultative microorganisms associated the solutions prepared with watery vegetable and hydro alcoholic extract of araçá (*Psidium cattleianum*). Edemogenic and morphological analysis. Thesis (Doctor Degree in Pediatric Dentistry). Araçatuba: Dentistry College – São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp; 2008.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate, *in vivo*, the immediate and late biological reactions of hydro alcoholic and watery solutions prepared with vegetable extract of Araçá (*Psidium cattleianum*), associated to inactivated microorganisms. For the control group, physiological serum, associated to inactivated microorganisms, was used. For performing the investigation it was used 0.1mL of a suspension containing *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Peptostreptococcus micros* ATCC 33270 and *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406, inactivated by heat, which was mixed to 1mL of physiological serum or watery solution or hydro alcoholic extract of Araçá. For the edemogenic analysis (immediate reaction), 18 male mice (*Rattus norvegicus*) were used. The animals, under general anesthesia, received Evans blue intra shot at 1%. Thirty (30) minutes later, 0,1mL of one of the extracts or the serum - associated to the inactivated microorganisms - was injected on the animal dorsal under skin region. The animals were sacrificed after 3 and 6 hours and the materials obtained were placed into formamide for 72 hours. The edemogenic analysis reading was made by spectrophotometer with 630nm wavelength. For the morphological analysis (late reaction), 30 mice received implant of polyethylene duct with the extracts or the serum, added by the solution of inactivated microorganisms on the dorsal region, and after 7 and 30 days they were sacrificed. No significant difference ( $p>0,05$ ) in the edema amount of the different groups was observed postoperatively. Results obtained from the reading of species, in optical microscopy, showed a repair in the 30-day-period, which was significantly superior when compared to the 7-day-period ( $p<0,0001$ ). Nevertheless, in the 7-day-period the hydro alcoholic extract presented a significant superior response to the watery extract ( $p=0,05$ ) and a trend for better results than that of the control group. Thus, it was concluded that the watery and the hydro alcoholic solution of Araçá extracts, associated to the inactivated microorganisms, presented biological reactions similar to the ones in the control group, therefore showing that they do not exert interference on the toxic effect that emerges from the bacterial components, thus favoring the repair, however, the associations have not hindered the repair.

**Keywords:** Material test. Plants extracts. Psidium. Edema. Inflammation. Anaerobic bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Procedimentos cirúrgicos da Análise Edemogênica	34
<b>Figura 2 -</b>	Procedimentos cirúrgicos da Análise Microscópica	35
<b>Figura 3 -</b>	Extrato de araçá aquoso + bactérias	43/44
<b>Figura 4 -</b>	Extrato de araçá hidroalcoólico + bactérias	45/46
<b>Figura 5 -</b>	Soro fisiológico + bactérias	47/48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Espécies bacterianas utilizadas para o preparo da suspensão	28
<b>Tabela 2 -</b>	Valores da intensidade do exsudato inflamatório induzido pela inoculação das soluções. Valores obtidos em densidade óptica (DO)	37
<b>Tabela 3 -</b>	Análise de Variância	38
<b>Tabela 4 -</b>	Marcação dos escores atribuídos aos eventos observados na análise microscópica dos grupos em função do tempo	49
<b>Tabela 5 -</b>	Teste U de Mann-Whitney para os grupos avaliados	50
<b>Tabela 6 -</b>	Teste de Kruskal-Wallis para os grupos analisados	50
<b>Tabela 7 -</b>	Teste de Kruskal-Wallis para comparar todos os grupos analisados	51
<b>Tabela 8 -</b>	Médias dos postos das amostras ordenadas do melhor para o pior resultado	52

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1 -</b>	Representação gráfica do valor médio do edema ocorrido nos tempos operatórios	39
<b>Gráfico 2 -</b>	Representação gráfica do valor médio do edema ocorrido nos grupos avaliados	39
<b>Gráfico 3 -</b>	Representação gráfica do valor médio do edema nos dois tempos estudados, para os três grupos avaliados. Note que o soro e o aquoso apresentaram edema inicial menor que aumenta no período de 6h, enquanto que o hidroalcoólico apresenta decréscimo do edema com o passar do tempo	39
<b>Gráfico 4 -</b>	Representação gráfica da influência dos tempos pós-operatório nos resultados obtidos independentemente do grupo implantado	53
<b>Gráfico 5 -</b>	Representação gráfica da influência dos grupos analisados nos resultados obtidos, independentemente do tempo pós-operatório	53
<b>Gráfico 6 -</b>	Representação gráfica dos postos médios atribuídos aos grupos experimentais em função dos tempos operatórios. Nota-se significância de 5% entre hidroalcoólico e aquoso no período de 7 dias	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UNESP	=	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
FOA	=	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
CEEA	=	Comissão de Ética na Experimentação Animal
OMS	=	Organização Mundial de Saúde
Lab	=	Laboratório
DO	=	densidade óptica
HE	=	Hematoxilina e Eosina
SJRP	=	São José do Rio Preto
cm	=	centímetro
mm	=	milímetro
µm	=	micrometro
nm	=	nanometro
µg/mL	=	micrograma por mililitro
mg/kg	=	miligrama por quilograma
rpm	=	rotações por minuto
mL	=	mililitro
°C	=	Grau Celcius
et al.	=	e colaboradores
min.	=	minutos
X	=	vezes
%	=	porcentagem
+	=	mais
=	=	igual
p	=	nível de significância
®	=	marca registrada
n°	=	número
UFC	=	unidades formadoras de colônias
TNF	=	fator de necrose tumoral
ATCC	=	American Type Culture Collection
ADA	=	American Dental Association

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	PROPOSIÇÃO	21
3	MATERIAL E MÉTODO	22
3.1	PREPARO DOS EXTRATOS	22
3.2	MICROORGANISMOS E ASSOCIAÇÕES TESTE	23
3.3	ANIMAIS	24
3.4	TESTE EDEMOGÊNICO – REAÇÃO IMEDIATA	25
3.5	IMPLANTE EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS – REAÇÃO TARDIA	26
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	RESULTADOS	31
4.1	DA ANÁLISE EDEMOGÊNICA	31
4.2	DA ANÁLISE MICROSCÓPICA	34
5	DISCUSSÃO	48
5.1	DA CONCEPÇÃO	48
5.2	DA METODOLOGIA	51
5.3	DOS RESULTADOS	54
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXOS	71

## 1 INTRODUÇÃO\*

A participação dos microrganismos, seus produtos e subprodutos, na doença pulpar e periapical têm sido amplamente comprovada<sup>1,2,3,4,5</sup>. 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<sup>6,7,8</sup>, de onde podem produzir quadros bacterêmicos e infecciosos à distância.

Sabe-se que a ação mecânica dos instrumentos não é capaz de eliminar grande parte dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares infectados, não atingindo a intimidade dos túbulos dentinários e sua complexidade anatômica, local onde estão alojadas bactérias que não foram eliminadas pelo preparo biomecânico<sup>9</sup> ou aquelas localizadas nas reabsorções periapicais (infecção extra-radicular) e/ou protegidas pelo biofilme apical<sup>10</sup>. Ainda que o preparo biomecânico reduza significativamente o número de microrganismos, aqueles que persistiram, ao se multiplicarem, ocasionam uma recontaminação do mesmo<sup>9</sup>, podendo estes ser novamente detectados na luz do canal principal após 72 e 96 horas<sup>4,8</sup>.

Embora confinados ao canal radicular, os microrganismos continuam sua proliferação e elaboração de produtos e subprodutos tóxicos oriundos de seu metabolismo, potencialmente capazes de produzir efeitos tóxicos ou deletérios. A maioria dos componentes do tecido pulpar necrótico exerce efeito tóxico e, tradicionalmente, tais subprodutos de decomposição têm sido vistos como fatores fundamentais na etiologia da lesão periapical<sup>11</sup>.

Também, a persistência de bactérias, endotoxinas (lipopolissacarídeos), de produtos e subprodutos do metabolismo bacteriano e da necrose pulpar e de corpos estranhos, entre os quais bactérias mortas, induz a uma resposta inflamatória e imunológica, com ativação do sistema complemento e do metabolismo do ácido aracdônico conduzindo a processos que podem induzir ou culminar com o desenvolvimento de uma lesão periapical<sup>11</sup>.

Têm-se buscado atingir o controle bacteriano por meio de diferentes recursos, como a utilização de soluções irrigadoras antimicrobianas durante o preparo biomecânico<sup>12,13,14</sup> e a utilização de uma medicação entre sessões ou curativo de demora, fundamental e indispensável para o sucesso pós-tratamento, principalmente em dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente<sup>8,15</sup>.

---

\* Texto formatado de acordo com as normas Vancouver (Anexo A).

Com essa finalidade, muitos medicamentos foram testados ao longo dos anos, como o paramonoclorofenol canforado (PMCC), os derivados fenólicos, os aldeídos e os esteróides em combinação com os antibióticos<sup>8</sup>, o digluconato de clorexidina, o hidróxido de cálcio, entre outros.

Porém, a possibilidade de emprego de outras substâncias químicas dotadas de propriedades antimicrobianas, poderá também disponibilizar condutas aplicáveis e funcionais para o tratamento de dentes decíduos e permanentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica, as quais, para serem indicadas na prática odontológica, devem resguardar os princípios biológicos do tratamento de canais radiculares.

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas<sup>16</sup>.

Apesar do estudo das plantas medicinais ter surgido no século XIX, acredita-se que a utilização das plantas como medicamento seja tão antiga quanto a própria humanidade<sup>17,18,19</sup>. O uso de recursos naturais pela população é orientado por um conjunto de conhecimentos acumulados, resultantes da relação direta de seus membros com o meio ambiente, motivada por um modo de vida que ainda guarda acentuada dependência da proximidade com a natureza<sup>20</sup>.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as plantas medicinais seriam a maior e melhor fonte de obtenção de fármacos para a humanidade<sup>21</sup>. A importância dos produtos naturais na formulação dos medicamentos pode ser salientada quando se considera que, mesmo nos países industrializados, 45% dos produtos farmacêuticos provêm de produtos naturais. Essa proporção é ainda maior nos países em desenvolvimento<sup>16</sup>.

Neste contexto, é importante evidenciar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de novos fármacos<sup>16,22</sup>.

Por milhares de anos na China, medicamentos contendo extratos de plantas medicinais são utilizados para o tratamento de várias patologias entre as quais a cárie e a doença periodontal. A efetividade desses extratos como medicamentos antiinflamatórios tem sido demonstrada, além de sua atividade antimicrobiana para microrganismos bucais<sup>23</sup>.

No Brasil, país que concentra uma parcela significativa da biodiversidade vegetal do planeta, estima-se que existam entre 55 e 80 mil espécies vegetais na Amazônia, e apenas

2% delas foram estudadas cientificamente<sup>24</sup>. No entanto, existem controvérsias, oriundas principalmente da imprecisão de dados e da falta de pesquisa, sobre o número de espécies vegetais existentes no Brasil. Segundo Maciel et al.<sup>18</sup>, o Brasil é o país com maior número de espécies vegetais no mundo, muitas com potencial para obtenção de novas drogas. Porém, pouco se sabe sobre a composição química de 99,6% de nossa flora<sup>25</sup>, evidenciando o número reduzido de experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* capazes de comprovar a eficácia e ausência de toxicidade das denominadas "plantas medicinais".

O estudo sistemático das plantas medicinais envolve conhecimento em várias áreas como antropologia, botânica, agronomia, química, farmácia, incluindo a medicina e a odontologia. Por meio do estudo interdisciplinar é possível chegar às espécies realmente benéficas e à dosagem correta para cada espécie de acordo com a especificidade da sua aplicação e a possível toxicidade de algumas espécies<sup>24</sup>.

Com relação à Odontologia, estudos realizados recentemente, utilizando extratos de plantas do cerrado brasileiro, têm evidenciado atividades antimicrobianas potentes, demonstrando resultados promissores sobre o controle da microbiota bucal<sup>26,27,28,29,30</sup>.

Especificamente com relação ao araçá, objeto do presente estudo, Bianco<sup>26</sup>, em 2004, por meio de um estudo *in vitro*, avaliou os efeitos de 26 extratos obtidos de 18 espécies vegetais na aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro, a sua atividade antimicrobiana e a influência que esses extratos possuem sobre a capacidade de desmineralização da hidroxiapatita por esses microrganismos. Foram utilizados *Streptococcus mutans* GS 5, *Streptococcus mutans* ATCC 1910 e 5 isolados clínicos obtidos de pacientes com alto risco à cárie que foram identificados de acordo com suas características bioquímico-fisiológicas e microscópicas. As soluções aquosa e hidroalcoólica de araçá inibiram o crescimento microbiano tanto das cepas na forma planctônica, quanto no biofilme. As preparações hidroalcoólica e aquosa 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 álcool como líquido extrator sem prejuízo para a atividade antimicrobiana.

Também, Landucci<sup>28</sup>, utilizando 22 espécies de plantas de uso na medicina popular nas regiões de cerrado, das quais foram obtidos 33 soluções hidroalcoólicas e 33 soluções aquosas, observou atividade inibitória sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35688 e ATCC 1910 e sobre *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 e ATCC 25586, tanto em estado

planctônico, quanto no biofilme, evidenciando resultados positivos para o extrato obtido da folha de araçá (*Psidium cattleianum*), tanto na forma hidroalcoólica quanto aquosa.

A atividade antimicrobiana das soluções aquosa e hidroalcoólica de extrato de araçá também foram avaliadas sobre microrganismos periodontopatogênicos, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 2564, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 33384, 10 isolados clínicos de *P. gingivalis* e 10 isolados de *F. nucleatum* obtidos de bolsas periodontais de pacientes portadores de periodontite crônica, demonstrando efeitos inibitórios em todos os microrganismos testados, tanto na forma planctônica, quanto no biofilme<sup>30</sup>.

Com o objetivo de comparar a resposta biológica imediata e tardia a soluções aquosa e hidroalcoólica de extratos de araçá, com o soro fisiológico, em ratos, Novais<sup>31</sup> realizou um estudo por meio da análise edemogênica e microscópica e concluiu que os extratos utilizados apresentaram respostas biológicas semelhantes ao soro fisiológico, demonstrando potencialidade para futuro uso na Odontologia.

O araçá (*Psidium cattleianum*), pertence à família Myrtaceae, e recebe outras sinonímias como araçá-do-campo e araçá-comum. É encontrado no Brasil em estado silvestre no Amazonas, Pará, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso e Santa Catarina, também na Argentina, Paraguai e México<sup>32</sup>. Apesar do número reduzido de estudos, apresenta comprovada ação antimicrobiana<sup>26,28</sup> e possível potencial antiinflamatório<sup>31</sup>, além de possuir biocompatibilidade comprovada por meio de estudo *in vivo*<sup>31</sup>.

Dada a biocompatibilidade apresentada pelos extratos aquoso e hidroalcoólico de araçá<sup>31</sup> e das propriedades antimicrobianas averiguadas anteriormente surge a necessidade de estudos para avaliar a capacidade desses extratos em neutralizar produtos e subprodutos de bactérias inativadas provenientes de infecções endodônticas.

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual imediata e tardia a associação de microrganismos inativados com soluções aquosa ou hidroalcoólica preparadas com extrato de araquá, comparadas com a associação de microrganismos inativados com o soro fisiológico, por meio da:

- 1) Análise Edemogênica, quantificando o edema
- 2) Análise Microscópica, avaliando a resposta tecidual frente a implantes subcutâneo em ratos

### 3 MATERIAL E MÉTODO

O presente trabalho foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo nº 2008 – 000165), tendo sido aprovado (Anexo B).

#### 3.1 PREPARO DOS EXTRATOS

As plantas foram colhidas em áreas não desmatadas e mantidas como reserva permanente em propriedades rurais dos municípios de Carolina (MA), sendo o período da coleta, correspondente ao período chuvoso daquela região (dezembro a fevereiro).

Foram preparadas soluções aquosa e hidroalcoólica de extratos de folha de araçá (*Psidium cattleianum*).

As folhas utilizadas no preparo dos extratos, foram colhidas de plantas com aspecto sadio e bom desenvolvimento, sem sinais de envelhecimento, doenças e pragas. Antes de retirá-las, foi realizada uma leve raspagem para remoção de poeira ou insetos impregnados na superfície. As folhas foram lavadas em água corrente e colocadas para secagem inicial em locais ventilados à temperatura ambiente (média 27°C), então submetidas à secagem em estufa em temperatura controlada de 37°C, até que se apresentassem secas e quebradiças<sup>33</sup>.

Após seleção do material considerado em bom estado de conservação ou representativo, foi realizada a etapa de fragmentação, que consiste na divisão das folhas em partículas de tamanho homogêneo, por meio de trituração manual e então reduzidas a pó por meio de um triturador.

#### PREPARO DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA

A solução hidroalcoólica foi obtida de acordo com metodologia empregada por Navarro et al.<sup>34</sup>. Foram utilizados 20 gramas das folhas fragmentadas e 250mL de etanol 80%, as quais foram transferidas para um frasco âmbar (500mL) para obtenção da solução hidroalcoólica do extrato. Para tanto, o frasco foi agitado vigorosa e manualmente durante três minutos, cinco vezes ao dia durante 12 dias, a fim de assegurar a adequada extração dos princípios ativos.

Posteriormente, foi realizada a filtração da preparação por meio de filtração comum. O produto resultante foi esterilizado por filtração em membrana de éster de celulose de 0,22µm (Millipore®) e introduzida em frasco âmbar esterilizado, armazenado em freezer.

## PREPARO DA SOLUÇÃO AQUOSA

A solução aquosa foi preparada de acordo com metodologia descrita por Landucci<sup>28</sup> com modificações. Assim, 20 gramas de folha de araquá foram adicionados a 250mL de água destilada e mantidos a 100°C por 5 minutos, a 55°C por 1 hora e em temperatura ambiente por 72 horas. A mistura foi agitada a cada 24 horas. A solução aquosa foi purificada por meio de filtração fracionada em membranas de éster de celulose de porosidade 0,65µm e esterilizada por filtração em membrana de 0,22µm (Millipore®) e introduzida em frasco âmbar esterilizado, armazenado em freezer.

## 3.2 MICRORGANISMOS E ASSOCIAÇÃO TESTE

Os microrganismos utilizados foram *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Peptostreptococcus micros* ATCC 33270 e *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406, provenientes do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. A Tabela 1 apresenta as 6 espécies bacterianas utilizadas, sendo 4 Gram-negativas, 2 Gram-positivas e, quanto à tensão de oxigênio, cinco anaeróbias obrigatórias e uma anaeróbia facultativa (Tabela 1).

Esses microrganismos foram cultivados em Agar Brucella acrescido de 5% de sangue desfibrinado de cavalo, suplementado com hemina (10 µg/mL) e menadiona (10 µg/mL), e incubados em dessecadores de vidro do tipo Pyrex, em condições de anaerobiose (90% N<sub>2</sub> + 10 CO<sub>2</sub>), a 37°C, por 24-48 horas. Decorrido o período de incubação, preparava-se uma suspensão contendo 10<sup>9</sup> cel/mL, como determinado em espectrofotômetro (A= 0,360ηm) e essa suspensão era submetida a 3 lavagens sucessivas em solução fisiológica, por centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos, para a remoção de resíduos do meio de cultura. A seguir, o precipitado bacteriano era ressuspendido em 3 mL de solução fisiológica e mantido por 30 minutos em banho maria a 60°C, para inativação das cepas de referência.

Como controle do processo de inativação ou morte celular, alíquotas de cada cepa de referência foram cultivadas nas condições anteriormente descritas e a ausência de viabilidade microbiana era determinada quando verificava-se a ausência do crescimento em um meio de cultura ideal, como o ágar Brucella-sangue suplementado.

A suspensão microbiana contendo todas as bactérias foi ressuspensa em 1mL de soro fisiológico (controle) e em 1mL das soluções aquosa ou hidroalcoólica de extrato de arará, formando, desta forma, os seguintes grupos experimentais:

- 1) Aquoso: associação bactérias ( $5.10^6$  cel/mL de cada cepa de referência) + 1mL de extrato de arará aquoso.
- 2) Hidroalcoólico: associação bactérias ( $5.10^6$  cel/mL de cada cepa de referência) + 1mL de extrato de arará hidroalcoólico.
- 3) Soro: associação bactérias ( $5.10^6$  cel/mL de cada cepa de referência) + 1mL de soro fisiológico.

Tabela 1 - Espécies bacterianas utilizadas para o preparo da suspensão.

Espécie bacteriana	Procedência da cepa	Morfotipo	Fisiologia
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Peptostreptococcus micros</i>	ATCC 33270	Coco Gram-positivo	Anaeróbio
<i>Prevotella intermedia</i>	ATCC 25611	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subespécie <i>nucleatum</i>	ATCC 25586	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	ATCC 35406	Bastonete Gram-negativo	Anaeróbio
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Coco Gram-positivo	Facultativo

### 3.3 ANIMAIS

Para a realização deste experimento foram utilizados 48 (quarenta e oito) ratos machos da variedade Wistar (*Rattus norvegicus*) padronizados quanto à saúde, idade, sexo e peso corporal, com idade de 2 meses e massa corporal de aproximadamente 250-300 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, mantidos durante todo o período experimental com dieta sólida (Guabi Nutrilabor, Mogiana Alimentos SA, Brasil) e água *ad libitum*.

### **3.4 TESTE EDEMOGÊNICO – REAÇÃO IMEDIATA**

Para a quantificação do edema proporcionada pelas soluções e pelo soro fisiológico acrescido da solução de microrganismos, utilizou-se a metodologia descrita por Taveira<sup>35</sup>. Foram utilizados 18 animais divididos em grupos de três para cada período avaliado (3 e 6 horas) e para cada grupo experimental.

Os animais foram injetados com apenas uma das soluções com extrato de arará, aquosa ou hidroalcoólica, acrescido da solução de microrganismos, ou com soro fisiológico também acrescido da solução de microrganismos para o grupo controle. Em cada grupo, seis animais receberam injeção para os dois períodos de avaliação, 3 e 6 horas.

### **PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS**

Para realização da intervenção cirúrgica, os animais foram submetidos à anestesia geral com xilazina (Rompún - Bayer), na proporção de 25mg/Kg e quetamina (Francotar – Virbac), na proporção de 50mg/kg misturadas na mesma seringa, via intramuscular (parte posterior da coxa do animal).

A seguir, os animais receberam na veia peniana a injeção intravenosa de azul de Evans a 1% (Evans Blue Difco Lab.) aplicada com seringa de insulina na proporção de 0,2mL da solução para 100g de massa corporal<sup>35,36,37</sup> (Figura 1A).

Após 30 minutos da injeção do corante, os animais receberam no tecido conjuntivo da região dorsal, com auxílio de seringas hipodérmicas de 1mL esterilizadas e agulhas 13x0,3 descartáveis, 0,1mL da solução correspondente (aquosa ou hidroalcoólica) ou soro (Figura 1B). Foi injetado apenas uma solução em cada animal, na região dorsal, tendo a linha média como referência e próximo à região caudal.

Os animais foram mortos em câmara saturada com halotano após 3 e 6 horas.

Posteriormente, foi realizada a tricotomia manual da região dorsal do animal, evidenciando a área de edema, representada por um halo de coloração azul (Figuras 1C e 1D). Com o auxílio de uma tesoura, foi removida a pele dorsal dos animais, com margem de segurança (Figuras 1E e 1F). A padronização das peças removidas foi realizada por meio de um vazador de ferro com 23mm de diâmetro (Figuras 1G, 1H, 1I, 1J e 1K).

As peças padronizadas foram picotadas com tesoura cirúrgica e colocadas em frascos contendo 4mL de formamida (Vetec - Química- RJ – Brasil), permanecendo em estufa a 45°C por 72h para extração do corante, pela dissolução do tecido<sup>35,36,37</sup> (Figuras 1L, 1M e 1N).

Decorrido esse período, as soluções foram filtradas com auxílio de gaze hidrófila esterilizada e funil de vidro, e recolhidas em frascos apropriados para se proceder à análise em espectrofotômetro (Figura 1O).

A leitura do filtrado foi realizada em um espectrofotômetro Cary 50 Bio (Varian), utilizando ondas com comprimento de 630nm, correspondente ao pico máximo de absorção do corante<sup>35</sup> (Figuras 1P e 1Q). Os dados obtidos foram tabelados e submetidos à análise estatística.

### **3.5 IMPLANTE EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS – REAÇÃO TARDIA**

Para esta etapa foram utilizados 5 animais para cada grupo, aquoso, hidroalcoólico e soro, em dois períodos de análise, 7 e 30 dias<sup>38,39,40</sup>, totalizando 30 animais para o experimento. Cada animal recebeu dois implantes, contendo a mesma solução, totalizando 10 implantes para cada grupo.

#### **TUBOS DE POLIETILENO**

Foram confeccionados tubos de polietileno a partir de cortes de sonda uretral número 4 (Mac Med, São Paulo, Brasil), com 7mm de comprimento e 1mm de diâmetro interno, os quais serviram para acomodação das soluções (soluções aquosa, hidroalcoólica e soro acrescidas de bactérias).

Com objetivo de impedir extravasamento, uma das extremidades do tubo foi vedada com guta percha. No restante do tubo foi introduzido um cone de papel esterilizado de diâmetro compatível com o tubo, tendo o cuidado de cortá-lo 0,2mm aquém do comprimento total, para que não houvesse contato direto do mesmo com o tecido e ao mesmo tempo oferecesse condições de reter as soluções no interior dos tubos (Figuras 2A e 2B). Após preparo, os tubos foram submetidos a processo de esterilização a óxido de etileno (Oximed – São José do Rio Preto).

## **PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA IMPLANTE**

Para realização da intervenção cirúrgica, os animais foram submetidos à anestesia geral com xilazina (25mg/kg) e quetamina (50mg/kg) misturadas na mesma seringa, via intramuscular (parte posterior da coxa do animal).

Após tricotomia da área dorsal e anti-sepsia com polivinilpirrolidona a 1% (Riodente, Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil), foi realizada uma incisão longitudinal com lâmina de bisturi número 15 acompanhando a linha mediana, com extensão de 2cm atingindo o tecido subcutâneo. A seguir, foi realizada a divulsão, com extensão de aproximadamente 3cm, em ambos os lados da incisão, com auxílio de uma tesoura de ponta romba (Figuras 2C, 2D, 2E e 2F).

Imediatamente antes do implante, foram injetados no interior dos tubos, com auxílio de seringa de insulina esterilizada, as associações contendo as soluções aquosa, hidroalcoólica ou soro fisiológico acrescidas dos microrganismos inativados (Figura 2G).

Desta forma, do lado direito e esquerdo foram implantados, no tecido subcutâneo dos animais, os tubos de polietileno contendo a mesma solução (aquosa, hidroalcoólica ou soro) (Figuras 2H e 2I). A incisão longitudinal da pele foi posteriormente suturada com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson) (Figuras 2J).

Os animais foram mortos aos 7 e 30 dias para obtenção das peças contendo o tubo de polietileno, circundado por tecido conjuntivo adjacente (Figura 2K).

Uma vez removidos, os tecidos foram fixados em solução de formalina a 10%, por 48 horas e lavadas em água corrente por 12 horas. Posteriormente as peças foram desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina, sendo orientadas de maneira a permitir cortes histológicos do implante em seu sentido longitudinal. Os cortes, semi-seriados e com 6 micrometros de espessura, foram corados com Hematoxilina e Eosina para análise microscópica. Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Os resultados foram obtidos por meio da leitura dos espécimes em microscópio binocular (Leica, Alemanha) das respostas teciduais tardias induzidas pelos extratos testados comparadas ao grupo controle, num aumento de 10X para a medição da espessura da cápsula, e num aumento de 40X para a contagem do número de células inflamatórias. Foi avaliada

apenas a extremidade do implante em que os extratos ou soro fisiológico acrescidos das soluções de microrganismos inativados ficaram em contato com os tecidos (Figura 2L).

Foi realizada uma análise descritiva dos três grupos experimentais e uma análise quantitativa.

Quanto à espessura da cápsula fibrosa, os seguintes escores foram utilizados: escore 0 (zero) para cápsula fibrosa considerada fina, de espessura inferior a 150 $\mu$ m ou escore 3 para cápsula fibrosa considerada espessa, superior a 150 $\mu$ m<sup>41,42</sup>.

A avaliação da irritação tecidual produzida pelas soluções dos extratos vegetais e soro fisiológico acrescido da solução de microrganismos, foi realizada segundo critérios descrito por Bernabé et al.<sup>43</sup> e pelo *Federation Dentaire International Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics*<sup>44</sup>. Desta forma, o infiltrado inflamatório presente, do tipo crônico ou agudo, foi assinalado em conformidade com o número aproximado de células inflamatórias presentes em aumento de 40X. A ausência de células inflamatórias recebeu escore 0 (zero). Quando o número de células inflamatórias foi inferior a 25, o infiltrado inflamatório foi considerado pequeno (escore 1). O critério moderado (escore 2) foi atribuído se fossem detectadas de 25 a 125 células inflamatórias. Se essas células ocorressem em número superior a 125, o infiltrado inflamatório foi considerado severo ou intenso (escore 3).

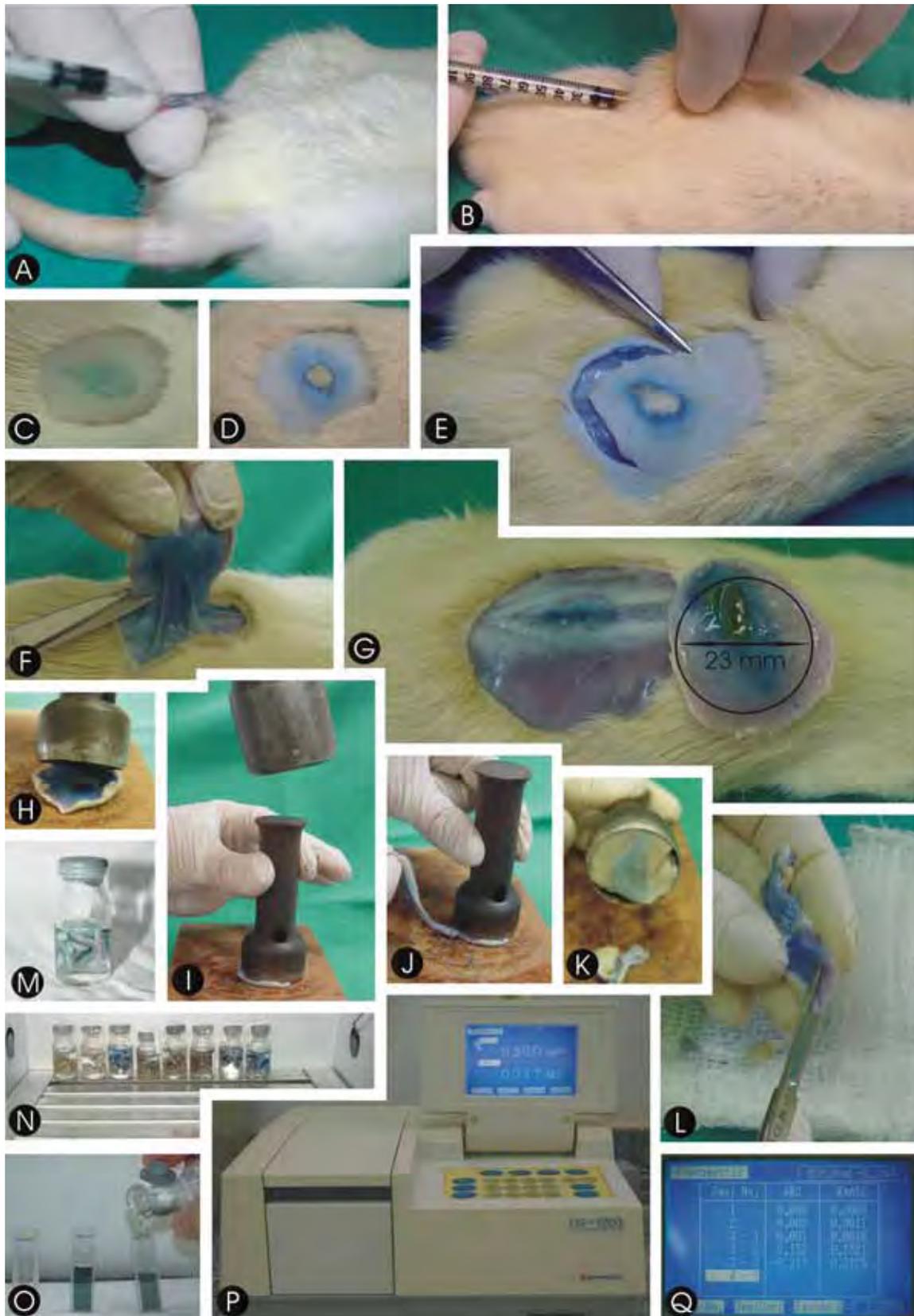
### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do Teste Edemogênico, relativos a quantidade de edema, foram analisados por meio do teste de análise de variância a dois critérios de avaliação (Tempo e Solução), utilizando o *software* GMC 2002<sup>45</sup>.

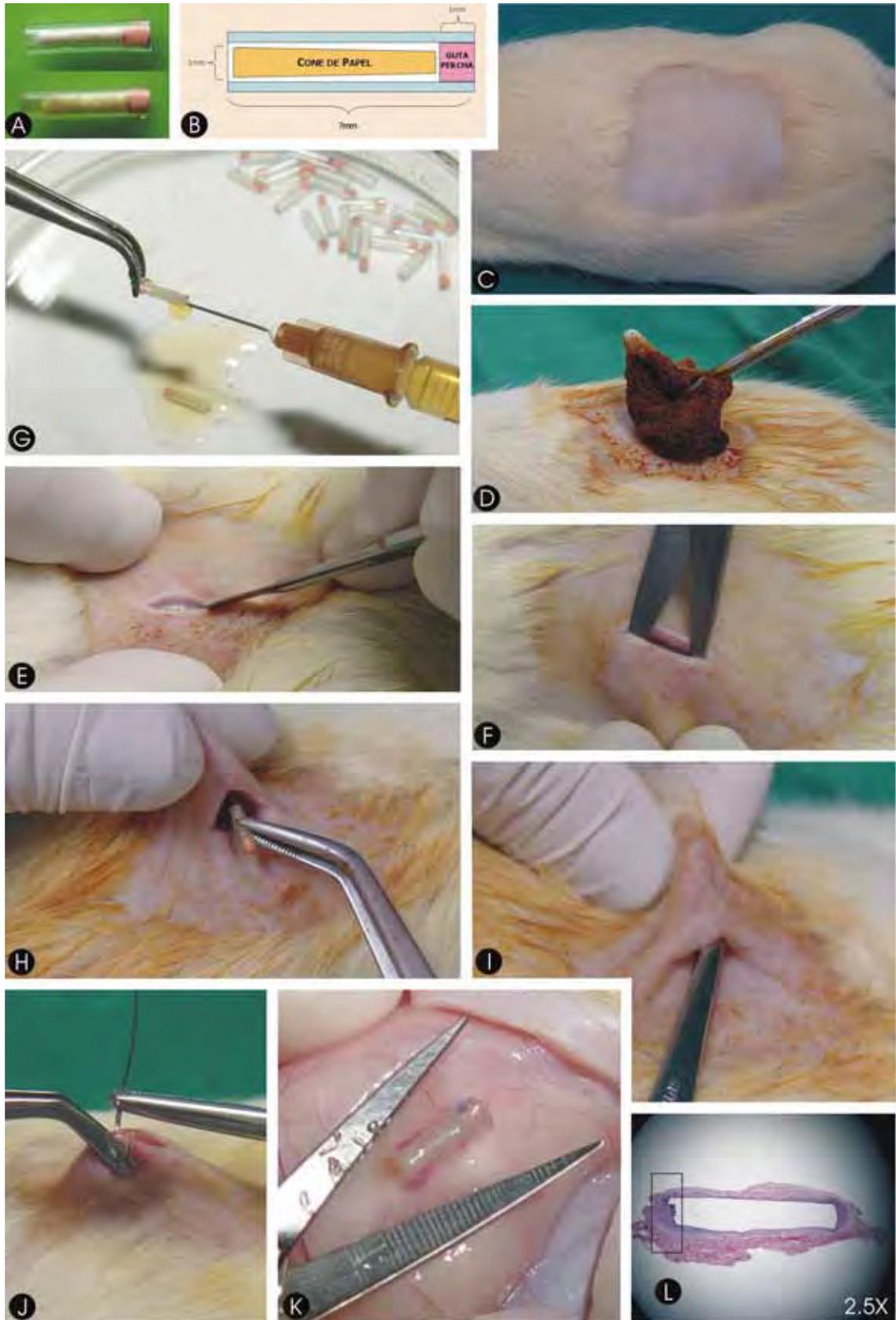
Os resultados da Análise Microscópica, relativos aos achados microscópicos na forma de escores, foram submetidos ao teste de Mann-Whitney, para comparar os resultados obtidos nos dois períodos de avaliação (7 e 30 dias). Posteriormente, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar os grupos entre si sem considerar a influência do tempo e, finalmente, uma última comparação, por meio do teste Kruskal-Wallis, onde todos os grupos e os dois períodos foram comparados.

O nível mínimo adotado para significância foi de 5%.

<b>Figura 1 – Procedimentos cirúrgicos da Análise Edemogênica</b>	
<b>A-</b>	Injeção intravenosa de azul de Evans a 1% (Evans Blue Difco Lab.) na veia peniana.
<b>B-</b>	Injeção de 0,1mL do extrato correspondente ou soro acrescido da solução de microrganismos.
<b>C e D-</b>	Evidenciação da área de edema após tricotomia manual da região dorsal do animal.
<b>E e F-</b>	Remoção da pele do animal com margem de segurança.
<b>G-</b>	Padronização da peça com 23mm de diâmetro.
<b>H-</b>	Posicionamento do vazador de ferro.
<b>I-</b>	Vazador de ferro efetuando corte da peça.
<b>J-</b>	Remoção dos excessos da peça.
<b>K-</b>	Aspecto interno da peça após corte.
<b>L-</b>	Peça sendo picotada com tesoura cirúrgica.
<b>M-</b>	Frasco com 4mL de formamida (Vetec.Química.RJ.Brasil) contendo peça picotada.
<b>N-</b>	Estufa a 45°C, contendo os frascos com 4mL de formamida mais as peças picotadas.
<b>O-</b>	Soluções após filtração sendo introduzidas em frascos apropriados para se proceder à análise em espectrofotômetro.
<b>P-</b>	Espectrofotômetro Cary 50 Bio (Varian).
<b>Q-</b>	Tela do espectrofotômetro com os dados resultantes da leitura.



<b>Figura 2 – Procedimentos cirúrgicos da Análise Microscópica</b>	
<b>A-</b>	Tubos de polietileno utilizados para o implante.
<b>B-</b>	Representação gráfica do tubo de polietileno utilizado para os implantes subcutâneo.
<b>C-</b>	Tricotomia manual da região dorsal do animal.
<b>D-</b>	Anti-sepsia com polivinilpirrolidona a 1% (Riodente, Rioquímica, S.J. Rio Preto, Brasil).
<b>E-</b>	Incisão longitudinal atingindo o subcutâneo com lâmina de bisturi número 15.
<b>F-</b>	Divulsão com tesoura de ponta romba.
<b>G-</b>	Seringa de insulina injetando o extrato acrescido da solução de microrganismos no interior dos tubos de polietileno.
<b>H-</b>	Implantação dos tubos de polietileno no tecido subcutâneo do animal.
<b>I-</b>	Manobra para a manutenção do implante no interior do tecido.
<b>J-</b>	Sutura da incisão longitudinal da pele com fio de seda 4-0.
<b>K-</b>	Remoção da peça contendo o tubo e os tecidos circundantes com auxílio de tesoura.
<b>L-</b>	Panorama dos aspectos microscópicos dos tecidos circundantes ao implante. Coloração HE, aumento original 2.5X. Em destaque: região analisada em microscópio óptico (extremidade do implante em que os extratos ou soro, acrescidos das soluções de microrganismos inativados, ficaram em contato com os tecidos).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 DA ANÁLISE EDEMOGÊNICA

#### AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA RESPOSTA TECIDUAL IMEDIATA NOS PERÍODOS EXPERIMENTAIS

Os resultados obtidos da leitura em espectrofotômetro estão expressos na Tabela 2:

**Tabela 2** - Valores da intensidade do exsudato inflamatório induzido pela inoculação das soluções.  
Valores obtidos em densidade óptica (DO)

Grupos	Tempo			
		<b>3 HORAS</b>	<b>6 HORAS</b>	<b>Média</b>
<b>Aquoso</b>		0.303	0.310	0,49
		0.367	0.840	
		0.389	0.737	
		Média 0,35	Média 0,63	
<b>Hidroalcoólico</b>		0.606	0.325	0,66
		0.641	0.415	
		0.949	1.003	
		Média 0,73	Média 0,58	
<b>Soro</b>		0.395	0.429	0,46
		0.472	0.614	
		0.299	0.573	
		Média 0,39	Média 0,54	
<b>Média</b>		0,49	0,58	

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos na Tabela 2 foram submetidos à análise estatística pelo teste de Análise de Variância (Tabela 3).

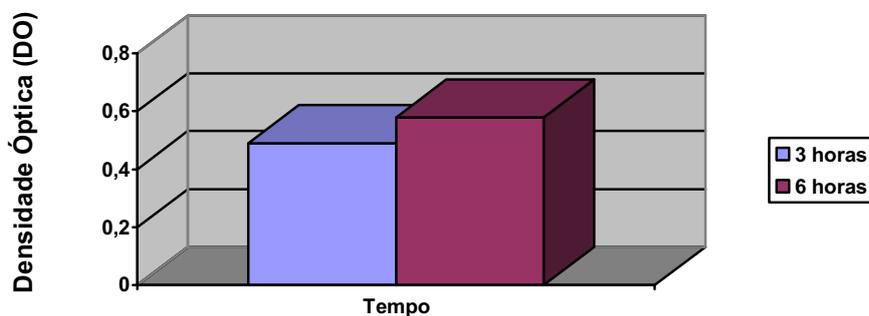
**Tabela 3** – Análise de Variância

Fonte de variação	Soma de Quadr.	G. L.	Quadr. Méd.	( F )	Prob. H0
Tempo (T)	0,0378	1	0,0378	0,84	37,975%
Grupo (G)	0,1306	2	0,0653	1,46	27,116%
Interação TxG	0,1444	2	0,0722	1,61	23,963%
Resíduo	0,5383	12	0,0449		
Variância total	0,8511	17			

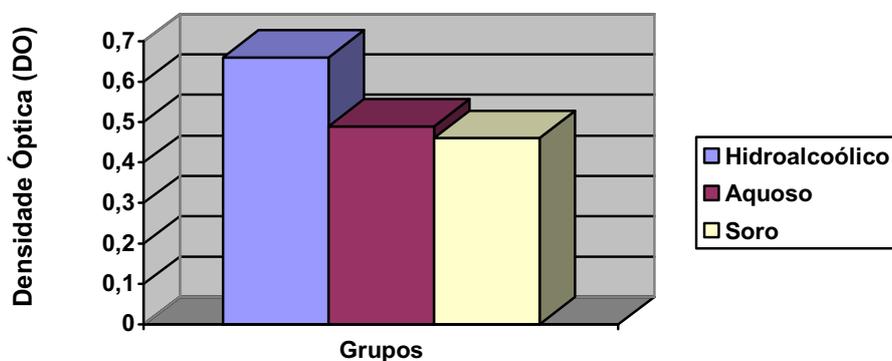
Quando comparou-se os tempos analisados (3 e 6 h), independente dos grupos avaliados, não houve diferença significativa ( $p=37,98\%$ ). O Gráfico 1 ilustra os resultados dessa comparação.

Na comparação entre os grupos, independente do tempo de estudo, pelo resultado da análise de variância verifica-se não haver diferença significativa ( $p=27,12\%$ ) entre os grupos. O Gráfico 2 ilustra os resultados dessa comparação.

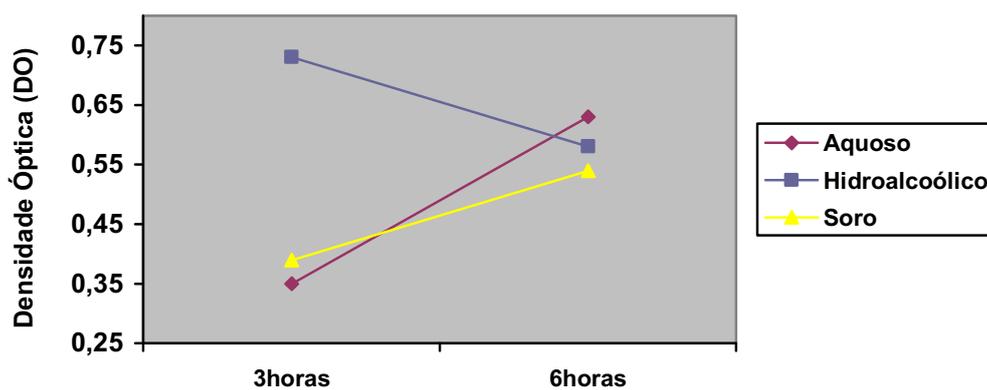
Na interação tempo X grupo, quando comparados os diferentes grupos e os dois tempos operatórios entre si, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=23,96\%$ ), embora perceba-se que o aquoso apresenta aumento do edema com o passar do tempo, enquanto o hidroalcoólico apresenta edema inicial maior que diminui no período de 6 horas. O grupo soro apresentou uma tendência de ser maior que o aquoso no período de 3 horas, porém menor que o edema apresentado pelo aquoso no período de 6 horas. Como pode ser observado no Gráfico 3.



**GRÁFICO 1** – Representação gráfica do valor médio do edema ocorrido nos tempos operatórios



**GRÁFICO 2** - Representação gráfica do valor médio do edema ocorrido nos grupos avaliados



**GRÁFICO 3** - Representação gráfica do valor médio do edema nos dois tempos estudados, para os três grupos avaliados. Note que o soro e o aquoso apresentaram edema inicial menor que aumenta no período de 6h, enquanto que o hidroalcoólico apresenta decréscimo do edema com o passar do tempo

## 4.2 DA ANÁLISE MICROSCÓPICA

Dos 60 blocos obtidos (20 blocos de cada grupo, sendo 10 referentes ao período de 7 dias e 10, ao período de 30 dias), 14 espécimes foram desconsiderados devido a problemas inerentes ao processamento laboratorial. Assim a análise foi efetuada considerando 46 espécimes, sendo 15 para o aquoso, 19 para o hidroalcoólico e 12 para o soro (Tabela 4).

### **AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA RESPOSTA TECIDUAL AOS IMPLANTES NOS PERÍODOS EXPERIMENTAIS.**

#### **Araçá Aquoso + bactérias - 7 dias**

De maneira geral, este grupo apresentou "cápsula" espessa, bastante povoada de células inflamatórias, com predomínio de macrófagos, numerosos linfócitos poucos leucócitos e outras células mononucleadas, características de uma inflamação crônica. Pode-se constatar também a presença de alguns plasmócitos. Alguns poucos fibroblastos foram evidenciados em meio a raras fibras colágenas que se apresentavam em disposição complexa. Foi observada densa rede de vasos sanguíneos de pequeno calibre no interior da "cápsula" e maiores nos tecidos adjacentes. Todas as amostras apresentaram espessura de "cápsula" maior que 150 $\mu$ m (Figuras 3A e 3B, Tabela 4).

#### **Araçá Aquoso + bactérias - 30 dias**

As imagens microscópicas indicam que ocorreu uma grande diminuição do quadro inflamatório comparado ao período de 7 dias. O aglomerado de células inflamatórias foi substituído por uma delgada cápsula de fibras colágenas, dispostas paralelamente à área do implante. Foi possível identificar a presença de alguns fibrócitos e alguns poucos fibroblastos em meio às fibras colágenas. Em geral a camada de macrófagos estava mais discreta e a quantidade de linfócitos e outras células mononucleadas estava bastante diminuída. Verificou-se também vasos sanguíneos menos numerosos e calibrosos no interior do tecido conjuntivo. Nenhuma amostra apresentou espessura de cápsula maior que 150 $\mu$ m (Figuras 3C e 3D, Tabela 4).

**Araçá Hidroalcoólico + bactérias – 7 dias**

Grupo com um quadro semelhante ao do grupo anterior no mesmo período, com cápsula menos espessa, porém igualmente rica em quantidade de macrófagos, linfócitos, poucos leucócitos e outras células inflamatórias mononucleadas. Alguns plasmócitos também puderam ser observados. Houve novamente pouco predomínio de fibroblastos, acompanhado de raras e discretas fibras colágenas apresentadas de maneira desorganizada. Assim como no grupo anterior, foram observados numerosos capilares sanguíneos espalhados por toda a área. Em seis de nove amostras a espessura de "cápsula" foi maior 150µm (Figuras 4A e 4B, Tabela 4).

**Araçá Hidroalcoólico + bactérias – 30 dias**

Este grupo apresentou-se bastante homogêneo. A cápsula fibrosa mostrou-se nitidamente mais fina e condensada, com considerável redução da quantidade de células inflamatórias, porém evidenciando a presença de uma camada de macrófagos acompanhando toda a superfície da área do implante. As fibras colágenas estão mais organizadas e também mais espessas, num grau de maturação mais avançado em relação ao tempo de 7 dias. Os fibroblastos apresentam-se com núcleos mais alongados e finos (indicando uma diminuição do metabolismo do colágeno), em geral dispostos paralelamente às fibras colágenas. Nenhuma amostra apresentou espessura de cápsula maior que 150µm (Figuras 4C e 4D, Tabela 4).

**Soro Fisiológico + bactérias - 7 dias**

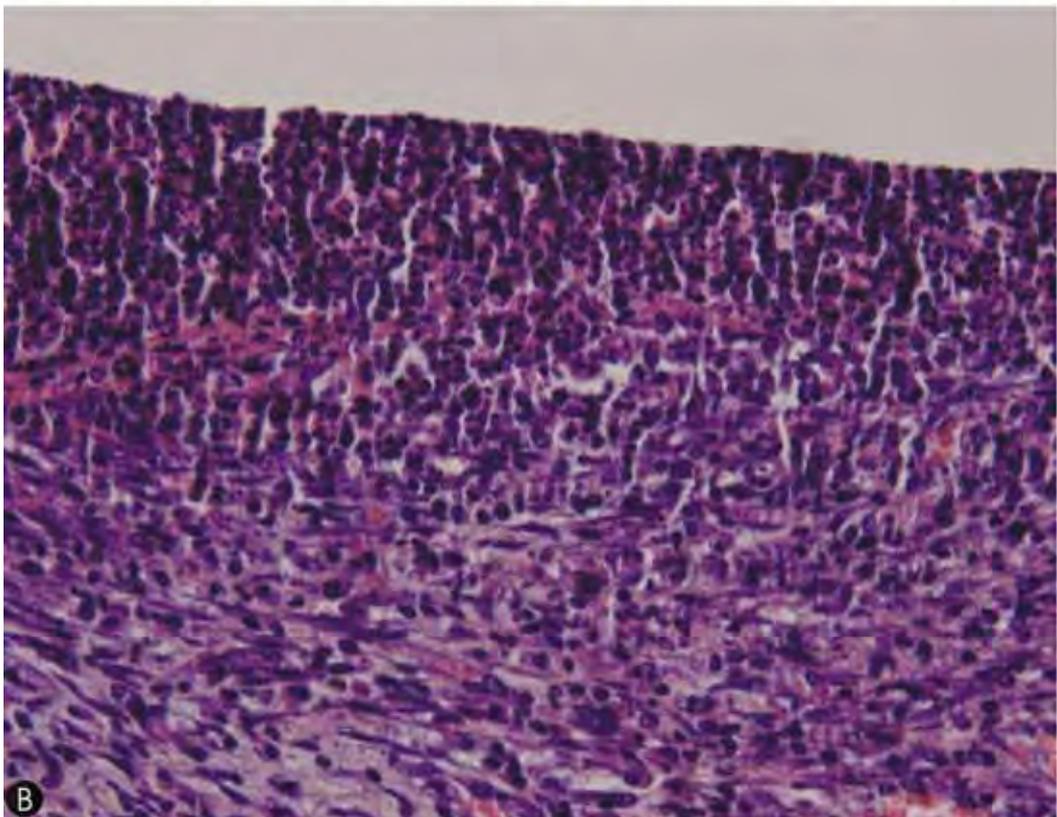
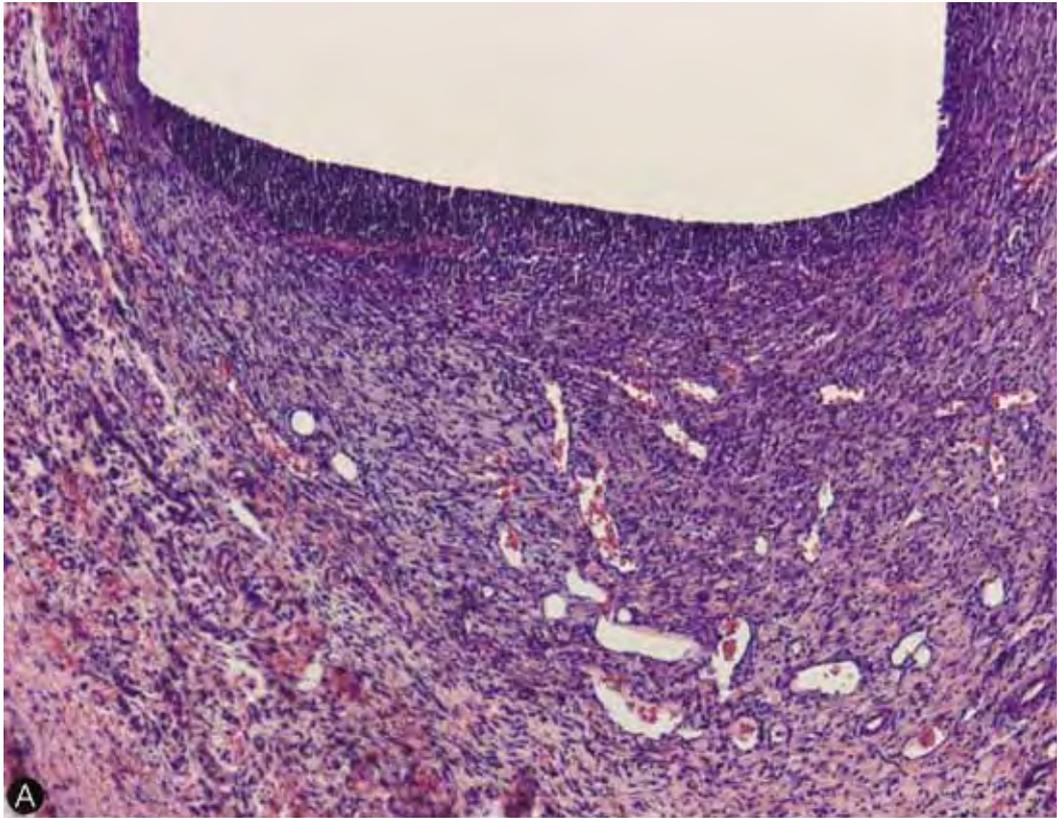
A resposta inflamatória do tecido conjuntivo próximo ao implante apresentou-se bastante ampla. A "cápsula" mostrou-se bastante espessa e povoada de células inflamatórias, com predomínio de macrófagos, linfócitos alguns neutrófilos, e outras células mononucleadas. Presença de raros fibroblastos, entremeados a poucas fibras colágenas, que se apresentavam em disposição desorganizada e complexa. Pode-se observar densa rede de capilares sanguíneos distribuídos por toda a área. Todas as amostras apresentaram espessura de "cápsula" maior que 150µm (Figuras 5A e 5B, Tabela 4).

**Soro Fisiológico + bactérias – 30 dias**

Este grupo também apresentou um grau maior de organização tecidual em relação ao período de 7 dias, apresentando uma cápsula fibrosa mais fina e composta por fibroblastos dispostos paralelamente a área do implante entremeados por numerosas fibras colágenas, que se apresentavam de forma organizada, indicando maturação do reparo. Foi observado também um aglomerado de macrófagos na superfície em contato com a área do implante e presença de alguns linfócitos e outras poucas células inflamatórias. Foi constatada a presença de vasos de menor calibre ao longo de toda área, distantes da cápsula. Nenhuma amostra apresentou espessura de cápsula maior que 150 $\mu$ m (Figuras 5C e 5D, Tabela 4).

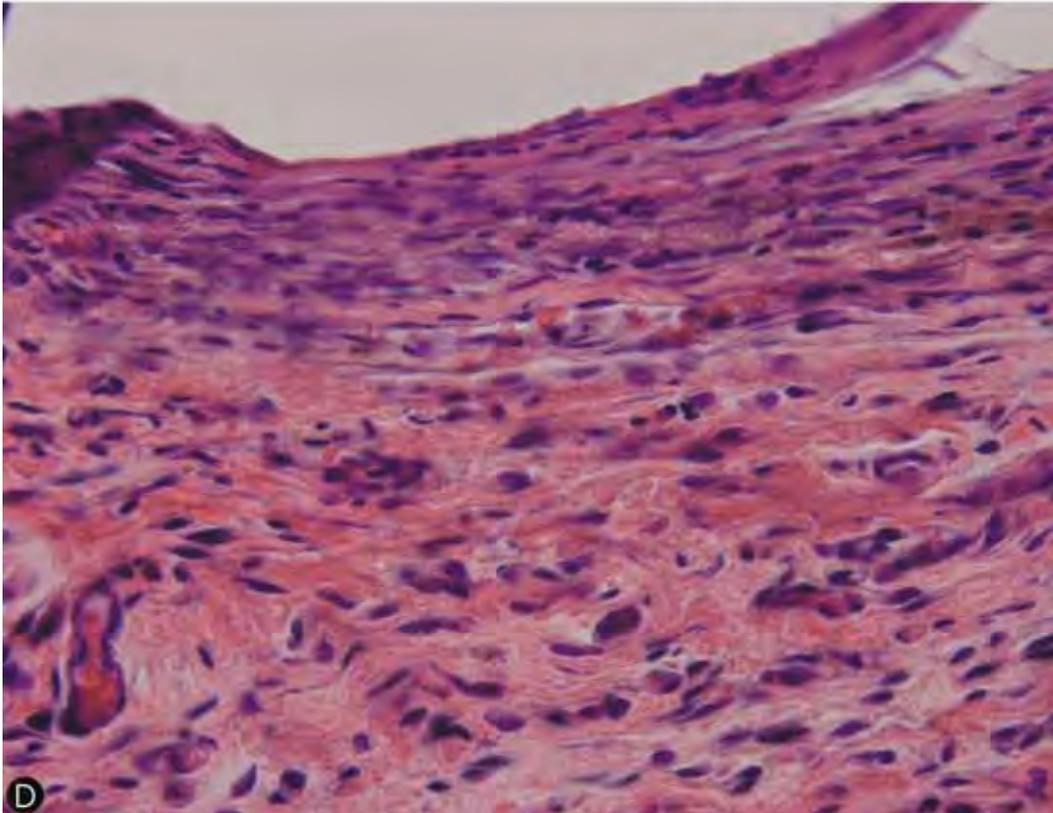
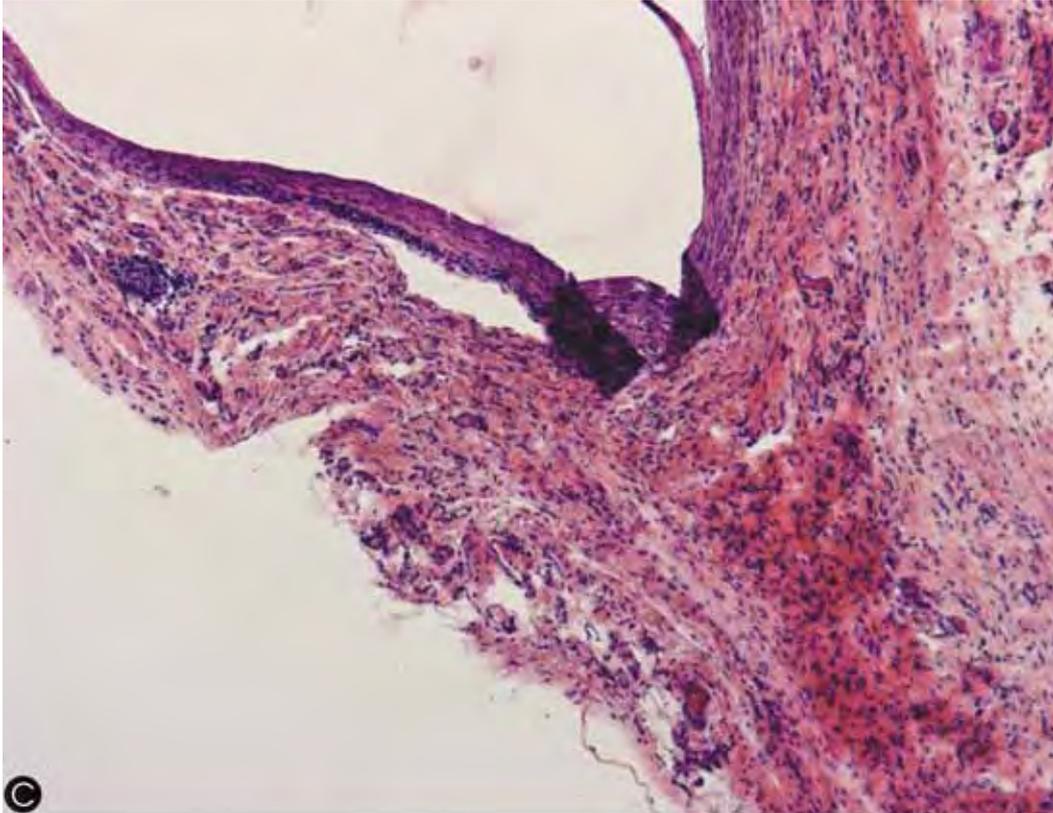
**Figura 3 – Extrato de araçá aquoso + bactérias – 7 dias**

<b>A-</b>	Cápsula espessa bastante povoada de células inflamatórias. HE. Original 10X.
<b>B-</b>	Numerosos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos e outras células mononucleadas. Presença de alguns plasmócitos. Poucos fibroblastos em meio a raras fibras colágenas com disposição complexa. Densa rede de vasos sanguíneos. HE. Original 40X.



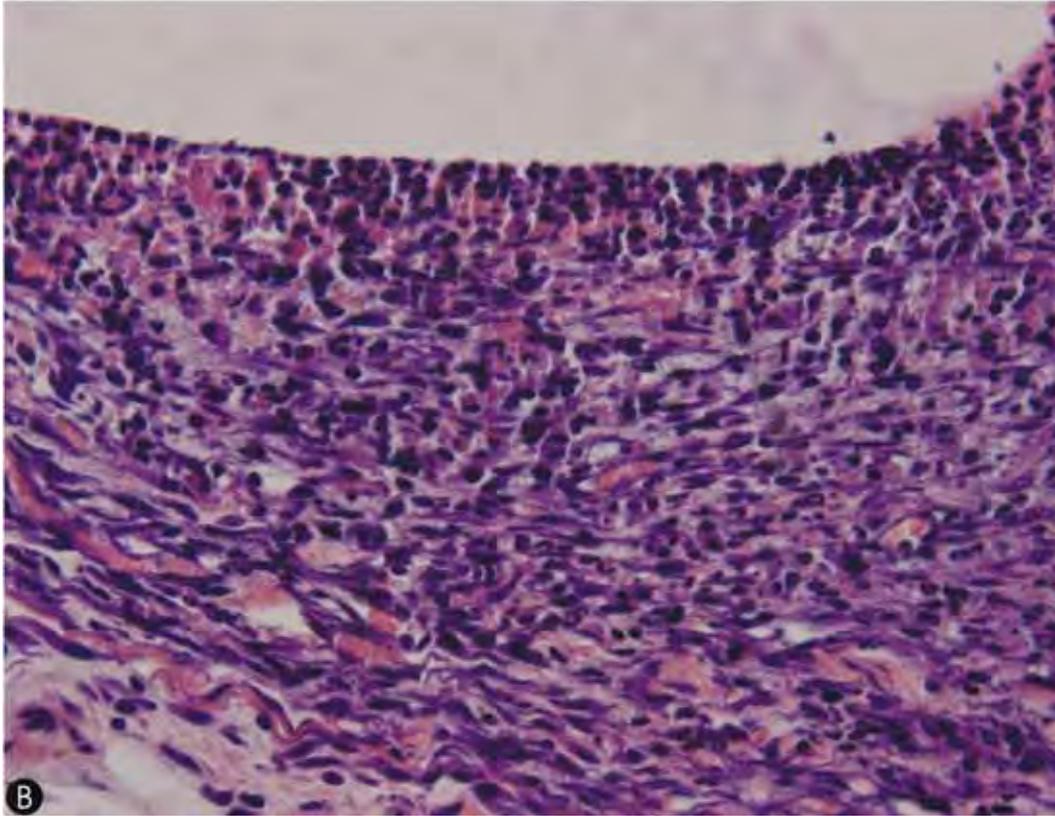
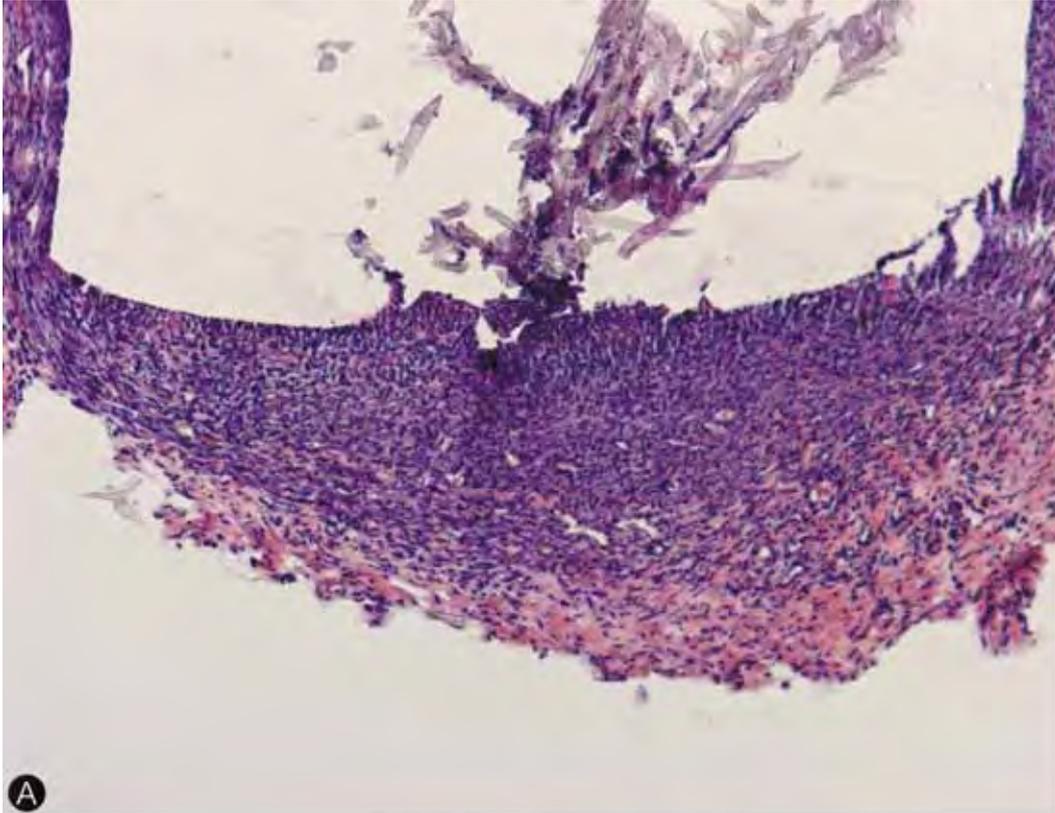
**Figura 3 – Extrato de araçá aquoso + bactérias – 30 dias**

<b>C-</b>	Delgada cápsula de fibras colágenas com menor quantidade de células inflamatórias. HE. Original 10X.
<b>D-</b>	Camada de macrófagos mais discreta, quantidade de linfócitos e outras células mononucleadas diminuída. Alguns fibrócitos e poucos fibroblastos em meio às fibras colágenas, dispostas paralelamente à área do implante. Presença de vasos sanguíneos menos numerosos. HE. Original 40X.



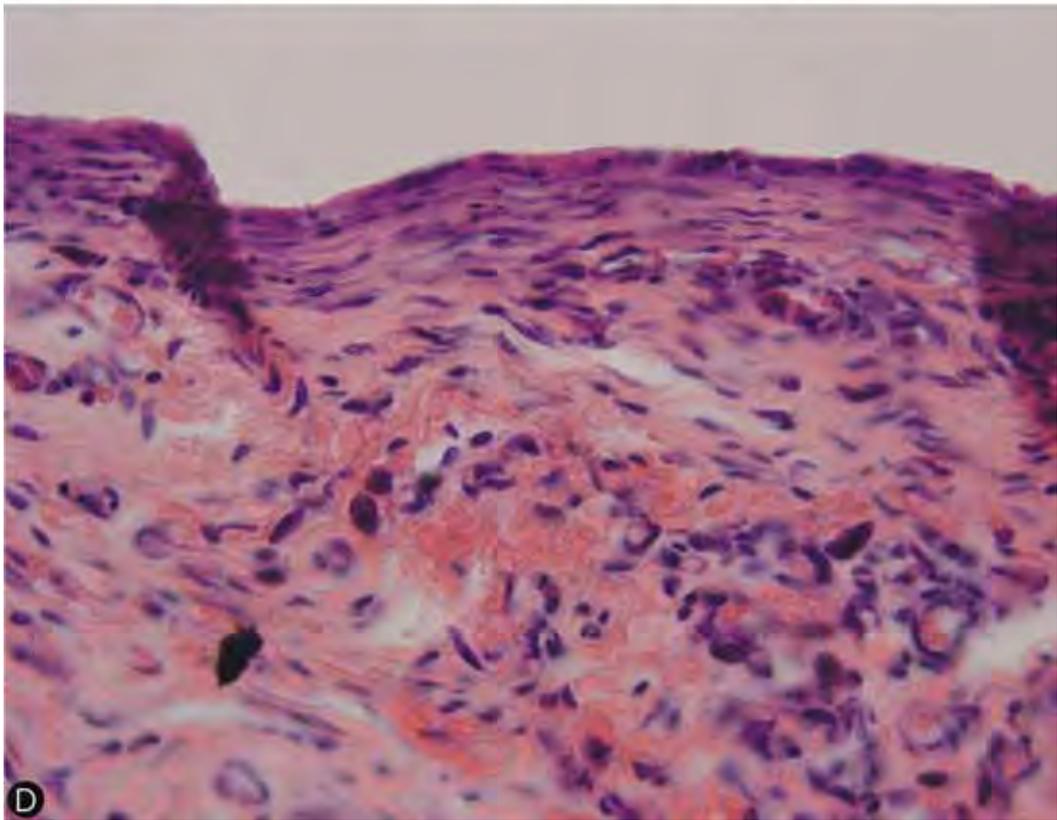
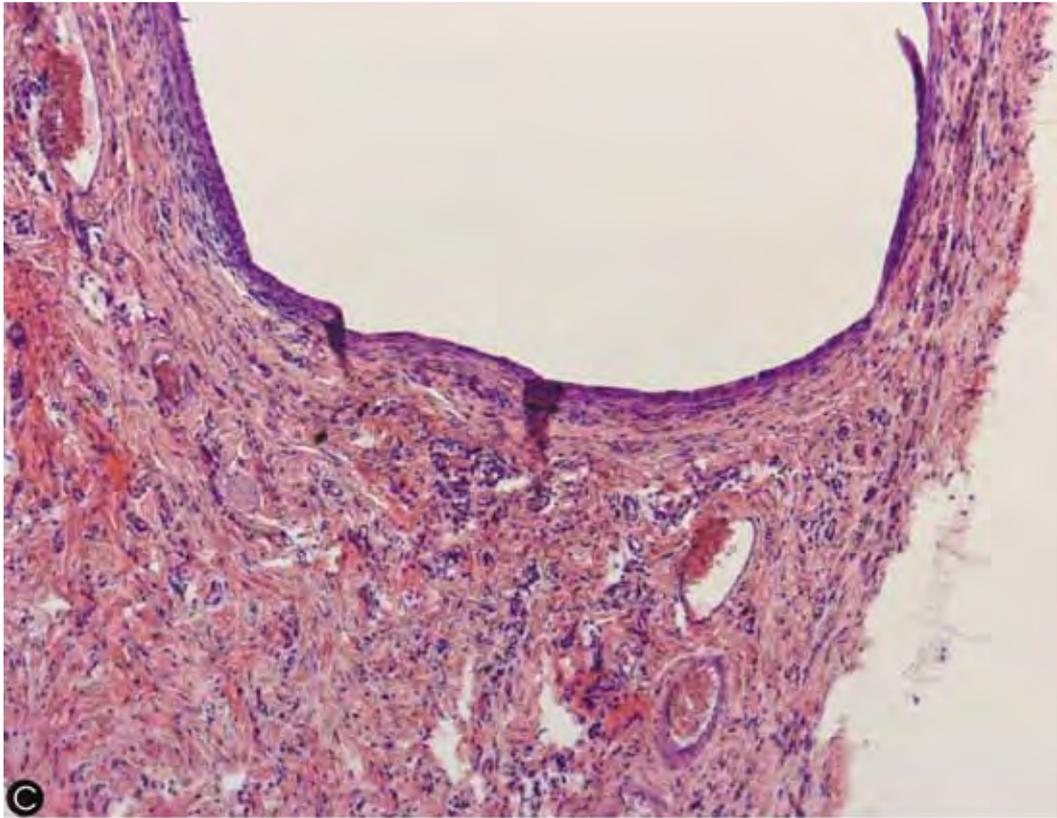
**Figura 4 – Extrato de araçá hidroalcoólico + bactérias – 7 dias**

<b>A-</b>	Cápsula pouco menos espessa bastante povoada de células inflamatórias. HE. Original 10X.
<b>B-</b>	Numerosos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos e outras células mononucleadas. Presença de alguns plasmócitos. Poucos fibroblastos em meio a raras fibras colágenas com disposição complexa. Densa rede de vasos sanguíneos. HE. Original 40X.



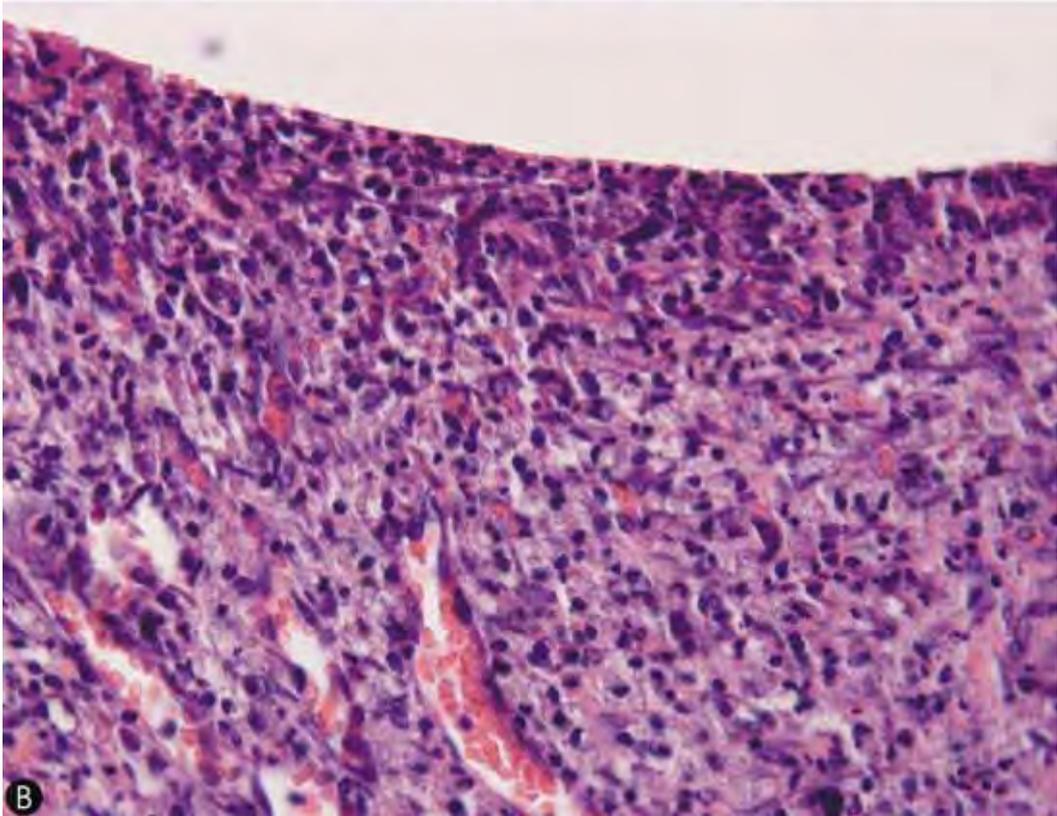
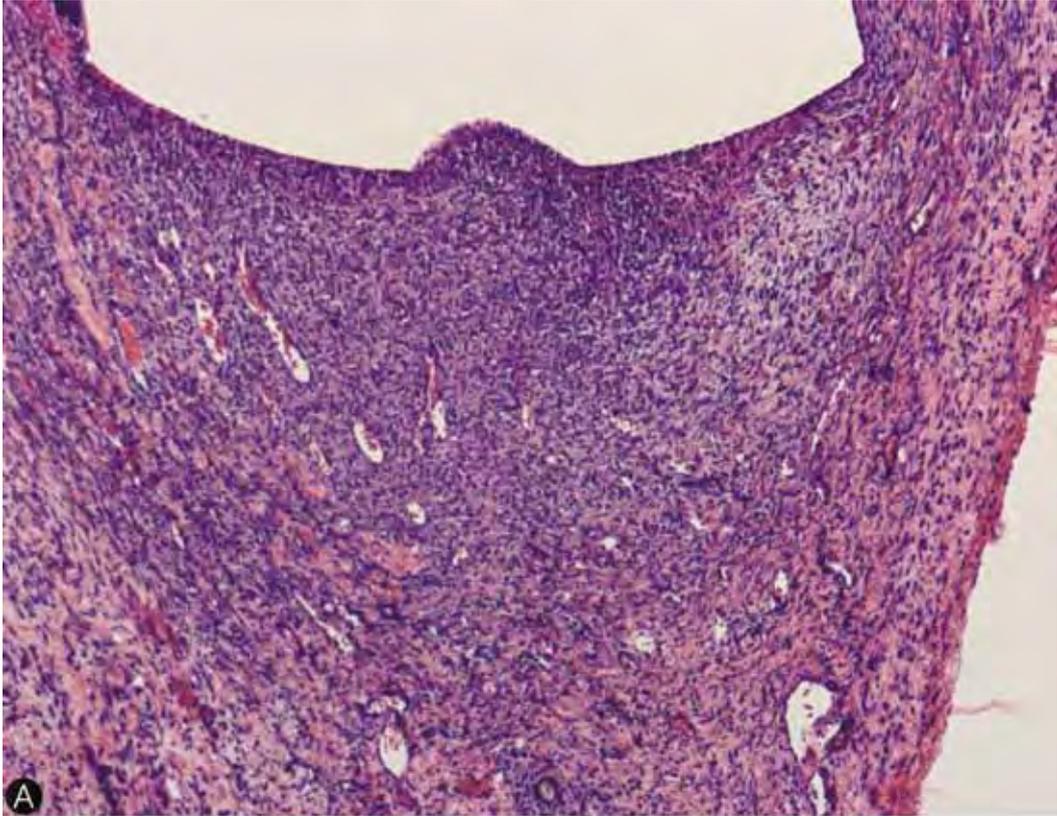
**Figura 4 – Extrato de araçá hidroalcoólico + bactérias – 30 dias**

<b>C-</b>	Cápsula fibrosa fina e condensada, com menor quantidade de células inflamatórias. HE. Original 10X.
<b>D-</b>	Camada de macrófagos acompanhando a superfície da área do implante. Fibras colágenas mais espessas e organizadas. Fibroblastos com núcleos alongados e finos dispostos paralelamente às fibras colágenas. HE. Original 40X.



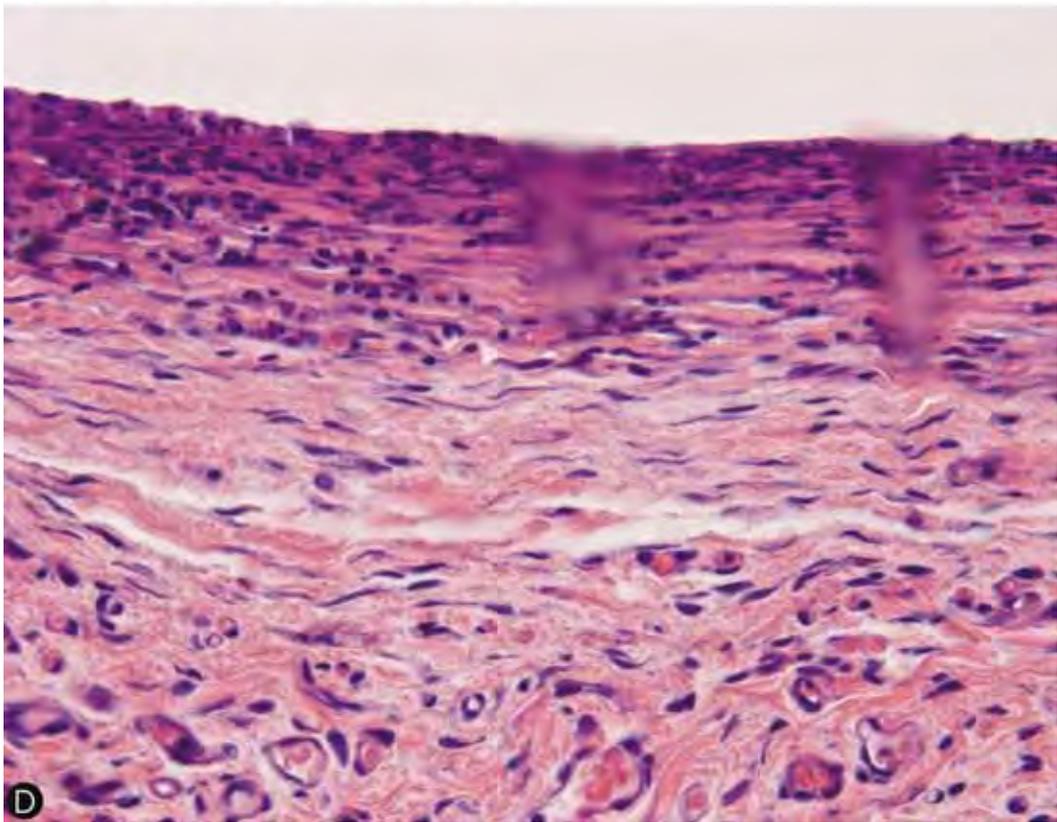
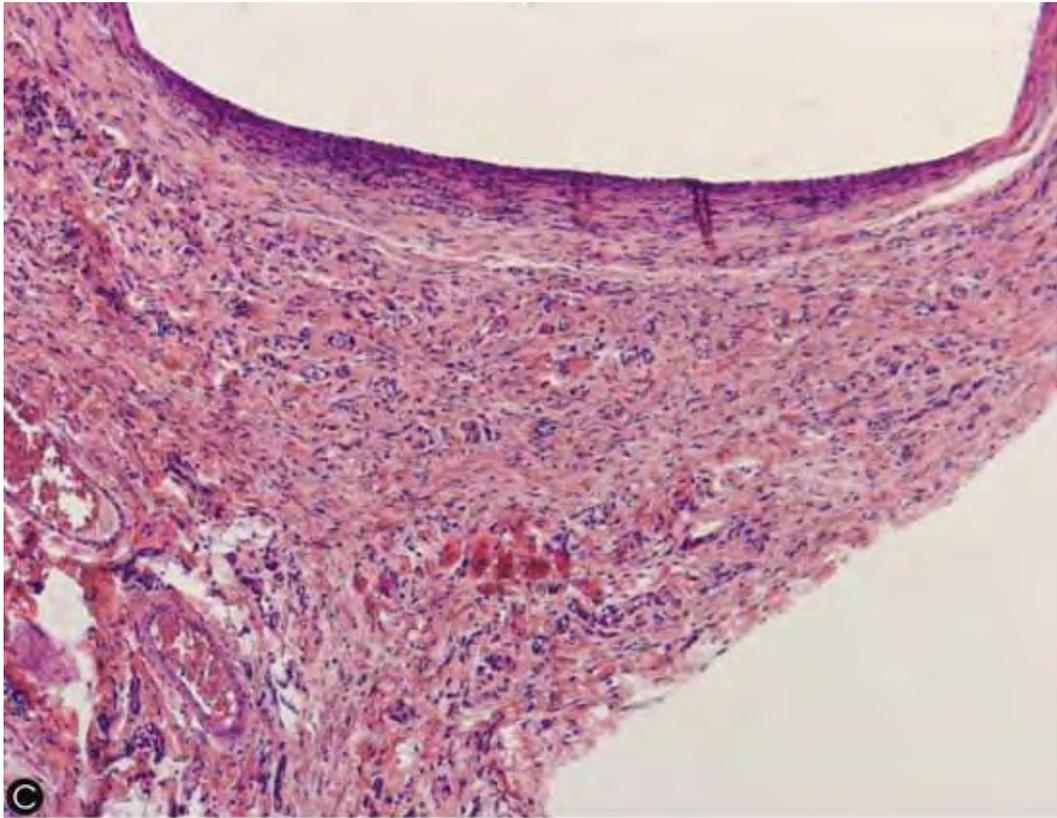
**Figura 5 – Soro Fisiológico + bactérias – 7 dias**

<b>A-</b>	Cápsula bastante espessa e povoada de células inflamatórias. HE. Original 10X.
<b>B-</b>	Numerosos macrófagos, linfócitos e outras células mononucleadas. Presença de raros fibroblastos, entremeados a poucas fibras colágenas, com disposição desorganizada e complexa. Densa rede de capilares sanguíneos. HE. Original 40X.



**Figura 5 – Soro Fisiológico + bactérias – 30 dias**

<b>C-</b>	Cápsula fibrosa fina, com poucas células inflamatórias. HE. Original 10X.
<b>D-</b>	Camada de macrófagos na superfície da área do implante, alguns linfócitos e outras poucas células inflamatórias. Fibroblastos dispostos paralelamente a área do implante entremeados por numerosas fibras colágenas espessas e organizadas. Presença de vasos de menor calibre. HE. Original 40X.



## AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA RESPOSTA TECIDUAL TARDIA AOS IMPLANTES NOS PERÍODOS EXPERIMENTAIS

A leitura dupla-cega dos resultados da análise quantitativa foi realizada por três examinadores previamente calibrados.

Os resultados das leituras em microscópio óptico, relativas a quantidade de células inflamatórias (infiltrado inflamatório) e a espessura da cápsula fibrosa estão expressos na Tabela 4.

**Tabela 4** - Marcação dos escores atribuídos aos eventos observados na análise microscópica dos grupos em função do tempo

Tempo	7 DIAS				30 DIAS					
	Infiltrado Inflamatório		Espessura da Cápsula		Infiltrado Inflamatório		Espessura da Cápsula			
<b>Aquoso</b>	2	2	3	3	3	3	3	3	3	
	3	3	-	-	3	3	-	-	3	3
<b>Hidroalcoólico</b>	2	2	2	3	3	3	0	0	3	3
	3	3	3	2	-	3	3	3	0	-
<b>Soro</b>	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3
	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-

- espécimes perdidos

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes aos achados microscópicos, na forma de escores, referentes aos quesitos histológicos analisados, que se encontram na Tabela 4, foram submetidos à análise estatística. O teste de Kruskal-Wallis é o mais adequado ao modelo em questão, quando se testa mais de dois tratamentos, e o Teste de Mann-Whitney para dois tratamentos, por se tratarem de dados não paramétricos. Para tal utilizou-se o *software* GMC 2002<sup>45</sup> (Tabelas 5 a 8).

Quando analisada a influência dos dois períodos estudados, 7 e 30 dias, independente dos grupos empregados, houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ), onde o período de 30 dias apresentou reparo superior ao de 7 dias (Tabela 5). O Gráfico 4 ilustra o resultado dessa comparação.

**Tabela 5** - Teste U de Mann-Whitney para os períodos avaliados

<b>Valores de U:</b>	
U (1): 7 DIAS	1940
<b>U (2) 30 DIAS</b>	
Valor calculado de z:	6,9096
Probabilidade de igualdade:	0,00%
Significante ao nível de 0,00% ( $p < 0,001$ )	

Quando se comparou os grupos, sem considerar o tempo pós-operatório, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6). O Gráfico 5 ilustra o resultado dessa comparação.

**Tabela 6** - Teste de Kruskal-Wallis para os grupos analisados

Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado:	1,5966
Valor do $\chi^2$ para 2 graus de liberdade:	1,6000
Probabilidade de $H_0$ para esse valor:	45,01%
Não Significante ( $p > 0,05$ )	

Em relação à comparação entre os três grupos em função dos dois períodos experimentais, verificou-se haver diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001\%$ ). Para se verificar onde estava essa diferença foi realizada a comparação 2 a 2.

**Tabela 7** - Teste de Kruskal-Wallis para comparar todos os grupos analisados

Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado:	48,3874
Valor do $\chi^2$ para 5 graus de liberdade:	48,3900
Probabilidade de H0 para esse valor:	00,000%
Significante ao nível < 0,001% (p=0,00)	

Comparação entre as médias dos postos das amostras							
Amostras comparadas (duas a duas)		Diferenças entre médias	Valores críticos (p)			Significância	
			0,050	0,010	0,001		
Aquoso 7	x	Aquoso 30	41,4464	13,0273	17,2798	22,3887	0,1%
Aquoso 7	x	Hidroalcoólico 7	44,7714	12,4045	16,6310	21,5481	5,0%
Aquoso 7	x	Hidroalcoólico 30	44,7714	12,4045	16,4537	21,3183	0,1%
Aquoso 7	x	Soro 7	00,5714	14,0039	18,5752	24,0671	ns
Aquoso 7	x	Soro 30	47,1071	13,4545	17,8465	23,7582	0,1%
Aquoso 30	x	Hidroalcoólico 7	28,3487	12,0786	06,0214	20,7582	0,1%
Aquoso 30	x	Hidroalcoólico 30	03,3250	11,9397	15,8372	20,5196	ns
Aquoso 30	x	Soro 7	40,8750	13,5940	18,0315	23,3626	0,1%
Aquoso 30	x	Soro 30	05,6607	13,0273	17,2798	22,3887	ns
Hidroalcoólico 7	x	Hidroalcoólico 30	31,6737	11,4040	15,1267	19,5989	0,1%
Hidroalcoólico 7	x	Soro 7	<b>12,5363</b>	13,1260	17,4107	22,5582	ns
Hidroalcoólico 7	x	Soro 30	34,0094	12,5382	16,6310	21,5481	0,1%
Hidroalcoólico 30	x	Soro 7	44,2000	12,9983	17,2414	22,3389	0,1%
Hidroalcoólico 30	x	Soro 30	02,3357	12,4045	16,4537	21,3183	ns
Soro 7	x	Soro 30	46,5357	14,0039	18,5752	24,0671	0,1%

Com relação à comparação entre o mesmo grupo nos diferentes períodos, foi constatada diferença significativa para os três grupos ( $p < 0,01\%$ ), favorável ao período de 30 dias.

Verificou-se diferença significativa entre o hidroalcoólico 7 dias quando comparado ao aquoso no mesmo período, favorável ao primeiro. Havendo também uma tendência do hidroalcoólico apresentar resultado superior ao soro (diferença entre postos médios de 12,5363 e valor crítico 13,1260 para ns 5%).

As demais comparações não apresentaram significância estatística. Dados apresentados na comparação 2 a 2 da Tabela 7.

Os resultados das comparações podem ser ordenados do melhor para o pior, como descrito na Tabela 8, e melhor visualizados no Gráfico 6.

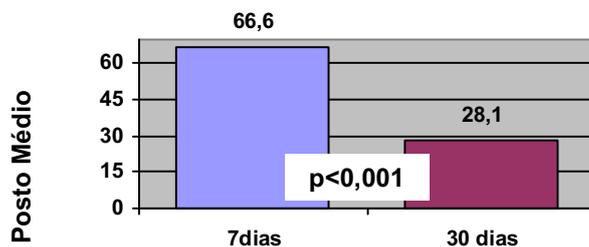
**Tabela 8** - Médias dos postos das amostras ordenadas do melhor para o pior resultado

<b>Amostra</b>	<b>Soma de postos</b>	<b>Média</b>
Soro – 30 dias	336	24.0
Hidroalcoólico – 30 dias	526	26.3
Aquoso – 30 dias	474	29.6
Hidroalcoólico – 7 dias	1102	58.0
Soro – 7 dias	846	70.5
Aquoso – 7 dias	995	71.1

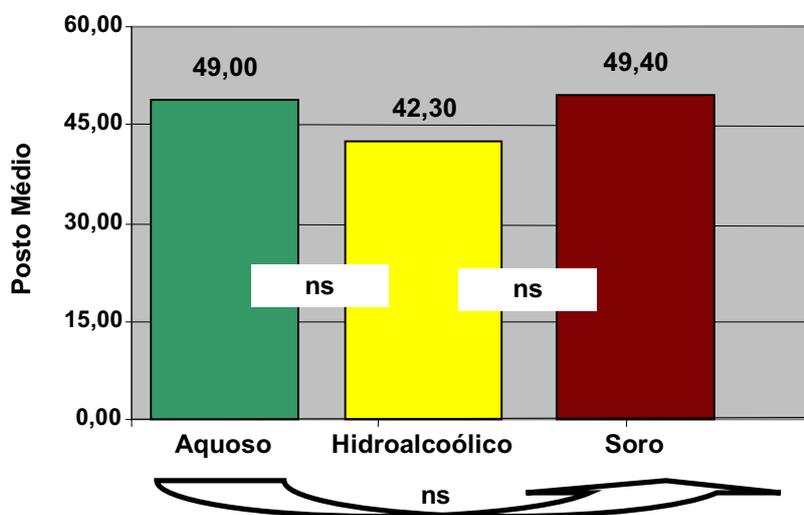
Desta forma, verifica-se que o aquoso, no período de 7 dias, juntamente com o soro 7 dias apresentaram os piores resultados, seguido do hidroalcoólico neste mesmo período.

O soro 30 dias apresentou os melhores resultados, juntamente com o hidroalcoólico 30 dias.

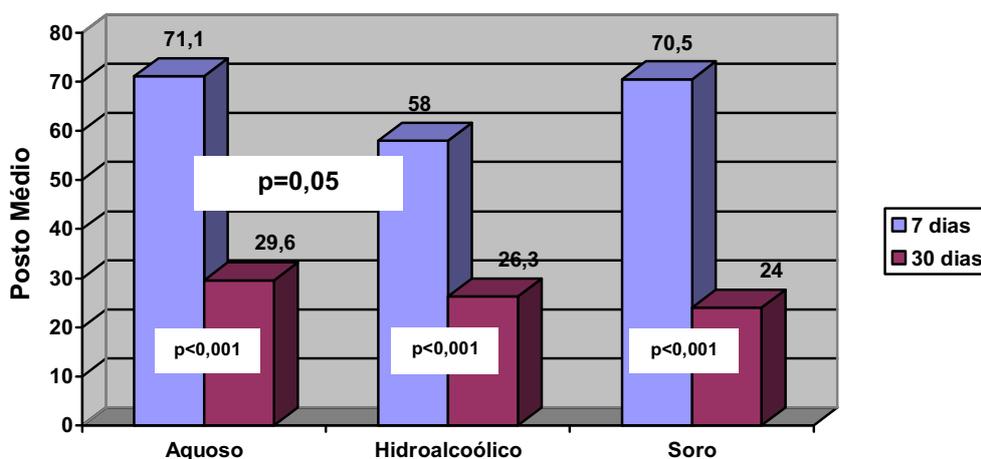
Os demais grupos apresentaram resultados intermediários.



**GRÁFICO 4** – Representação gráfica da influência dos tempos pós-operatório nos resultados obtidos independentemente do grupo implantado



**GRÁFICO 5** – Representação gráfica da influência dos grupos analisados nos resultados obtidos, independentemente do tempo pós-operatório



**GRÁFICO 6** - Representação gráfica dos postos médios atribuídos aos grupos experimentais em função dos tempos operatórios. Nota-se significância de 5% entre hidroalcoólico e aquoso no período de 7 dias

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 DA CONCEPÇÃO

O Brasil é considerado, segundo a literatura, o país de maior biodiversidade vegetal do planeta, existindo entre 55 e 80 mil espécies vegetais<sup>24</sup>, sendo muitas com potencial para obtenção de novas drogas<sup>18</sup>.

Apesar do grande incentivo para o estudo interdisciplinar das plantas medicinais com reconhecida ação terapêutica e do grande avanço científico observado com os estudos das mesmas, devido a imensa riqueza vegetal existente, ainda considera-se um número reduzido de descobertas das possíveis propriedades existentes nos vegetais do nosso país<sup>24,46</sup>.

Embora se reconheça que, em se tratando de estudos de plantas medicinais, a chance de acerto é de uma para cada cinco mil tentativas<sup>24</sup>, há de se considerar, que 74% dos compostos químicos são de origem popular<sup>47</sup>. Desta forma, é importante evidenciar que da maioria dos produtos naturais com reconhecida ação na medicina popular, podem vir a se extrair compostos químicos, que poderão fazer parte da composição de novos medicamentos.

Nas últimas décadas, muito interesse tem sido dispensado ao estudo do efeito de compostos naturais, disponíveis ou não na dieta, sobre infecções endógenas humanas<sup>48,49</sup>, particularmente sobre o biofilme bucal e seus impactos na ecologia microbiana<sup>50,51</sup>. Dentre os extratos naturais que tiveram sua atividade inibitória estudada, destacam-se o chá-verde japonês<sup>52</sup>, própolis<sup>48</sup>, café<sup>53</sup>, goiaba<sup>54,55</sup>, além de mate e chá preto<sup>52</sup>.

No presente estudo optou-se por estudar extratos de araçá em função dos resultados favoráveis obtidos em estudos *in vitro*<sup>26,28,30</sup>, evidenciando a capacidade desse extrato em reduzir significativamente a colonização de superfícies de vidro, bem como apresentar notável atividade inibitória sobre cocos cariogênicos, e outros microrganismos importantes na formação do biofilme, além de sua biocompatibilidade comprovada por meio de estudo *in vivo*<sup>31</sup>.

De acordo com Volpato et al.<sup>19</sup>, mesmo após a escolha da planta medicinal a ser coletada, deve-se observar que o vegetal oferece algumas dificuldades na uniformidade e estabilidade do produto a ser utilizado. Assim, segundo os autores, exemplares de uma mesma espécie, colhidos em épocas diferentes, não possuem necessariamente a mesma atividade biológica, tornando-se difícil seu controle químico, em virtude do grande número de substâncias presentes. Portanto, no presente estudo foram retiradas folhas de um único exemplar e a coleta

foi realizada de uma única vez, sendo a quantidade suficiente para a produção dos extratos utilizados nos dois testes.

A área escolhida para a coleta das folhas é representativa dos principais tipos de vegetação de cerrado, sendo que se optou pela inclusão de áreas não submetidas a agressões humanas. As folhas de araçá utilizadas para o preparo dos extratos do presente estudo foram as mesmas utilizadas nos estudos anteriores que evidenciaram reconhecida ação antimicrobiana sobre bactérias bucais<sup>26,28,30</sup> e a reconhecida biocompatibilidade<sup>31</sup>, evitando assim, qualquer interferência na atividade biológica.

A contribuição dos moradores locais no manejo e obtenção das folhas foi essencial, uma vez que os mesmos apresentam habilidade em localizar, identificar, extrair e manipular os recursos locais utilizados na elaboração de remédios caseiros há gerações.

Com relação a microbiota utilizada neste estudo, foram selecionados microrganismos freqüentemente isolados de infecções endodônticas refratárias e/ou agudas.

Tem sido demonstrado que associações experimentais de anaeróbios e facultativos, assim como associações de vários facultativos são capazes de induzir inflamação<sup>2,56</sup>.

Em doenças periapicais, entre os microrganismos anaeróbios, têm-se evidenciado a presença e o papel de um grupo de bactérias, denominado de "produtores de pigmento negro", as quais incluem os gêneros *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. intermedia*<sup>5,56</sup>. Esses microrganismos foram selecionados para este estudo por apresentarem Lipopolissacáride (LPS), cápsula, produzir enzimas histolíticas e por ser comprovado que seus antígenos induzem à resposta inflamatória<sup>57</sup>.

Com relação ao *F. nucleatum*, a escolha deste se justifica por este microrganismo possuir um LPS potente, capaz de induzir reação inflamatória cutânea em ratos<sup>58</sup>, produzir hemólise<sup>59</sup>, ativar o sistema complemento<sup>60</sup> ou induzir a migração de leucócitos<sup>58</sup>. Assim, é reconhecido que o LPS deste microrganismo pode ter um importante papel na agressão e/ou destruição tecidual.

Bactérias Gram-positivas como *Peptostreptococcus* e *Eubacterium* spp possuem ácidos lipoteicóicos, os quais podem influenciar reações inflamatórias e aumentar a patogenicidade dos "bacteróides de pigmento negro", estando também relacionados com os sintomas agudos e com a destruição dos tecidos apicais<sup>61,62</sup>. O ácido lipoteicóico, presente nas bactérias Gram-positivas, auxilia na ligação das bactérias às células eucarióticas, incluindo

linfócitos<sup>63,64</sup>, estimula reabsorção óssea, além de estimular diversas células polimorfonucleares a liberarem mediadores inflamatórios, contribuindo para o dano tecidual<sup>65</sup>.

*P. micros* foi selecionado por ser, entre os Gram-positivos, os microrganismos mais prevalentes nos dentes com necrose pulpar e lesão periapical<sup>5,66,67,68</sup>.

*E. faecalis*, foi selecionado por ser freqüentemente isolado de dentes com necrose pulpar sem lesão periapical em torno de 81,5% dos casos<sup>69</sup>, por ser considerado um microrganismo bastante resistente a agentes químicos utilizados como soluções irrigadoras e curativos de demora, e por ser muito prevalente em canais radiculares com infecções persistentes ou recorrentes<sup>69,70</sup>. Além disso, *Enterococcus* orais produzem fatores de virulência relevantes para a patogênese de periodontites, como elastases, proteases e hemolisinas<sup>71</sup> além de várias cepas produzirem betalactamases, causando infecções de difícil tratamento<sup>72</sup>.

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem causar destruição tecidual diretamente ou estimular células do hospedeiro a ativar respostas inflamatórias. Essas respostas, embora tendam a eliminar o desafio microbiano, freqüentemente acabam por provocar danos teciduais<sup>73</sup>.

Endotoxina de bactérias vivas ou mortas, íntegras ou em fragmentos, atuando sobre macrófagos<sup>74</sup>, neutrófilos<sup>75</sup> e fibroblastos<sup>76</sup>, desencadeia a liberação de um grande número de mediadores químicos inflamatórios bioativos ou citocinas, como o TNF<sup>77</sup>, a Interleucina-1<sup>77,78</sup>, a Interleucina-6<sup>78</sup>, a Interleucina-8<sup>78</sup>, o Interferon-alfa<sup>77</sup> e Prostaglandinas<sup>79</sup>. Além disso, o LPS é citotóxico<sup>80</sup> e atua como potente indutor da produção de óxido nítrico<sup>81</sup>, ativa o ciclo do metabolismo do ácido aracdônico e promove ativação do sistema complemento<sup>77,80</sup>. Todos esses eventos conduzem ao início e a perpetuação de uma reação inflamatória.

Assim, não só o lipopolissacáride (LPS), mas também peptideoglicanos, ácido lipoteicóico, fímbrias, proteases e toxinas são provavelmente os componentes bacterianos que estão associados à capacidade de exercer efeito deletério para o hospedeiro<sup>73</sup>. Em se tratando de ratos, vários estudos têm demonstrado que fatores de virulência presentes em bactérias vivas ou mortas são capazes de promover resposta inflamatória nestes animais<sup>82,83,84,85</sup>.

Tubos de polietileno contendo microrganismos vivos, implantados no tecido conjuntivo de ratos foram utilizados para avaliar a resposta tecidual<sup>56,86</sup>. Wu et al.<sup>56</sup>, utilizando esta metodologia, observaram que algumas espécies anaeróbias perderam sua viabilidade no interior do tecido conjuntivo de ratos, mesmo antes do primeiro período experimental, que foi

de 14 dias, mostrando que esses poderiam ter perdido sua viabilidade por períodos que, embora desconhecidos, tão curtos quanto 1, 2 dias ou mesmo horas após sua implantação.

Desta forma, por desconhecermos o tempo de viabilidade dos microrganismos embebidos nos extratos aquoso e hidroalcoólico no interior do subcutâneo de ratos, optamos pela utilização de microrganismos inativados, evitando a consequente obtenção de resultados falso-positivos. Também, o fato de termos como objetivo a avaliação da possível influência exercida pelos extratos sobre os produtos e subprodutos tóxicos dos microrganismos, nos leva a necessidade de padronização de uma das variáveis, neste caso, os microrganismos. Assim, se inoculássemos os microrganismos vivos, provavelmente o facultativo se manteria viável por mais tempo quando comparado aos anaeróbios, podendo ser atribuído, erroneamente, a resposta obtida generalizando para todos os microrganismos, onde, na realidade, deveria ser atribuída apenas ao microrganismo facultativo.

A inoculação de microrganismos inativados minimiza a ocorrência de uma inflamação intensa capaz de promover grande destruição tecidual ou morte do animal. Padronizar a variável microrganismo, possibilitou a avaliação da possível influência desses extratos apenas sobre os componentes bacterianos presentes nas paredes celulares das bactérias envolvidas e a possível interação com os diferentes fatores de virulência.

## 5.2 DA METODOLOGIA

### DA ANÁLISE EDEMOGÊNICA

A fase inicial da inflamação caracteriza-se por vasodilatação, aumento de permeabilidade e transmigração celular. Nos tecidos saudáveis a barreira tissular do sangue é livremente permeável à água, eletrólitos e pequenas moléculas, porém, pouco permeável a proteínas. Devido ao aumento de permeabilidade, observa-se a passagem de plasma do interior dos vasos para a matriz extracelular, caracterizando o exsudato ou edema inflamatório. Corantes vitais como o azul de Evans a 1%, quando administrados intravenosamente têm capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, formando um complexo corante-proteína, o qual funciona como um marcador de plasma. Assim, a presença desse corante nos locais edemaciados, possibilita a detecção da infiltração de proteínas dentro da área de edema<sup>87</sup>, permitindo estimar a intensidade da agressão<sup>35,88</sup>.

Segundo Rutberg et al.<sup>88</sup>, o mecanismo de implantação subcutânea para a análise microscópica pode acarretar em inflamação devido ao trauma cirúrgico gerado. Por isso, a análise edemogênica seria uma maneira mais segura de se testar a biocompatibilidade nos períodos iniciais.

Para a Análise Edemogênica, foram tomados os cuidados necessários para evitar fatores de interferência que pudessem influenciar na resposta inflamatória inicial. A injeção do corante foi realizada sob anestesia geral, para se evitar movimentos bruscos e inesperados do animal, e a inoculação dos extratos no dorso do animal foi realizada após 30 minutos da injeção do corante, tempo suficiente para a circulação do mesmo em todo organismo. A tricotomia manual foi realizada apenas após a morte dos animais, evitando possíveis alterações no teste, uma vez que, a inflamação decorrente da tricotomia poderia interferir nos resultados.

Com relação aos procedimentos laboratoriais, o espectrofotômetro foi calibrado imediatamente antes da leitura, sendo todos os grupos submetidos a leitura no mesmo momento.

## **DA ANÁLISE MICROSCÓPICA**

O método de implantação subcutânea utilizado neste estudo possui várias das qualidades desejáveis de um teste secundário para avaliação biológica de materiais<sup>89,90,91</sup>. Costa<sup>92</sup>, em 2001, descreve dentre as muitas vantagens do método, a facilidade na execução e na manutenção dos animais, possibilitando uma amostra maior com vários animais em curto período de tempo, a rapidez no processamento laboratorial, uma vez que não necessita da fase de desmineralização quando não envolve tecido calcificado e o baixo custo para o desenvolvimento da metodologia.

De acordo com Olsson et al.<sup>91</sup>, o implante em tecido subcutâneo de ratos tem sido largamente utilizado e aceito. Esta avaliação tem sido realizada de diferentes maneiras, como diretamente no tecido<sup>93,94</sup> em esponjas cirúrgicas<sup>95</sup>, por meio de tubos de dentina humana<sup>38,40,96</sup>, tubos de teflon<sup>82,91</sup> ou utilizando tubos de polietileno<sup>31,56,96</sup>. Optamos pela implantação de tubos de polietileno, baseados em dados da literatura que demonstram a biocompatibilidade desse material<sup>38,40,42,91,96,97</sup>.

Entre as vantagens oferecidas por esse método, destaca-se a facilidade de se estabelecer a quantidade do material a ser pesquisado<sup>98</sup>, a possibilidade de evitar traumas mecânicos, quando utilizados como matriz, diferindo do trauma exercido por material

implantado diretamente no tecido, além de propiciar padronização da interface material-tecido<sup>42,91</sup>.

Tubos de polietileno foram utilizados por Makkes et al.<sup>99</sup>, que concluíram que sua manipulação e implantação são fáceis, salientando também o fato de, por não apresentarem reação aos tecidos circundantes e por serem estáveis, não influenciam os materiais acondicionados em seu interior. Soma-se a essas vantagens, o fato de possuir uma certa flexibilidade, permitindo melhor ajuste ao corpo do animal, sendo mais confortável à sua movimentação, tornando-se, desta forma, um teste indicado para avaliar a resposta tecidual quando implantado em subcutâneo de ratos.

O pequeno diâmetro do tubo foi selecionado para, aliado a presença de um cone de papel, minimizar o escoamento das soluções do interior do tubo e ao mesmo tempo, suficientemente largo para permitir o preenchimento do tubo com uma agulha hipodérmica.

Vale ressaltar que, os autores que utilizaram esta metodologia avaliaram materiais na forma de cimentos, pastas ou materiais que se tornavam sólidos após reação de presa. Entretanto, a substância a ser testada neste estudo se encontrava sob a forma de líquido, dificultando sua manutenção no interior do tubo. Desta forma, um cone de papel foi introduzido no interior do tubo de polietileno, como salientado, a fim de impedir o escoamento das soluções, tendo o cuidado de mantê-lo aquém do comprimento total do tubo, evitando contato direto com o tecido. A possibilidade de se utilizar um veículo gel foi descartada para se evitar qualquer interferência química nos princípios ativos dos extratos vegetais devido à ausência de estudos prévios como parâmetros, tratando-se de um material novo neste tipo de pesquisa *in vivo*. Metodologia semelhante foi empregada por Pullin e Carvalho<sup>100</sup>.

Quanto aos períodos experimentais de avaliação a ADA (1972 e 1982) sugere períodos experimentais que podem variar entre 7-10, 21-35 e 60-80 dias. No entanto, não existe na literatura um consenso entre os autores quanto aos períodos de avaliação. Assim, observa-se períodos que variam de 7 a 180 dias<sup>36,91,101,102</sup>.

Vale ressaltar a observação feita por Moretton et al.<sup>103</sup>, que um mês de vida do rato equivale a aproximadamente 30 meses para o humano, portanto, se considerarmos um período de vida de três anos para o rato, comparando com o período de vida do humano equivale a 90 anos.

Baseados nos trabalhos de Holland et al.<sup>38,39,40</sup>, optamos pelos períodos de 7 e 30 dias, considerando que trabalhos similares obtiveram resultados semelhantes quando

comparado períodos mais longos que 30 dias, indicando que a resposta tecidual após esse período permanece praticamente inalterada.

Com relação ao processamento das peças, um problema encontrado foi a dureza do tubo contendo o cone de papel, o qual interferiu com o seccionamento do tecido, resultando na exclusão de vários espécimes.

Com a finalidade de superar esta dificuldade, alguns autores realizaram a remoção prévia do tubo de polietileno anteriormente a microtomia<sup>104,105</sup>, porém durante um estudo piloto, foi observado, com a tentativa desta remoção, um considerável deslocamento do tecido aderido a extremidade do tubo, criando muitas vezes distorções e artefatos, prejudicando assim a leitura das lâminas. Portanto, apesar das dificuldades, o tubo de polietileno contendo o cone de papel foi cortado juntamente ao tecido conjuntivo adjacente, utilizando uma lâmina especial de tungstênio (Leica).

## 5.3 DOS RESULTADOS

### DA ANÁLISE EDEMOGÊNICA

Udaka et al.<sup>106</sup>, afirmam que a avaliação dos resultados experimentais em testes edemogênicos apresentam dificuldades na precisão dos dados, podendo-se verificar uma variedade muito grande de respostas aos corantes relacionadas ao preparo do material e a dose/resposta de cada animal. Pôde-se constatar essa variedade de resposta neste trabalho, conforme os dados da Tabela 2, ainda que se tenha realizado a padronização dos procedimentos técnicos e a utilização de animais em condições semelhantes, não se pode evitar a variação dos resultados entre os vários espécimes.

O edema apresentou-se semelhante nos dois períodos de tempo avaliados independente do grupo estudado, embora, no período de 6 horas tenha ocorrido um ligeiro aumento na sua quantidade, estatisticamente não significativa. Esse resultado quando confrontado diretamente com o estudo de Novais<sup>31</sup> que avaliou esses mesmos grupos, porém sem a adição de microrganismos, obtendo resultados semelhantes, nos leva a concluir que a presença dos microrganismos inativados possivelmente não tenha interferido com o padrão de resposta inflamatória inicial.

Porém, por tratar-se de produtos e subprodutos bacterianos de microrganismos inativados, não é conhecido quanto tempo esses levariam para provocar uma resposta

inflamatória, assim, concordamos com Novais<sup>31</sup> quando afirma que para se avaliar a evolução das respostas biológicas iniciais pode-se, em estudos futuros, planejar intervalos de tempo maiores.

Quando se avaliou o resultado geral dos grupos (Gráfico 2), embora não estatisticamente significativa, o soro apresentou-se ligeiramente melhor, causando menor edema, seguido do aquoso e do hidroalcoólico que apresentou o maior edema inicial. Pode-se verificar que a presença dos microrganismos inativados não alterou de forma drástica o edema proporcionado pelos mesmos materiais puros, esta afirmativa encontra respaldo ao compararmos o resultado obtido com o trabalho de Novais<sup>31</sup>, o qual obteve o mesmo padrão de resposta. O resultado geral do hidroalcoólico ficou elevado devido aos valores de edema observados no período de 3 horas em que acreditamos que sua reação tenha sido intensificada devido à presença do etanol.

Tanto o grupo soro quanto o aquoso apresentaram ligeiro aumento do edema no decorrer do tempo, enquanto o hidroalcoólico apresentou decréscimo. Este fato pode ser explicado, provavelmente, devido ao efeito irritante do etanol no período inicial, e sua metabolização pelo organismo no período de 6 horas (Gráfico 3). Portanto, em trabalhos posteriores, pode-se pensar na eliminação do etanol antes da sua utilização, uma vez que o mesmo se comportou bem como agente extrator dos princípios ativos, porém pode ter mascarado ou interferido no efeito exercido pelos componentes ativos do extrato.

## **DA ANÁLISE MICROSCÓPICA**

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a resposta tecidual tardia, em todos os grupos avaliados, apresentou progresso do reparo em função do tempo, como era esperado (Gráfico 4). Desta forma, considerando a intensidade, observa-se uma resposta tecidual no período inicial (7 dias) extremamente severa quando comparada diretamente com os resultados obtidos de Novais<sup>31</sup>, quando da ausência dos microrganismos inativados. Desta forma, verificamos que os microrganismos inativados exerceram ação inflamatória no período inicial, sendo seus fatores de virulência e componentes bacterianos presentes nas paredes e/ou cápsula das bactérias, debelados pela resposta inflamatória do organismo. Assim, é possível afirmarmos somente que nem os implantes nem a presença dos microrganismos inativados impediram a progressão natural do reparo, porém não se pode atribuir esta evolução benéfica à possível ação exercida pelos extratos, uma vez que o soro também exibiu esta progressão.

Os escores gerais dos diferentes grupos, quando avaliados desconsiderando a variável tempo, permitiram concluir que nenhum grupo apresentou resposta estatisticamente superior (Gráfico 5), o que difere dos resultados de Novais<sup>31</sup> que encontrou melhor resposta para os extratos aquoso e hidroalcoólico, reagindo melhor que o próprio grupo controle, levando à sugestão, segundo a autora, de prováveis efeitos benéficos ao controle da inflamação.

No período de 7 dias, observaram-se respostas inflamatórias severas, devido, provavelmente, a presença dos microrganismos inativados e suas possíveis ações sobre o hospedeiro. Esta afirmativa encontra respaldo quando comparamos diretamente os resultados obtidos por Novais<sup>31</sup> que também salienta a existência de uma inflamação, porém em menor grau que o observado neste estudo, considerado como moderada por esta autora. Soma-se a isso, as justificativas encontradas na literatura que evidenciam a ocorrência de respostas inflamatórias detectadas no método, decorrentes do trauma cirúrgico<sup>42,91,99</sup> porém bastante diferentes do resultado obtido com microrganismos.

Quando comparado os grupos entre si no período de 7 dias, o hidroalcoólico apresentou resultados superiores ao aquoso, havendo também uma tendência de apresentar melhor resultado que o soro, porém não estatisticamente significativa, o que nos permite aventar a possibilidade de que o extrato hidroalcoólico tenha, possivelmente, exercido ação benéfica sobre os fatores de virulência existentes nos microrganismos inativados avaliados, assim como sobre os componentes bacterianos existentes na cápsula e parede bacteriana destes. Entretanto, estatisticamente este fato não pode ser afirmado.

No período de 30 dias, houve um controle do processo inflamatório em todos os grupos avaliados, com resultados bastante semelhantes entre si (Gráfico 6). Assim, avaliando os três grupos neste período, embora observa-se níveis de inflamação bastante reduzidos, quando comparados ao período inicial, estes encontravam-se ainda em processo de reparo.

No entanto, segundo Torneck<sup>97</sup> após duas semanas da implantação, os tubos de polietileno, quando implantados vazios, iniciam o reparo de alguns sinais da inflamação que induziram, e depois de três semanas a inflamação praticamente desaparece, assim, pode-se desconfiar da intensidade aumentada quando comparado com o estudo de Novais<sup>31</sup>, devido a presença dos microrganismos inativados e sua destruição tecidual potencialmente severa.

Desta forma, pode-se verificar que os extratos testados não interferiram na resposta biológica, possibilitando a evolução normal do processo de reparo e, embora

estatisticamente não seja possível afirmar que os extratos tenham apresentado a propriedade de inativar os efeitos tóxicos provocados pelos componentes bacterianos nas condições utilizadas neste trabalho, o extrato hidroalcoólico provavelmente exerceu ações benéficas sobre os componentes bacterianos, uma vez que sua resposta no período de 7 dias apresentou-se diferenciada dos outros grupos, significando que, possivelmente, algum componente extraído pelo etanol apresenta ação de inativação de alguns dos compostos tóxicos presentes nos microrganismos inativados.

De acordo com os resultados, os extratos de arará (*Psidium cattleianum*) merecem mais atenção para sua utilização em futuros projetos de pesquisa, uma vez que se trata de uma planta praticamente inédita em estudos na área odontológica, com grande potencial antimicrobiano, comprovada compatibilidade biológica, mas que necessitam ser melhor avaliadas para se obter os princípios ativos os quais poderão fazer parte da obtenção de futuros fármacos utilizados na área odontológica.

## **6 CONCLUSÃO**

Considerando os resultados obtidos a partir da metodologia empregada no presente estudo, pode-se concluir que:

- Em geral, o edema se apresentou constante com o tempo nos grupos sem diferença entre eles, porém a solução hidroalcoólica + bactérias apresentou edema inicial maior com decréscimo no período final, tornando-se semelhante às outras soluções estudadas;
- O processo de reparo se conduziu de forma esperada no decorrer do tempo, evidenciando que as soluções obtidas dos extratos de araçá ou o soro acrescido da solução de microrganismos inativados, não foram capazes de exercer nenhuma influência negativa;
- As respostas teciduais observadas no período de 7 dias sugerem que a solução hidroalcoólica tenha exercido ação inibitória mais nítida sobre os produtos e subprodutos dos microrganismos avaliados;
- No período de 30 dias as soluções aquosa e hidroalcoólica apresentaram respostas biológicas semelhantes ao soro, indicando não exercerem interferência sobre os possíveis efeitos tóxicos dos componentes bacterianos no sentido de favorecer o reparo, contudo as associações não impediram o mesmo.

## 7 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. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):367-71.
5. Ruvierre DB, Leonardo MR, Silva LAB, Nelson-Filho P, Ito IY. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. *J Dent Child* 2007;74(2):118-23.
6. Tanomaru-Filho M. Comportamento dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães portadores de reação periapical crônica em função da técnica de neutralização do conteúdo séptico-tóxico e do cimento obturador empregado no tratamento endodôntico: avaliação radiográfica e histopatológica [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 1996.
7. Soares JA. Avaliação microbiológica, histopatológica e histomicrobiológica de dentes de cães com reação periapical crônica induzida, após preparo biomecânico automatizado e aplicação de curativos de demora à base de hidróxido de cálcio [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2003.
8. 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.

- 
9. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981;89(4):321-8.
  10. Sundqvist G. Pathogenicity and virulence of black-pigmented gram-negative anaerobes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6(2-3):125-37.
  11. Silva LAB, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Tratamento endodôntico de dentes decíduos portadores de necrose pulpar e lesão periapical crônica. In: Assed S. *Odontopediatria: bases científicas para a prática clínica*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 675-740.
  12. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20(6):276-8.
  13. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999;25(3):167-71.
  14. Tasman F, Cehreli ZC, Ogan C, Etikan I. Surface tension of root canal irrigants. *J Endod* 2000;26(10):586-7.
  15. Tanomaru Filho M. Reparo apical e periapical após tratamento endodôntico em dentes com reação periapical crônica em função da solução irrigadora e do curativo de demora- estudo em cães. Resposta inflamatória após injeção de diferentes soluções irrigadoras – estudo em camundongos. [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2001.
  16. 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(1):99-105.
  17. Di Stasi LC. *Plantas Mediciniais: arte e ciência, um guia de estudo*. São Paulo: UNESP; 1996.

18. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Junior VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quím Nova* 2002;25(3):429-38.
19. Volpato GT, Damasceno DC, Calderon IMP, Rudge MVC. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do *Diabetes mellitus*. *Rev Bras Pl Med* 2002;4(2):35-45.
20. Castellucci S, Lima MIS, Nordi N, Marques JGW. Plantas medicinais relatadas pela comunidade residente na estação ecológica de Jataí, Município de Luís Antônio/SP: uma abordagem etnobotânica. *Rev Bras Pl Med* 2000;3(1):51-60.
21. Santos PRV, Oliveira ACX, Tomassini TCB. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. *Rev Farm Bioquím Univ São Paulo* 1995;31(1):35-8.
22. Teske M, Trentini AM. *Compêndio de fitoterapia*. 2ª ed. Curitiba: Herbarium Lab. Botânico; 1994.
23. Wu-Yuan CD, Chen CY, Wu RT. Gallotannins inhibit growth, water-insoluble glucan synthesis, and aggregation of mutans streptococci. *J Dent Res* 1988;67(1):51-5.
24. Castro HG, Ferreira I. A dialética do conhecimento no uso das plantas medicinais. *Rev Bras Pl Med* 2001;3(2):19-21.
25. Guarim Neto G, Morais RG. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot Bras* 2003;17(4):561-84.
26. Bianco KG. *Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais da savana brasileira sobre Streptococcus mutans e a sua capacidade de desmineralização e a adesão à superfície de vidro [dissertação]*. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2004.

- 
27. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004;35(4):275-80.
28. Landucci LF. Atividade inibitória de extratos vegetais de plantas do cerrado brasileiro sobre microrganismos bucais [tese]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista; 2005.
29. Lima MR, Luna JS, Santos AF, Andrade MC, Sant'Ana AE, Genet JP et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2006;105(1-2):137-47.
30. Gaetti-Jardim Júnior E, Landucci LF, Khalil OAK, Nakano V, Pumbwe L, Wexlerc H et al. Antimicrobial activity of six plant extracts from the Brazilian savanna on periodontal pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* (enviado para publicação em 2008).
31. Novais RZ. Avaliação da resposta tecidual dos extratos vegetais aquoso e hidroalcoólico de araçá (*Psidium cattleianum*) pela análise edemogênica e morfológica em ratos [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2008.
32. Caldeira SD, Hiane PA, Ramos MAL, Filho MMR. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* SW) e do Tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do estado de Mato Grosso do Sul. *B Ceppa* 2004;22(1):145-54.
33. Matos FJA. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades. Fortaleza: UFC; 2002.
34. Navarro DF, Santos EAT, Rocha JCF, Bremm LL, Jukoski M, Ribeiro PG, Kozłowski Junior VA. Efeitos do digluconato de clorexidina, *Plantago major* e placebo sobre placa dental e gengivite: uma comparação clínica da eficácia de colutórios. *Rev Bras PI Med* 1998;1(1):28-38.
35. Taveira LAA. Estudo do poder flogógeno da placa dental íntegra e tratada com diferentes soluções extratoras [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo; 1988.

36. 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(3):128-33.
37. Takahashi K. Avaliação da resposta tecidual às pastas Guedes Pinto e de hidróxido de cálcio. Análise edemogênica e ao microscópio óptico, em ratos [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2004.
38. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25(3):161-6.
39. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001;12(1):3-8.
40. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2002;13(1):23-6.
41. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J* 2003;36(4):281-7.
42. 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.
43. Bernabé PF, Holland R, Paiva JG, Souza V, Nery MJ, Mello W. Behaviour of the subcutaneous connective tissue to the implantation of some materials employed in retrograde filling. *Rev Fac Odontol Araçatuba* 1978;7(1):7-17.

- 
44. Federation Dentaire International Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980;30(2):140-88.
45. Campos GM. Programa GMC: pesquisa biológica. Versão 2002 [computer program]. Ribeirão Preto:USP; 2004.
46. Vieira RF, Martins MVM. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. *Rev Bras Pl Med* 2000;3(1):13-36.
47. Farnsworth NR. Testando plantas para novos remédios. In: Wilson EO, ed. Biodiversidade. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 1997. p.107-25.
48. Leitão DPS, Silva Filho AA, Polizello ACM, Bastos JK, Spadaro ACC. Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biol Pharm Bull* 2004;27(11):1834-9.
49. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Homma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(1):61-4.
50. Morgan TD, Beezer AE, Mitchell JC, Bunch AW. A microcalorimetric comparison of the anti-*Streptococcus mutans* efficacy of plant extracts and antimicrobial agents in oral hygiene formulations. *J Appl Microbiol* 2001;90(1):53-8.
51. Ozaki F, Pannuti CM, Imbronito AV, Pessotti W, Saraiva L, Freitas NM et al. Efficacy of a herbal toothpaste on patients with established gingivitis – a randomized controlled trial. *Braz Oral Res* 2006;20(2):172-7.
52. Gaetti-Jardim Júnior E, Habe HA. Inhibitory activity of plant extracts on *Fusobacterium nucleatum* and their adherence to host's cells. *Cienc Odontol Bras*. In press 2006.

- 
53. Landucci LF, Oliveira LD, Brandão EHS, Koga-Ito CY, Jardim Júnior EG, Jorge AOC. Efeitos de *Coffea arabica* sobre a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície de vidro. Ciênc Odontol Bras 2003;6(3):58-64.
54. Prabu GR, Gnanamani A, Sadulla S. Guajaverin-a plant flavonoid a potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. J Appl Microbiol 2006;101(2):487-95.
55. Razak FA, Othman RY, Rahim ZHA: The effect of Piper betle and *Psidium guajava* extracts on the cell-surface hydrophobicity of selected early settlers of dental plaque. J Oral Sci 2006;48(2):71-5.
56. Wu MK, Moorer WR, Wesselink PR. Capacity of anaerobic bacteria enclosed in a simulated root canal to induce inflammation. Int Endod J 1989;22(6):269-77.
57. Nisengard RJ, Goodman AD, Schein B. Infecções periapicais. In: Nisengard RJ, Newman MG. Microbiologia oral e imunologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 336-41.
58. Sveen K. The capacity of lipopolysaccharides from *bacteroides*, *fusobacterium* and *veillonella* to produce skin inflammation and the local and generalized Shwartzman reaction in rabbits. J Periodontal Res 1977;12(5):340-50.
59. Falkler WA Jr, Clayman EB, Shaefer DF. Haemolysis of human erythrocytes by the *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease. Arch Oral Biol 1983;28(8):735-9.
60. Nygren H, Dahlén G, Nilsson LA. Human complement activation by lipopolysaccharides from *bacteroides oralis*, *fusobacterium nucleatum*, and *veillonella parvula*. Infect Immun 1979; 26(2):391-6.
61. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented *bacteroides* species in root canal infections. J Endod 1989;15(1):13-9.

- 
62. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod* 1992;18(11):558-61.
63. Beachey EH, Chiang TM, Ofek I, Kang AH. Interaction of lipoteichoic acid of grupo A Streptococci with human platelets. *Infect Immun* 1977;16(2):649-54.
64. Beachey EH, Dale JB, Grebe S, Ahmed A, Simpson WA, Ofek I. Lymphocyte binding and T-cell mitogenic properties of group A streptococcal lipoteichoic acid. *J Immunol* 1979;122(1):189-95.
65. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(5):308-20.
66. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7(5):257-62.
67. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios* 1994;80(325):231-43.
68. Jung IY, Choi BK, Kum KY, Roh BD, Lee SJ, Lee CY et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod* 2000;26(10):599-604.
69. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev Odontol Unesp* 2007;36(2):163-8.
70. Roças IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms or periradicular diseases. *J Endod* 2004;30(5):315-20.
71. Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7(4):249-52.

- 
72. Sundqvist G. Ecology of the root canal. *J Endod* 1992;18(9):427-30.
73. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol* 2005;32(Suppl 6):57-71.
74. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am* 1992;267(2):54-61.
75. Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 1986;234(4773):203-5.
76. Day AE, Langkamp HH, Bowen LL, Ascendio F, Agarwal S, Piesco NP. Signal transduction during LPS-mediated activation of pulp fibroblasts [abstract] *J Dent Res* 1998;77(sp issue):673.
77. McGee JOD, Isaacson PG, Wright NA. *Oxford text-book of pathology: principles of pathology*. Oxford: University Press; 1992.
78. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod* 1999;25(12):795-9.
79. César CAS, Leonardo MR, Lia RCC, Benatti Neto C. Estudo comparativo da resposta do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de tubos de dentina, obturados parcialmente e complementados com diferentes misturas de hidróxido de cálcio. *Rev Odontol Unesp* 1985;14(1):47-58.
80. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from gram-negative bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74(5):648-51.
81. Blix IJ, Helgeland K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. *Eur J Oral Sci* 1998;106(1):576-81.

- 
82. Hafström C, Dahlén G. Pathogenicity of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates in a wound chamber model in rabbits. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12(3):148-54.
83. van Dalen PJ, van Deutekom-Mulder EC, de Graaff J, van Steenberghe TJ. Pathogenicity of *Peptostreptococcus micros* morphotypes and *Prevotella* species in pure and mixed culture. *J Med Microbiol* 1998;47(2):135-40.
84. Siqueira JF Jr, Magalhães FA, Lima KC, de Uzeda M. Pathogenicity of facultative and obligate anaerobic bacteria in monoculture and combined with either *Prevotella intermedia* or *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13(6):368-72.
85. Gaetti-Jardim Júnior E, Luvizotto MCR, Avila-Campos MJ. Virulence of oral *Fusobacterium nucleatum* from humans and non-human primates in mice. *Braz J Microbiol* 2000;31(2):146-50.
86. Moorer WR, Thoden van Velzen SK, Wesselink PR. Long-term tissue response to bacteria enclosed in a subcutaneous implant that simulates the infected dental root canal. *Int Endod J* 1984;17(4):207-12.
87. Swingle KF. Evaluation for anti-inflammatory activity. In: Scherre RA, Whitehouse MW. *Anti-inflammatory agents: chemistry and pharmacology*. London: Academic Press; 1974. p. 33-109.
88. Rutberg M, Spangberg E, Spangberg L. Evaluation of enhanced vascular permeability of endodontic medicaments in vivo. *J Endod* 1977;3(9):347-51.
89. Autian J. General toxicity and screening tests for dental materials. *Int Dent J* 1974;24(2):235-50.
90. Tronstad L, Wennberg A, Hasselgren G. Screening tests for dental materials. *J Endod* 1978;4(10): 304-7.
91. Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981;7(8):355-67.

92. Costa CAS. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p.167-94.
93. Bhambhani SM, Bolanos OR. Tissue reactions to endodontic materials implanted in the mandibles of guinea pigs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76(4):493-501.
94. Nelson Filho P, Silva LA, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide – based root canal medicaments. *Int Endod J* 1999;32(4):303-11.
95. Binnie WH, Mitchell DF. Induced calcification in the subdermal tissues of the rat. *J Dent Res* 1973;52(5):1087-91.
96. Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabé PF, 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;34(1):62-5.
97. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967;24(5):674-83.
98. Leal JM, Holland R, Esberard RM. Sealapex, CRCS, Fill Canal and N. Rickert, study of biocompatibility in the subcutaneous connective tissue of the rats. *Odontol Clin* 1988;2(1):7-14.
99. Makkes PC, van Velzen SK, Wesselink PR, de Greeve PC. Polyethylene tubes as a model for the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;44(2):293-300.
100. Pullin AM, Carvalho ACP. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo a soluções de álcool e/ou de anestésicos locais: estudo histológico em ratos. *RGO* 1984;32(4):287-95.
101. Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 1998;24(2):82-5.

102. Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 2004;30(5):348-51.
103. Moretton TR, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res* 2000;52(3):528-33.
104. Trindade AC, Oliveira EPM, Figueiredo JAP. Análise comparativa da resposta tecidual ao agregado trióxido mineral (MTA) e ao cimento portland, isolado e acrescido de substâncias radiopacizante. *J Bras Endodontia* 2003; 4(15):309-14.
105. Magro-Kato MM. Avaliação microscópica da implantação, em subcutâneo de ratos, do agregado trióxido mineral – CPM e do clínquer do cimento Portland branco puro e acrescido de 2 e 5% de sulfato de cálcio e determinação de seus tempos de presa [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo; 2007.
106. Udaka K, Takeuchi Y, Movat HZ. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. *Proc Soc Exp Bio Med* 1970;133(4):1384-7.

---

## ANEXO A

### NORMAS VANCOUVER

#### References

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in parentheses. References cited only in tables or Figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular Table or figure.

Use the style of the examples below, which are based on the formats used by the NLM in Index Medicus. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. Consult the List of Journals Indexed in Index Medicus, published annually as a separate publication by the library and as a list in the January issue of Index Medicus. The list can also be obtained through the library's web site (<http://www.nlm.nih.gov>).

Avoid using abstracts as references. References to papers accepted but not yet published should be designated as "in press" or "forthcoming"; authors should obtain written permission to cite such papers as well as verification that they have been accepted for publication. Information from manuscripts submitted but not accepted should be cited in the text as "unpublished observations" with written permission from the source.

Avoid citing a "personal communication" unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication.

The references must be verified by the author(s) against the original documents.

The Uniform Requirements style (the **Vancouver** style) is based largely on an ANSI standard style adapted by the NLM for its databases. Notes have been added where **Vancouver** style differs from the style now used by NLM.

#### Articles in Journals

##### *1. Standard journal article*

List the first six authors followed by et al.

(Note: NLM now lists up through 25 authors; if there are more than 25 authors, NLM lists the first 24, then the last author, then et al.)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1;124 (11):980-3.

As an option, if a journal carries continuous pagination throughout a volume (as many medical journals do) the month and issue number may be omitted.

(Note: For consistency, the option is used throughout the examples in Uniform Requirements. NLM does not use the option.)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

More than six authors:

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006- 12.

**2. Organization as author**

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

**3. No author given**

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

**4. Article not in English**

(Note: NLM translates the title to English, encloses the translation in square brackets, and adds an abbreviated language designator.)

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral infrapatellar seneruptur hos tidligere frisk kvinne. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1996;116:41-2.

**5. Volume with supplement**

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

**6. Issue with supplement**

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2):89-97.

**7. Volume with part**

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):303-6.

**8. Issue with part**

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107(986 Pt 1):377-8.

**9. Issue with no volume**

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320):110-4.

**10. No issue or volume**

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

**11. Pagination in Roman numerals**

Fisher GA, Sivic BI. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr;9(2):xi-xii.

**12. Type of article indicated as needed**

Enzensberger W, Fischer PA. Metronome in Parkinson's disease [letter]. *Lancet* 1996;347:1337.

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [abstract]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

**13. Article containing retraction**

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retraction of Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. In: *Nat Genet* 1994;6:426-31]. *Nat Genet* 1995;11:104.

**14. Article retracted**

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retracted in *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3127]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:1083-8.

**15. Article with published erratum**

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [published erratum appears in *West J Med* 1995;162:278]. *West J Med* 1995;162:28-31.

**Books and Other Monographs**

(Note: Previous **Vancouver** style incorrectly had a comma rather than a semicolon between the publisher and the date.)

**16. Personal author(s)**

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

**17. Editor(s), compiler(s) as author**

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

**18. Organization as author and publisher**

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

**19. Chapter in a book**

(Note: Previous **Vancouver** style had a colon rather than a p before pagination.)

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

**20. Conference proceedings**

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

**21. Conference paper**

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

**22. Scientific or technical report**

Issued by funding/sponsoring agency:

Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSI-GOEI69200860.

Issued by performing agency:

Field MJ, Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

**23. Dissertation**

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

**24. Patent**

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

**Other Published Material****25. Newspaper article**

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21;Sect. A:3 (col. 5).

**26. Audiovisual material**

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

**27. Legal material**

Public law:

Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Unenacted bill:

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sess. (1995).

Code of Federal Regulations:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Hearing:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

### **28. Map**

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [demographic map]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

### **29. Book of the Bible**

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

### **30. Dictionary and similar references**

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119-20.

### **31. Classical material**

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

## **Unpublished Material**

### **32. In press**

(Note: NLM prefers "forthcoming" because not all items will be printed.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

## **Electronic Material**

### **33. Journal article in electronic format**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

### **34. Monograph in electronic format**

CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

### **35. Computer file**

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

## ANEXO B

**CERTIFICADO DA APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

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



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL DOS EXTRATOS VEGETAIS AQUOSO E HIDROALCOÓLICO DE ARAÇÁ (*Psidium cattleianum*) ASSOCIADOS A MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS E FACULTATIVOS INATIVADOS, EM RATOS. ANÁLISE EDEMOGÊNICA E MICROSCÓPICA" sob responsabilidade do Prof. Dr. ELÓI DEZAN JÚNIOR e colaboração de DENISE BELUCIO RUVIÈRE e Prof. Dr. ÉLERTON GAETTI JARDIM JÚNIOR, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *AD REFERENDUM* pela CEEA de acordo com o protocolo no. 2008-000165.

Araçatuba, 09 de janeiro de 2008.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> CRISTINA ANTONIALI SILVA  
Presidente da CEEA - FOA/UNESP