

CAMILLA PIRES BRUNO

Avaliação da compatibilidade biológica do hidróxido de cálcio utilizando como veículo extratos vegetais de araçá (*Psidium cattleianum*). Análise microscópica em ratos.

ARAÇATUBA-SP

2013

CAMILLA PIRES BRUNO

Avaliação da compatibilidade biológica do hidróxido de cálcio utilizando como veículo extratos vegetais de araçá (*Psidium cattleianum*). Análise microscópica em ratos.

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Adj. Eloi Dezan Junior

Araçatuba - SP

2013

BRUNO, CP. **Avaliação da compatibilidade biológica do hidróxido de cálcio utilizando como veículo extratos vegetais de araçá (*Psidium cattleianum*). Análise microscópica em ratos.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013

RESUMO

Extratos de folhas de araçá (*Psidium cattleianum*) são biocompatíveis e quando associados ao hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$ inibe o *Enterococcus faecalis* em 24 horas. O objetivo do presente estudo foi avaliar, in vivo, a resposta biológica de pastas de Hidróxido de Cálcio $[Ca(OH)_2]$ com diferentes veículos preparados a partir de extratos vegetais de araçá (*Psidium cattleianum*). Para o preparo das pastas foi acrescido ao hidróxido de cálcio, soluções aquosa, etanólica e etanólica resuspendida em propilenoglicol preparadas com extrato vegetal de Araçá e como grupo controle foi utilizada a pasta de $Ca(OH)_2$ associado ao propilenoglicol. Para a análise microscópica, tubos de polietileno contendo as pastas experimentais foram implantados na região dorsal de 20 ratos machos (Wistar) pesando entre 200g e 280g. Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias. As lâminas obtidas foram analisadas na coloração de Hematoxilina e Eosina atribuindo-se escores para intensidade da resposta tecidual. Na análise histológica foi observada que a reação tecidual foi semelhante entre os extratos aquoso, etanólico e etanólico resuspendido em propilenoglicol, e sem diferença estatística do veículo propilenoglicol (controle) ($p < 0,05$). Pode-se concluir que a utilização de extratos de araçá como veículo do $Ca(OH)_2$ apresentam resposta tecidual favorável, merecendo mais atenção em pesquisas.

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

BRUNO, CP. **Evaluation of biocompatibility of calcium hydroxide as a vehicle using plant extracts from “araçá” (*Psidium cattleianum*). Microscopic analysis in rats.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2013

ABSTRACT

Leaf extracts from ‘araçá’ (*Psidium cattleianum*) are biocompatible and when combined with calcium hydroxide [Ca(OH)₂] inhibits *Enterococcus faecalis* in 24 hours. The aim of this study was to evaluate in vivo the tissue response of the ‘araçá’ leaf extracts associated to calcium hydroxide [Ca(OH)₂] with different vehicles prepared from plant extracts of ‘araçá’ (*Psidium cattleianum*). To prepare the substance were added to calcium hydroxide, aqueous ‘araçá’ extract, ethanolic extract and ethanolic extract resuspended in propylene glycol. As control group was used [Ca(OH)₂] with propylene glycol. For microscopic analysis, polyethylene tubes containing the experimental substances were implanted in the dorsal region of 20 male rats (Wistar) weighing between 200 and 280 g. The period of analysis was 7 and 30 days. The tissues were stained with Hematoxylin and Eosin, and scores were attributed for intensity of tissue response. As a result, the repair progress was observed over the time ($p < 0,05$). The tissue response was similar between the aqueous and ethanol extract, and ethanol extract resuspended in propylene glycol and no statistical difference compared to the control group. It can be concluded that the use of extracts of guava as a vehicle of [Ca(OH)₂] presents favorable tissue response, deserving more attention because it is a recent line of research, and has great potential antimicrobial and good biological response.

Keywords: Endodontics, materials test, vegetable extracts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do tubo de polietileno para implante subcutâneo -----	14
Figura 2 - Esquema do dorso do rato com o sítio cirúrgico que receberá cada implante de polietileno com os grupos experimentais -----	15
Figura 3 - Preparo dos tubos de polietileno utilizados para o implante -----	15
Figura 4 - Inserção das pastas dentro dos tubos com auxílio de seringa de insulina e agulha hipodérmica -----	15
Figura 5 - Tricotomia manual da região dorsal do animal -----	16
Figura 6 - Anti-sepsia da área cirúrgica -----	16
Figuras 7 - Incisão longitudinal cirúrgica -----	17
Figura 8 – Trocarre para inserção dos tubos no subcutâneo -----	16
Figura 9 - Remoção da peça contendo o tubo -----	16
Figura 10 e 11 – Análise histológica do grupo extrato de araquá aquoso nos tempos pós-operatório de 7 e 30 (Hematoxilina e Eosina, 10x) -----	18
Figura 12 e 13 – Análise histológica do grupo extrato etanólico nos tempos pós-operatório de 7 e 30 (Hematoxilina e Eosina, 10x) -----	19
Figura 14 e 15 – Análise histológica do grupo extrato etanólico ressuspendido em propilenoglicol nos tempos pós-operatório de 7 e 30 (Hematoxilina e Eosina, 10x) -----	19

Figura 16 e 17 – Análise histológica do grupo controle nos tempos

pós-operatório de 7 e 30 (Hematoxilina e Eosina, 10x) ----- 20

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 - Médias dos postos das amostras dos grupos experimentais ----- 23

Gráfico 1- Representação gráfica dos postos médios atribuídos aos
grupos experimentais ----- 23

SUMÁRIO

1 - Introdução -----	8
2 - Proposição -----	11
3 - Materiais e métodos -----	12
4 - Resultados -----	18
5 - Discussão -----	24
6 – Conclusão -----	26
7 - Referências -----	27

1. INTRODUÇÃO

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

O tratamento endodôntico quando realizado deve seguir passos importantes para que não ocorra a contaminação dos tecidos periapicais e não aconteça a recontaminação do canal por bactérias residuais, sendo assim, o preparo biomecânico juntamente com a irrigação e a utilização de medicamentos intracanaís são extremamente necessários para o sucesso do tratamento.

Contudo apenas a ação mecânica dos instrumentos associada à irrigação muitas vezes não é capaz de eliminar grande parte dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares infectados devido a sua complexidade anatômica, local onde estão alojadas bactérias que não serão eliminadas pelo preparo biomecânico² ou àquelas localizadas nas reabsorções periapicais (infecção extra-radicular) e/ou protegidas pelo biofilme apical³. Ainda que o preparo biomecânico reduza significativamente o número de microrganismos, aqueles que persistiram, ao se multiplicarem podem ocasionar a recontaminação do mesmo², podendo estes ser novamente detectados na luz do canal principal após 72 e 96 horas.^{4,5}

Nas infecções endodônticas, o hidróxido de cálcio, Ca(OH)_2 , é amplamente utilizado como medicação intracanal, visto que possui excelentes propriedades, como a de alterar o metabolismo enzimático dos microrganismos a partir da influência de um gradiente de pH altamente alcalino e também por sua biocompatibilidade.⁶ Porém, o Ca(OH)_2 age por contato direto e sua ação pode torna-se prejudicada frente a microrganismos que tem a capacidade de penetrar profundamente nos túbulos dentinários.⁷ Outro fator a ser considerado é o tempo de contato necessário para sua ação.⁸ Alguns estudos demonstram que alguns microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* ainda podem resistir a sua ação.^{09,10,11}

Devido a essa possível resistência ao Ca(OH)_2 a utilização de plantas medicinais, cujo respaldo se dá por pesquisas etnofarmacobotânicas^{12,13,14} tem sido explorado.¹²⁻²⁰ Esses medicamentos fitoterápicos podem ter vantagens sobre os compostos sintéticos, tais como a diversidade, flexibilidade, acessibilidade, disponibilidade e uma ampla aceitação.²¹

Psidium pertence à família *Myrtaceae* e é comumente encontrado na América tropical. Tradicionalmente, plantas de *Psidium spp.* são usadas para o tratamento de escorbuto na Ásia e África, para tratamento de tosse e doenças pulmonares na Bolívia e Egito, usado como anti-diarréico no México, e como anti-inflamatório e agente hemostático na China.^{22,23}

Bianco, em 2004,¹⁵ e Landucci, em 2005,¹⁶ analisaram extratos de plantas do cerrado brasileiro, e comprovaram uma excelente atividade antimicrobiana de alguns extratos. Bianco, em 2004,¹⁵ concluiu que dentre as 18 (dezoito) espécies de vegetais avaliadas, apenas os extratos da folha de araçá (*Psidium cattleianum*), folha da aroeira do sertão (*Astronium urundeuva*) e folha da guajuvira (*Patagonula americana*), além da casca de jacarandá (*Platypodium elegans*) tiveram atividade inibitória frente a todos os microrganismos testados.

As preparações etanólicas e aquosas mostraram a mesma atividade antimicrobiana em todas as modalidades de testes realizados, o que indica que o princípio ativo pode ser extraído por métodos simples, empregando-se água ou álcool como líquido extrator sem prejuízo para a atividade antimicrobiana. Até onde se pode verificar, essas plantas não são utilizadas no controle de biofilme microbiano e mesmo no tratamento das infecções superficiais da boca, embora possam ser encontradas referências ao seu uso como parte da medicina popular em outras áreas, como anti-inflamatórios, anti-reumáticos, anti-diarréicos e outros usos populares.¹⁵

Gaetti-Jardim et al. (2011) mostraram que extratos de *Psidium cattleianum* apresentam a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos como *Streptococcus mutans*, anaeróbios como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, microaerófilos como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* tanto em estado planctônico quanto em biofilme.^{17,18} Atuam também na redução das expressões protéicas envolvidas com o metabolismo, glicólise e produção de ácido láctico do

Streptococcus mutans,¹⁵ e diminuem o crescimento de *Streptococcus mutans* em biofilme de ratos e a desmineralização de esmalte.²⁴ Outro trabalho avaliou os extratos em subcutâneos de ratos para observar a resposta biológica dos tecidos e estes se mostraram biocompatíveis, estimulando ainda mais seu possível uso.¹⁹

Segundo Novaes (2008)²⁵, os extratos vegetais aquoso e etanólico de araçá apresentaram-se biocompatíveis com resposta semelhante ao soro fisiológico e potencial para uso em odontologia.

Dezan, Jr et al.(2010)²⁰ avaliaram a atividade antimicrobiana da associação dos extratos etanólico e aquoso de araçá ao hidróxido de cálcio frente a *Enterococcus faecalis*, frequentemente encontrado em casos de insucesso endodôntico, que apresentaram maior poder antimicrobiano quando comparado a associação do Ca(OH)₂ à água destilada. O extrato etanólico associado ao hidróxido de cálcio apresentou atividade antimicrobiana máxima no período de 24 horas.

Durante a colocação da pasta de hidróxido de cálcio como curativo de demora, este pode entrar em contato com os tecidos periapicais via forame principal e ramificações. Embora seja conhecido que a associação dos extratos vegetais ao hidróxido de cálcio apresente potencial atividade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*,¹⁷ sua compatibilidade biológica é desconhecida, neste sentido nos propusemos a realização deste trabalho.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar a biocompatibilidade da associação do extrato de araçá (*Psidium cattleianum*), aquoso, etanólico e etanólico ressuspendido em propilenoglicol, ao Hidróxido de Cálcio comparada à associação de Ca(OH)_2 ao propilenoglicol, por meio da análise microscópica em ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa tem aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal estando de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA de acordo com o Protocolo nº 07457/2010.

3.1. PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

As folhas de araquá (*Psidium Cattleianum*) foram obtidas na Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brasil. Foram preparados extratos de folha de araquá, de plantas sadias cultivadas como plantas ornamentais e com identificação e linhagem conhecidas. As folhas 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 remover a superfície impregnada com poeira ou insetos. As folhas foram, em seguida, lavadas em água corrente e colocadas para secar em temperatura ambiente, e posteriormente em estufa a 40°C até ficarem secas e quebradiças.²⁹

A seguir, procedeu-se a etapa de fragmentação das folhas em liquidificador industrial até obtenção do pó das mesmas.

Os extratos aquoso e etanólico foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Machado et al em 2012.²⁹ Assim, para a obtenção do extrato aquoso, 20 gramas do pó das folhas de araquá foram adicionadas a 250 ml de água destilada e mantidas por 5 minutos a 100°C, por 1 hora a 55°C e por 72 horas em temperatura ambiente. Cada mistura foi agitada a cada 24 horas. O extrato foi purificado por meio de filtração fracionada em membranas de éster de celulose de porosidade 0,65mm e esterilizado por filtração em membranas de 0,22mm (Millipore®) e armazenado em frascos âmbar esterilizado.

O extrato etanólico foi obtido adicionando 20 gramas do pó das folhas a 250 ml de etanol 80%, o frasco foi agitado vigorosa e manualmente durante três minutos. Esta operação foi realizada cinco vezes ao dia durante 12 dias, a fim de assegurar a adequada extração dos princípios ativos.

Finalmente, foi realizada a filtração da preparação por meio de filtração comum. A seguir, o extrato foi esterilizado por filtração em membranas de éster de celulose de 0,22mm (Millipore®) e armazenado em frasco âmbar esterilizado.

Uma parte deste extrato etanólico (125 ml) foi colocado em Béquer em estufa a 40°C para evaporação. Depois de evaporado, nesta placa foram colocados 125 ml de propilenoglicol para ressuspender. Obtendo-se, dessa forma, o extrato etanólico ressuspendido em propilenoglicol.

Com o preparo dos extratos as seguintes associações foram constituídas na proporção de 1g de Ca(OH)₂ para 1ml do veículo: extrato aquoso + Ca(OH)₂; extrato etanólico + Ca(OH)₂; extrato etanólico ressuspendido em propilenoglicol + Ca(OH)₂; propilenoglicol + Ca(OH)₂

3.2. ANIMAIS

Para a realização deste experimento foram utilizados 20 ratos machos da variedade Wistar (*Rattus norvegicus*) com idade de dois meses e massa corporal de aproximadamente 250 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*.

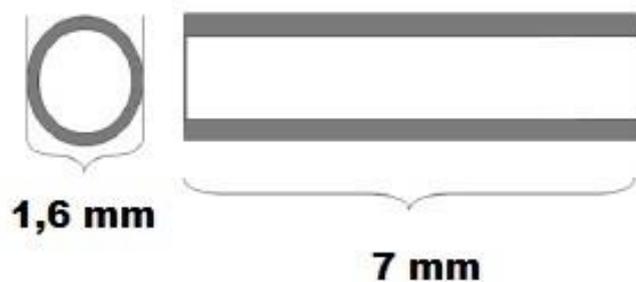
3.3. IMPLANTE EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Para esta etapa foram utilizados 10 animais para cada período experimental, sendo esses períodos de sete e 30 dias, totalizando 20 animais para o experimento.

Cada animal recebeu quatro implantes, cada um contendo um grupo experimental: extrato aquoso + Ca(OH)₂; extrato etanólico + Ca(OH)₂, extrato etanólico ressuspendido em propilenoglicol + Ca(OH)₂ e propilenoglicol + Ca(OH)₂, portanto soma-se 20 implantes para cada grupo experimental e controle.

3.3.a. Obtenção dos Tubos de Polietileno

Tubos de polietileno (Abbott Labs of Brasil, São Paulo, SP, Brasil), com 1,6mm de diâmetro externo e 7,0mm de comprimento, sem selamento nas extremidades, serviram para acomodação dos materiais testados, a introdução das pastas nos tubos foi realizada com o auxílio de uma seringa de insulina e agulha hipodérmica 0,70 x 25mm (22G x 1 1/4").



Tubo para implante

Figura 1 - esquema do tubo de polietileno para implante subcutâneo.

3.3.b. 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 manual da área dorsal e antissepsia com iodo a 5%, foi realizada uma incisão longitudinal com lâmina de bisturi número 15C acompanhando a linha mediana, com extensão de 1cm atingindo o tecido subcutâneo. Desta forma, foram implantados, no tecido subcutâneo dos animais, os tubos de polietileno, levados por um trocarte, contendo a pasta preparada com extrato de araçá etanólico (G1), extrato de araçá aquoso (G2), extrato de araçá etanólico ressuspendido em propilenoglicol (G3) e o controle (G4), conforme posicionamento visto na figura 2. A incisão longitudinal da pele foi então suturada com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson).

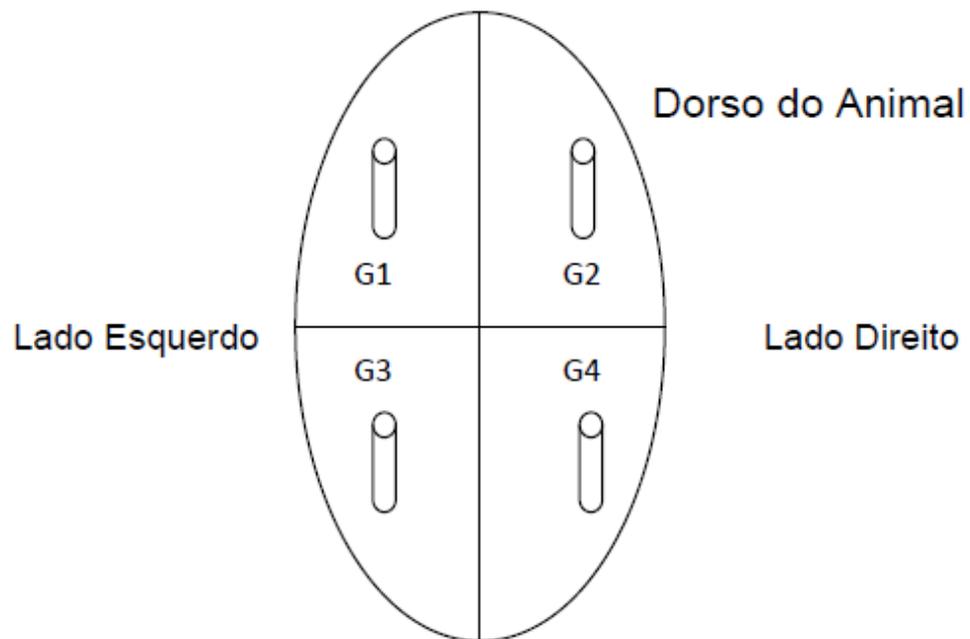


Figura 2 - esquema do dorso do rato com o sítio cirúrgico que receberá cada implante de polietileno com os grupos experimentais.



Figura 3



Figura 4

Figuras 3 e 4 - Preparo dos tubos de polietileno utilizados para o implante e inserção das pastas dentro dos tubos com auxílio de seringa de insulina e agulha hipodérmica.



Figura 5

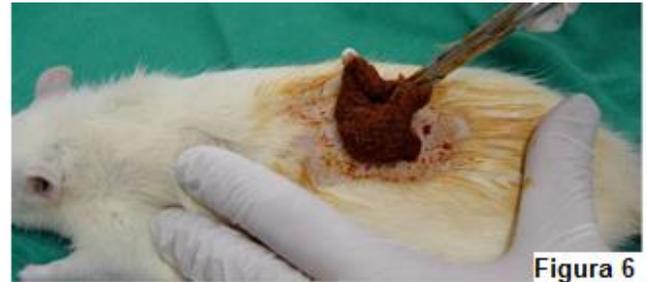


Figura 6

Figuras 5 e 6 - Tricotomia manual da região dorsal do animal e anti-sepsia com iodo a 5%.



Figura 7



Figura 8

Figuras 7 e 8 - Incisão longitudinal atingindo o subcutâneo com lâmina de bisturi número 15 e trocarte, com ponta romba, para inserção dos tubos no subcutâneo.



Figura 9

Figura 9 - Remoção da peça contendo o tubo e os tecidos circundantes com auxílio de tesoura após os períodos experimentais.

Os animais foram mortos por overdose anestésica aos sete e 30 dias para obtenção das peças contendo o tubo de polietileno, circundado por tecido conjuntivo adjacente. Uma vez removidos, os tecidos foram fixados em solução de formalina a 10% e pH 7,0, por 48 horas e lavadas em água corrente por 5 horas. As peças foram então desidratadas e incluídas em glicol metacrilato (Historesin - Leica), sendo orientadas de maneira a permitir cortes histológicos do implante em seu sentido longitudinal. Os cortes, semi-seriados e com 3 micrômetros de espessura, foram corados com Hematoxilina e Eosina para análise microscópica.

A avaliação da irritação tecidual produzida pelas pastas, foi realizada segundo critérios descrito por Machado et al.²⁹ e pelo Federation Dentaire International Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics.³⁰ 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 quando detectadas de 25 a 125 células inflamatórias. Caso essas células ocorressem em número superior a 125, o infiltrado inflamatório era considerado severo ou intenso (escore 3).

Quanto à espessura da cápsula fibrosa, os seguintes escores foram utilizados: escore 0 (zero) para cápsula fibrosa considerada fina, de espessura inferior a 150µm ou escore 3 para cápsula fibrosa considerada espessa, superior a 150µm.^{31,32}

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados 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) e 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%.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Microscópica:

ARACÁ AQUOSO - 7 dias

De maneira geral, o grupo apresentou cápsula fibrosa espessa; observou-se também a presença de alguns vasos sanguíneos (angiogênese). Quanto ao aspecto celular, no tecido de granulação foram vistos linfócitos e macrófagos dispersos pelo tecido de reparo. Existe também uma abundância de fibroblastos em atividade. A esses fibroblastos estão associadas fibras colágenas, possuidoras de aspecto ligeiramente desorganizado e complexo (Figura 10).

ARACÁ AQUOSO - 30 dias

De forma geral, pôde-se perceber a diminuição do grau de resposta inflamatória tecidual. As cápsulas revelaram-se mais finas, prevalecendo valores de cápsula menores que 150 µm em maior quantidade de lâminas, quando comparado ao período de 7 dias . Num aspecto celular, foi verificado uma quantidade menor de fibroblastos, porém uma maior quantidade de fibrócitos perifericamente, envoltos por fibras colágenas mais bem dispostas e organizadas paralelamente ao implante. Ou seja, por registro de aumento de 40x, observou-se uma redução da quantidade de células, tanto de fibroblastos, quanto de células inflamatórias comparativamente ao período de 7 dias (Figura 11).

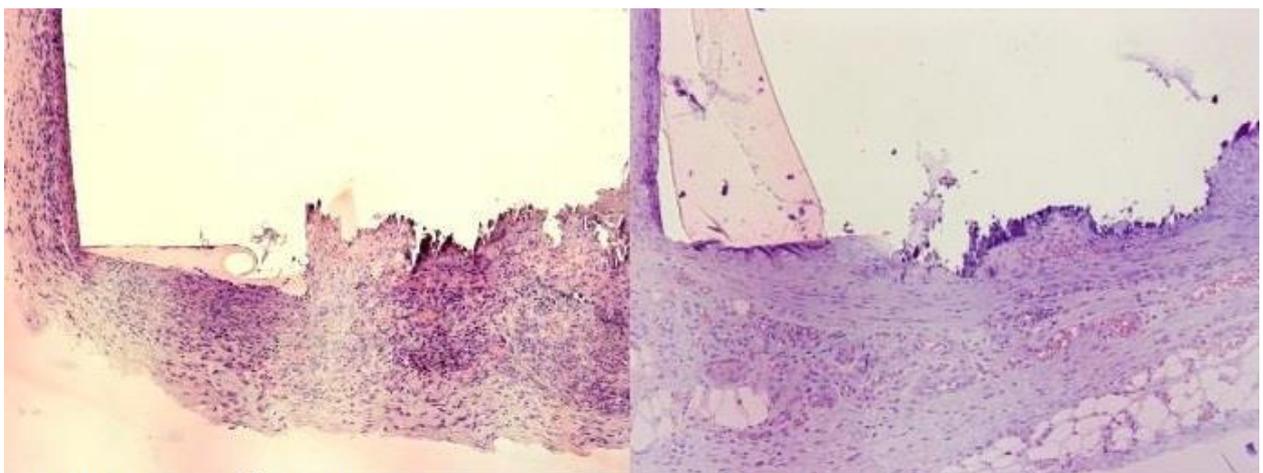


FIGURA 10 - ARACÁ AQUOSO - 7 dias

FIGURA 11 - ARACÁ AQUOSO - 30 dias

Figura 10 e 11 – Análise histológica do grupo extrato de aracá aquoso nos tempos pós-operatório de 7 e 30, respectivamente. (Hematoxilina e Eosina, 10x)

EXTRATO ETANÓLICO - 7 dias

O grupo apresentou cápsulas prevalentemente espessas. As lâminas nos revelam uma cápsula povoada por células inflamatórias, com predomínio de macrófagos, linfócitos e outras células mononucleadas, características de uma inflamação crônica.

Pode-se constatar também em um espécime a presença de eosinófilos. Quanto aos fibroblastos, esses foram evidenciados em meio a poucas fibras colágenas que se apresentavam em disposição complexa e desorganizadas (Figura 12).

EXTRATO ETANÓLICO - 30 dias

Este grupo também apresentou um grau maior de organização tecidual em relação ao período de 7 dias. As cápsulas se apresentaram menos espessa e composta por fibras colágenas mais organizadas, condensadas e dispostas paralelamente ao implante. Foi verificado um menor número de fibroblastos e de células inflamatórias, indicando uma maturação do reparo. Os macrófagos ao redor do implante apresentavam menor diâmetro, indicando uma diminuição no processo de atividade fagocitária, exercendo satisfatoriamente sua função de isolar o organismo da substância exógena (Figura 13).

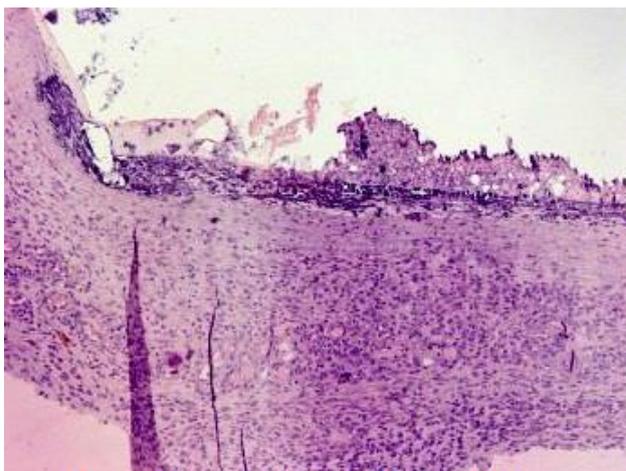


Figura 12- EXTRATO ETANÓLICO - 7 DIAS

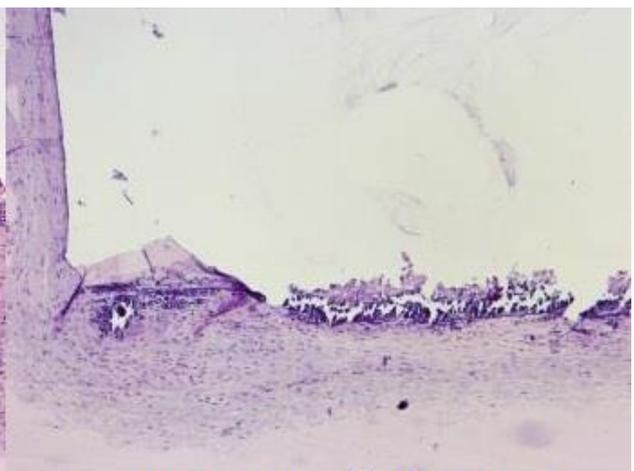


Figura 13 - EXTRATO ETANÓLICO - 30 DIAS

Figura 12 e 13 – Análise histológica do grupo extrato etanólico nos tempos pós-operatório de 7 e 30, respectivamente. (Hematoxilina e Eosina, 10x)

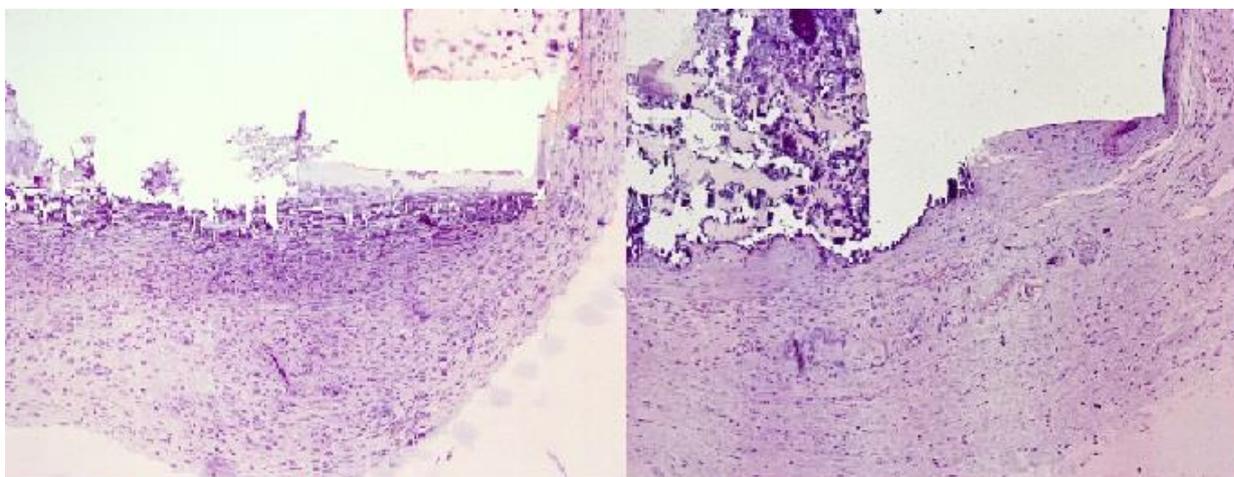
EXTRATO ETANÓLICO RESSUSPENDIDO EM PROPILENOGLICOL – 7 dias

As cápsulas se mostraram espessas. O grupo apresentou características típicas do período de 7 dias, com grande quantidade de fibroblastos, com fibras colágenas dispersas. Houve uma lâmina com presença de eosinófilos (Figura 14).

EXTRATO ETANÓLICO RESSUSPENDIDO EM PROPILENOGLICOL – 30 dias

O grupo apresentou amostras com imagens microscópicas que indicam que ocorreu uma grande diminuição do quadro inflamatório comparado ao período de 7 dias. As cápsulas apresentaram maior quantidade de espécimes com espessura maior que 150 μm , apesar de também haver aquelas com dimensões menores que esse valor. Vasos sanguíneos de pequeno calibre foram visualizados em todas as lâminas analisadas.

A nível celular as lâminas apresentam um povoamento diminuído de células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos e outras células mononucleadas. Os fibroblastos foram observados em meio a fibras colágenas que se apresentavam em disposição mais organizadas em volta do implante, com característica de desorganização somente em algumas regiões (Figura 15).



**Figura 14 - EXTRATO ETANÓLICO
RESSUSPENDIDO EM PROPILENOGLICOL - 7 DIAS**

**Figura 15 - EXTRATO ETANÓLICO
RESSUSPENDIDO EM PROPILENOGLICOL - 30 DIAS**

Figura 14 e 15 – Análise histológica do grupo extrato etanólico ressuspendido em propilenoglicol nos tempos pós-operatório de 7 e 30, respectivamente. (Hematoxilina e Eosina, 10x)

PROPILENOGLICOL + CA(OH)₂ (CONTROLE) – 7 dias

Prevalentemente, foi observado cápsulas fibrosas espessas e a presença de vasos sanguíneos de pequenos diâmetros nessa cápsula.

Quanto ao aspecto celular, observou-se a presença de células mononucleadas, principalmente de linfócitos e macrófagos no tecido de reparo. Em cortes que houve extravasamento, a quantidade de células inflamatórias obteve um escore maior, ou seja, apresentou maior quantidade de células inflamatórias.

Observou-se fibroblastos associados a fibras colágenas, caracterizadas por seu aspecto disperso e desorganizado. Em apenas um espécime pode-se observar uma cápsula fibrosa bem mais condensada e menos espessa em relação ao restante das lâminas (Figura 16).

PROPILENOGLICOL + CA(OH)₂ (CONTROLE) – 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 cápsula de fibras colágenas, com aspecto mais organizado, espesso e bem definido, bem como as fibras se apresentando dispostas paralelamente à área do implante.

O grupo apresentou maior quantidade de fibrócitos, tanto em relação às células inflamatórias, quanto em relação aos fibroblastos. Em geral a camada de macrófagos estava mais discreta e a quantidade de linfócitos e outras células mononucleadas estava bastante diminuída (Figura 17).

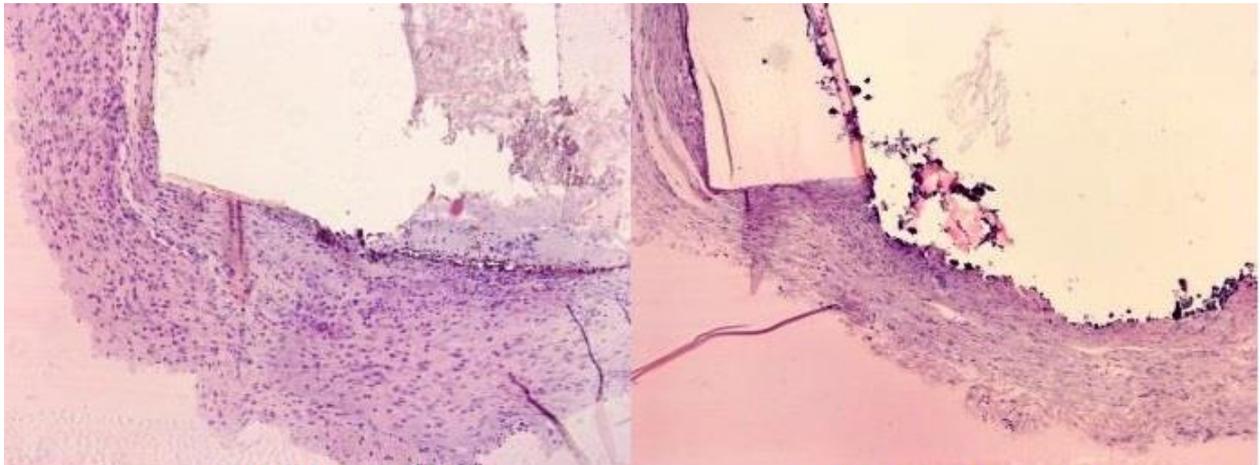


Figura 16 - CONTROLE - 7 DIAS

Figura 17 - CONTROLE - 30 DIAS

Figura 16 e 17– Análise histológica do grupo propilenoglicol + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ nos tempos pós-operatório de 7 e 30, respectivamente. (Hematoxilina e Eosina, 10x)

Avaliação quantitativa da resposta tecidual tardia aos implantes nos períodos experimentais

Os resultados das leituras em microscópio óptico, relativas a quantidade de células inflamatórias (infiltrado inflamatório) e a espessura da cápsula fibrosa foram realizados e submetidos a análise estatística

Realizou-se o teste de Kruskal Wallis para comparação dos grupos experimentais e de Mann Whitney para comparação dois a dois.

Com a análise estatística dos dados verificou-se haver diferença significativa entre o período 7 e 30 dias ($p < 0,01$) favorável ao período de 30 dias.

Não se verificou diferença entre os grupos avaliados dentro dos períodos de 7 dias e 30 dias ($p > 0,05$), apenas entre os períodos. Os resultados estão representados pela tabela 1 e ilustrados no gráfico 1.

Posto médio dos grupos experimentais

Período	7 dias	30 dias
Aquoso	71,9	53,9
Ca(OH) ₂	88,6	62,3
Etanólico	95,8	45,5
Etanólico Ressuspendido	84,7	60,4

Tabela 1 - Médias dos postos das amostras dos grupos experimentais

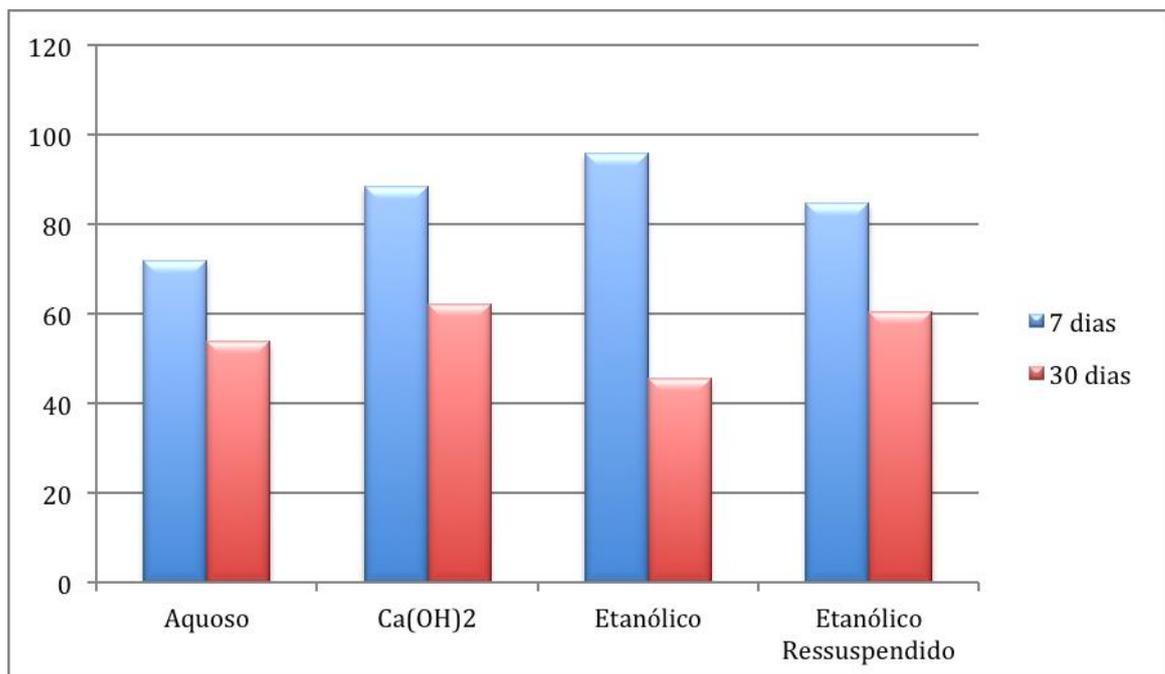


GRÁFICO 1- Representação gráfica dos postos médios atribuídos aos grupos experimentais

5. DISCUSSÃO

5.1 da concepção:

O uso prolongado de plantas medicinais tradicionalmente empregadas por populações humanas cria um pensamento comum de que esses espécimes já foram testados e homologados por sua utilização. Acredita-se que não necessitam, portanto, de avaliação laboratorial por se apresentarem eficazes e sem efeitos colaterais.³³

Entretanto, podemos observar que, apesar de seu grande uso medicinal por sua população, as estimativas mais otimistas citam que menos de 1 % da rica flora que existe em toda zona tropical já foi quimicamente estudada.³⁴

É, tendo conhecimento dessa realidade, que o presente estudo optou por estudar extratos de araquá de forma mais incisiva em função dos resultados favoráveis obtidos em estudos *in vitro* até aqui. Tais estudos evidenciaram a potente atividade antimicrobiana do extrato de araquá,^{15,16,18} bem como algumas evidências de uma resposta positiva do ponto de vista biológico,²⁵ apresentando, dessa forma, características promissoras para a utilização clínica. Faz-se necessário, então, sua avaliação de compatibilidade biológica.

5.2 dos animais:

Atualmente, existe, por parte dos cursos de graduação e de pós-graduação, a preocupação quanto ao seu tempo de duração, e a possibilidade de realizar pesquisas, e obtenção de resultados. Dessa forma, servindo como solução para essa preocupação, o rato, animal escolhido para o atual trabalho, possibilita períodos pós-operatórios mais breves, já que possuem um metabolismo acelerado.

Além disso, os ratos albinos (Linhagem Wistar) já são muito utilizados em experimentos na área médica e odontológica,³⁵ além de serem de fácil obtenção, manuseio e manutenção. São considerados também mais econômicos para a obtenção da biocompatibilidade tecidual. Assim optou-se por trabalhar com ratos albinos machos da linhagem Wistar.

5.3 - da metodologia (análise microscópica):

Costa,³⁶ em 2001, apresentou inúmeras vantagens quanto ao método de implantação subcutânea para avaliar a biocompatibilidade tecidual. Tais vantagens estão em torno da facilidade na execução e na manutenção dos animais, de forma a possibilitar uma amostra maior em curto período de tempo; rapidez no processamento laboratorial, não havendo a necessidade da fase de desmineralização quando não envolve tecido calcificado; e o baixo custo para seu desenvolvimento. Sendo assim, o método de implantação subcutânea foi o escolhido para o presente estudo.

Olsson e colaboradores, em 1981, também realçaram a grande utilização e aceitação do implante em tecido subcutâneo de ratos. Esta avaliação pode ser realizada de diferentes maneiras, como diretamente no tecido,^{37,38} em esponjas cirúrgicas,³⁹ por meio de tubos de dentina humana,^{1,40,41} tubos de teflon^{42, 43} ou utilizando tubos de polietileno.^{1,12,44} Optamos pela implantação de tubos de polietileno, baseados em dados da literatura que demonstram a biocompatibilidade desse material.
1,32, 41,43, 45,46

Makkes et al.,⁴⁷ em 1977, concluíram que a manipulação e implantação dos tubos de polietileno são fáceis, e, elucidaram ainda a vantagem de não apresentarem reação aos tecidos ao redor, e, por serem estáveis, não alteram os materiais acondicionados no seu interior. A essas vantagens, somam-se as características de possuírem certa flexibilidade, o que permite melhor ajuste ao corpo do animal. Os tubos de polietileno foram indicados para este estudo pela não interferência nos princípios ativos do material testado e pela facilidade no seu manuseio.

Quanto aos períodos experimentais, optou-se por períodos de 7 e 30 dias, já que, baseado em estudos feitos por Holland et al. (2002),⁴¹ períodos que excederam os 30 dias se mostraram com resultados semelhantes, indicando que a resposta tecidual se torna praticamente inalterada após esse período.

5.1 dos resultados:

De acordo com os resultados colhidos pela análise histológica dos implantes subcutâneos, observou-se que a resposta tecidual tardia (30 dias), em todos os grupos avaliados, apresentou progresso do reparo em função do tempo, como já se esperava (Gráfico1). Ficando nítido que os materiais implantados não impediram a progressão natural do reparo.

Os escores gerais dos extratos vegetais, quando avaliados desconsiderando a variável tempo, permitiram concluir que estes, aquoso, etanólico e etanólico ressuspendido em propilenoglicol, utilizados como veículo do hidróxido de cálcio, reagiram de forma semelhante ao grupo controle. No período de 07 dias, observaram-se respostas inflamatórias moderadas devidas principalmente, ao trauma causado durante os procedimentos cirúrgicos, próprias do método empregado.

A reação tecidual foi semelhante entre os extratos aquoso, etanólico e etanólico ressuspendido em propilenoglicol, e sem diferença estatística do veículo propilenoglicol (controle). Aos 30 dias, houve um controle do processo inflamatório em todos os grupos avaliados com níveis de inflamação muito pequenos. Desta forma, pode-se verificar que os extratos testados associados ao hidróxido de cálcio, foram bem aceitos pelo organismo, não interferindo ou talvez até beneficiando, a resposta biológica durante o processo de reparo.

6. CONCLUSÃO

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

7. REFERÊNCIAS

1. Gomes-Filho JE, Faria MD, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, Costa MMTM. Mineral Trioxide Aggregate but not Light-cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. Mark Cannon Journal of Endodontics January 2008 Vol. 34, Issue 1, Pages 62-65.
2. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. Scand J Dent Res 1981; 89: 321-8.
3. Sundqvist G. Pathogenicity and virulence of black-pigmented gram-negative anaerobes. FEMS Immunol Med Microbiol 1993; 6:125-37.
4. Faria G. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes decíduos de humanos portadores de necrose pulpar e lesão periapical. Efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora à base de hidróxido de cálcio [dissertação]. Ribeirão Preto: FORP – Univ. de São Paulo; 2001.
5. Pazelli LC, Freitas AC, Ito IY, Souza-Gugelmin MCM, Medeiros AS, Nelson-Filho P. Prevalence of microorganisms in root canals of human deciduous teeth with necrotic pulp and chronic periapical lesions. Pesq Odontol Bras 2003; 17: 367-71.
6. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe-Jr O. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. Braz Dent J 1995; 6:85-90.
7. Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J 1999; 32:361-9.
8. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. Int Endod J 1991; 24:119-25.
9. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod. Dent. Traumatol. 1990; 6: 142-9.
10. Waltimo TMT, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. Int Endod J 1999; 32:421-9.

11. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35:221-8.
12. Gentil M, Pereira JV, Sousa YTCS, Pietro R, Souza Neto MD, Vansan LP, et al. *In Vitro* Evaluation of the Antibacterial Activity of *Arctium lappa* as a Phytotherapeutic Agent used in Intracanal Dressings. *Phytother Res* 2006; 20:184-186.
13. Brighenti FL, Luppens SBI, Delbem ACB, Deng DM, Hoogenkamp MA, Gaetti-Jardim Jr. E, et al.. Effect of *Psidium cattleianum* Leaf Extract on *Streptococcus mutans* Viability, Protein Expression and Acid Production. *Caries Res* 2008; 42: 148- 154.
14. Groppo FC, Bergamaschi C de C, Cogo K, Franz-Montan M, Motta RH, Andrade ED. Use of phytotherapy in dentistry. *Phytother Res* 2008; 22:993-8.
15. 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: FOA - Univ. Estadual Paulista, 2004.
16. Landucci LF. Atividade inibitória de extratos vegetais de plantas do cerrado brasileiro sobre microrganismos bucais [tese]. São José dos Campos: Univ. Estadual Paulista; 2005.
17. Gaetti-Jardim Jr E, Landucci LF, Arafat OKK, Ranieri RV, Ramos MMB, Ciesielski FIN, et al. Antimicrobial activity of six plant extracts from the Brazilian savanna on periodontal pathogens. *Int. J. Odontostomat.* 2011; 5(3):249-256.
18. Sangalli J, Dezan Jr E, Gaetti-Jardim Jr. Antimicrobial activity of six plant extracts from the Brazilian savanna on microbial biofilms [abstract]. *Braz Oral Res* 2009; 23(Suplemento 1):294.
19. Ruvierre DB, Machado AC, Novais RZ, Gaetti Jardim-Junior E, Dezan Jr E. Evaluation of the tissue response to inactivated microorganisms associated with aqueous and hydroalcoholic araçá (*Psidium cattleianum*) solutions. *J Appl Oral Sci* 2009; n. esp.: 432 Abstract 019.

20. Dezan Jr.,E, Sangalli,J., Gomes-Filho,JE and Gaetti-Jardim,E *Psidium cattleianum* plus Ca(OH)₂ antimicrobial efficacy against *Enterococcus faecalis*. USB of Abstracts, Journal of Dental Research, vol. 89, Special Issue B.
21. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005, Geneva: WHO; 2002.
22. Lozoya X, Meckes M, Aboud- Zaid M, et al. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of spasmolytic principle. Arch Med Res 1994; 25:11-15.
23. Jaiarj P, Khoohaswan P, Wongkrajang Y, et al. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. J Ethnopharmacol 1999; 67:203-212.
24. Menezes TEC de, Delbem ACB, Brighenti FL, Okamoto AC, Gaetti-Jardim Jr E. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. Pharmaceutical Biology [serial online] 2010; 48:300-305.
25. Novaes RZ. Avaliação da resposta tecidual dos extratos vegetais aquoso e etanólico de araçá (*Psidium cattleianum*) pela análise edemogênica e morfológica em ratos [dissertação]. Araçatuba: FOA - Univ. Estadual Paulista, 2008.
26. Matos FJA. Farmácias vivas. Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267p.
27. Navarro DF, Santos EAT, Rocha JCF, Bremm LL, Jukoski M, Ribeiro PG, Kozlowski 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.
28. ISO 10993-6 Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation. 2007.
29. Machado AC, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Ruvierre DB, Zoccal R, et al. Evaluation of tissue reaction to Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) extracts: a histologic and edemogenic study. J. Appl. Oral Sci. 2012;20(4):414-8

30. 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.

31. 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.

32. 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.

33. Volpato GT et al Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. *Rev Bras Pl Med* 2002; 04: 35-45.

34. Vieira RF, Martins MVM. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. *Rev Bras Plantas Med* 2000; 3(1):13-36.

35. Gallottini MHC. Influência da pasta composta por Rifocort, iodofórmio e paramonoclorofenol canforado na reparação alveolar: estudo morfológico em ratos. 1989. 72f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

36. Costa CAS. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2001.

37. 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.

38. 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.

39. Binnie WH, Mitchell DF. Induced calcification in the subdermal tissues of the rat. *J Dent Res* 1973;52(5):1087-91.

40. 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.

41. 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.
42. 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.
43. Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981;7(8):355-67.
44. 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.
45. 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.
46. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967;24(5):674-83.
47. Makkes SK et al Polyethylene tubes as a model for the root canal. *Oral Surg* 1977; 44: 293-300.