Alessandra **C**ury **M**achado

Avaliação da resposta tecidual dos extratos vegetal aquoso e hidroalcoólico de Aroeira (*Astronium urundeuva*) pela análise edemogênica e histopatológica em rato

Araçatuba-sp
2009

Alessandra **C**ury **M**achado

Avaliação da resposta tecidual dos extratos vegetal aquoso e hidroalcoólico de Aroeira (*Astronium urundeuva*) pela análise edemogênica e histopatológica em rato

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

Orientador: Prof. Dr. Eloi Dezan Junior
Co-orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Jr.

Araçatuba-sp
2009

Catalogação-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Machado, Alessandra Cury

M149a Avaliação da resposta tecidual dos extratos vegetais aquoso e hidroalcoólico de aroeira (Astronium urundeuva) pela análise edemogênica e histopatológica em ratos / Alessandra Cury Machado. - Araçatuba : [s.n.], 2008

77 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2008

Orientador: Prof. Dr. Elói Dezan Júnior

Co-orientador: Prof. Élerson Gatti Jardim Júnior

1. Teste de biocompatibilidade 2. Inflamação 3. Edema 4. Extratos vegetais 5. Plantas medicinais

Black D27

CDD 617.645

DADOS CURRICULARES

Alessandra Cury Machado

Nascimento	05.05.1978- Genebra-Suiça
Filiação	João Machado Júnior Fátima Cury Machado
1998-2004	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade do Sagrado Coração –USC
2006-2007	Curso de Aperfeiçoamento em Odontopediatria pela Associação Paulista de Cirurgião Dentista de Bauru-APCD
2008	Curso de Difusão Cultural em Endodontia na Universidade Estadual Paulista“Júlio de Mesquita Filho”-UNESP
Associações	CROSP- Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO-Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

OFERECIMENTO E AGRADECIMENTO

Ofereço a VOCÊ que nos momentos mais difíceis nunca me abandonou.

Quando não acreditava mais, VOCÊ me deu a fé.

Quando achava que não tinha mais forças para suportar, VOCÊ soube como me mostrar que sou mais forte do que imaginava.

Quando estive triste VOCÊ foi quem enxugou minhas lágrimas e soube me fazer sorrir novamente.

Quando me sentia sozinha e desamparada VOCÊ foi quem me fez companhia.

Quando me sentia sem rumo, VOCÊ foi quem me mostrou o caminho.

Nesse mundo de provações, VOCÊ foi quem me ensinou que a vida é uma escola e VOCÊ o único mestre.

JESUS CRISTO,

Agradeço por fazer da minha vida uma missão de amor da minha profissão para aqueles que precisam. Agradeço por ter chegado até aqui.

Agradeço de coração...sempre!

ALESSANDRA CURY MACHADO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

João Machado Júnior e **Fátima Cury Machado** que me apoiaram desde o começo da minha carreira, me incentivando nos momentos mais difíceis do meu caminho, e, me mostrando que sempre se deve continuar, mesmo nas dificuldades e nos obstáculos. Obrigada por vocês serem esses pais maravilhosos e especiais! Estou aqui graças aos seus esforços. Amo vocês!

Aos meus irmãos,

Luis Fernando Cury Machado, Pedro Henrique Cury Machado, Thiago Cury Machado que são pessoas muito especiais na minha vida. Em cada fase de nossas vidas nos tornamos ainda mais fortalecidos e mais unidos uns pelos outros. Obrigada por nossa união e crescimento e por terem me ajudado no período em que mais precisei. Agradeço a Deus por ter colocado em meu caminho irmãos maravilhosos. Amo vocês!!!

À minha sobrinha,

Maria Eduarda dos Santos Machado por ser essa criança especial e iluminada e fazer parte da nossa família preenchendo nossos dias de felicidade e amor!

Aos parentes

André Artin Machado, Cristina da Costa Cury, Giulia Pontes, José Assad Cury Neto, Karina Machado, Maria Mônica dos Santos, Valdeneia Pontes eu dedico também por estarem presentes durante essa minha caminhada.

À minha tia bióloga pesquisadora Drª Maria Ângela Machado de Carvalho que me sugeriu alguns pontos em que poderia melhorar na minha dissertação. Agradeço por tudo! Você é o meu exemplo a seguir!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador,

Éloi Dezan Júnior que me orientou e me abriu caminhos mostrando que não existem limites para aprender me ensinando que é preciso buscar a todo instante o aprendizado de forma criativa e única. Você é um exemplo de professor diferenciado nos dias de hoje. Criativo e dinâmico. Obrigada pelas oportunidades. Obrigada por tudo que aprendi com você!

Ao meu co-orientador,

Élerson Gaetti Jardim Júnior

"A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que se gosta, mas gostar daquilo que se faz". -Leonardo da Vinci

Aos Amigos,

Maria Herminia e Aparecido Janone pelo apoio, amizade e carinho nesses últimos seis anos da minha vida.

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha,

é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.

Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só,

porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.

Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova

de que as pessoas não se encontram por acaso"

- Saint Exupéry-

À Amiga (em Memória),

Regina Maura Protti que Deus lhe tenha nos braços com o mesmo amor com que você demonstrava aos que precisavam. Você é um espírito de Força que enfrentou e lutou pela vida. Agradeço a você por ter me acolhido como filha em sua casa, e por ter me mostrado que a vida tem de ser vivida intensamente e com muita alegria. A você só tenho agradecimentos e torço para que você esteja sempre na paz de Deus! Sempre...! Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos,

Adriane Zambonato, Elisabeth Keine, Carla Damante, Collis Cristine, Ednéia Carvalho, Elisângela do Nascimento, Juliana Angerami, Leciane Paula de Angelis Messias, Letícia Menezes, Marcos Albino Rodrigues, Maria Carolina Sakuma, Simone Watanabe, Sônia de Siqueira, Talita Ribeiro, Tamara Damásio agradeço pela amizade verdadeira e pela lealdade a qual vocês têm a mim. Obrigada por fazerem do meu caminho mais luz e aprendizado.

Às amigas

que tiveram presentes durante esses dois anos, Leciane Paula de Angelis Messias e Simone Watanabe, agradeço. Na vida encontramos pessoas especiais e amigas que nunca nos deixam nos momentos em que precisamos. Pessoas que Deus nos envia para fazer das dificuldades mais leves. Vocês são amigas assim que souberam ser verdadeiras. Obrigada pela convivência e por toda a ajuda que vocês me ofereceram.

"Pode ser que um dia deixemos de nos falar...
Mas, enquanto houver amizade,
Faremos as pazes de novo.

Pode ser que um dia o tempo passe...
Mas, se a amizade permanecer,
Um de outro se há-de lembrar.

Pode ser que um dia nos afastemos...
Mas, se formos amigos de verdade,
A amizade nos reaproximará.

Pode ser que um dia não mais existamos...
Mas, se ainda sobrar amizade,
Nasceremos de novo, um para o outro.

Pode ser que um dia tudo acabe...
Mas, com a amizade construiremos tudo novamente,
Cada vez de forma diferente.
Sendo único e inesquecível cada momento
Que juntos viveremos e nos lembraremos para sempre.

Há duas formas para viver a sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre."

Albert Einstein

Às Amizades

que fiz durante esses dois anos em que estive cursando o Mestrado em Araçatuba : Ana Luiza di Bella, André Veronese, Cristiane Kaneco, Carol Vital, Daniela Oliveira, Isabelle R. Freire, Janaina Z. Silva, Jorgiana Sangalli, Karina Mirella, Laize Ramalho, Lílian Costa, Luciana Garcia, Marcelo J. Moretto, Marli de Angeli, Max D. Faria, Natalia Manrick, Natalia Póla, Pamella Izza, Renato Hopp, Sueli S. Murata, Tatyana de S. Pereira, Vanessa Santos agradeço o convívio que me deixou experiências boas que guardarei e levarei por toda minha vida.

Ao meu Grupo de Pesquisa

Denise Belúcio Ruviére e Renata Zoccal Novais ao qual eu participei e pelo trabalho em equipe que fizemos que originasse o trabalho de cada uma. Agradeço pela dedicação, paciência e atenção.

Aos Professores do Departamento de Odontologia Infantil e Social

Alberto Delbem, Célio Percinoto, Robson Frederico Cunha, Rosangela Santos Nery, Sandra Maria Herondina C. Ávila Aguiar por serem uma eterna fonte do saber e se mostrarem doutores voltados para o ensino e à pesquisa. Meus agradecimentos pela oportunidade de conhecimento que me proporcionaram e pelo incentivo.

Aos Funcionários do Departamento de Odontologia Infantil e Social

Maria e Mário por estarem sempre ajudando nas clínicas do bebê na FOA e das clínicas de odontopediatria no Campos com dedicação e nos auxiliando em tudo que precisamos durante nossas pesquisas.

Aos Professores do Departamento de Odontologia Restauradora

da disciplina de Endodontia: Elói Dezan Júnior, João Eduardo Gomes Filho, José A. Otobone Filho, Mauro Juvenal Nery, Roberto Holland, Pedro Felício Estrada Barnabé por terem me recebido no departamento e me apoiado no desenvolvimento de minha pesquisa. Agradeço também pelo auxílio no curso de "Difusão Cultural em Endodontia" do qual participei junto a vocês.

Aos Funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora

do laboratório de Endodontia: Alexandrina Maria Pereira, Grazielle Lourenço Dourado, Hermelinda de Jesus Pereira Brefore, Magda Requena, Neuci Vieira, Neusa Angélica dos Santos agradeço pela atenção e pelo carinho com que conduzem seus trabalhos e a dedicação que tiveram comigo no desenvolvimento laboratorial da minha pesquisa. Obrigada pelo incentivo grande que vocês me deram, muitas vezes acompanhado por palavras de conforto nas dificuldades. Obrigada por tudo! Vocês são muito especiais pra mim!

Ao Professor do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica

Prof. Dr. Ronaldo Maia Melhado meus sinceros agradecimentos no auxilio durante a análise da descrição dos resultados das lâminas. Obrigada pela atenção e paciência!

Aos serviços da Biblioteca

Agradeço Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti pela atenção e ajuda na correção da formatação de meu trabalho. Obrigada por tudo!

Aos Funcionários da Pós- Graduação

Diogo Reatto, Marina Midori Sakamoto Kawagoe e Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto que sempre muito atenciosos souberam conduzir seu trabalho com dedicação e amor durante esse período em que precisei de suas orientações. Agradeço por tudo!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP,

Faculdade de Odontologia de Araçatuba que foi nesses dois anos meu porto seguro do saber e por ser uma universidade que me acolheu e me mostrou o quanto se aprende quando se quer de verdade descobrir novos horizontes. A Ciência e o Ensino são as formas que o ser humano mais precisa para avistar ao longe, sendo assim, a Universidade é a porta de entrada para tudo isso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES,

pela concessão de bolsa de estudo para minha pesquisa.

EPÍGRAFE

CIÊNCIA E AMOR

A ciência pode estar cheia de poder, mas só o amor beneficia. A ciência, em todas as épocas, conseguiu inúmeras expressões evolutivas. Mas para essa mesma ciência pouco importa que o homem lhe use os frutos para o bem ou para o mal. Não compreende o desinteresse, nem as finalidades santas.
O amor, porém, aproxima-se de seus labores e retira-os, conferindo-lhe a consciência do bem. Ensina que cada máquina deve servir como utilidade divina, no caminho dos homens para Deus, que somente se deveria transmitir a palavra edificante como dádiva do Altíssimo, que apenas seria justa a publicação de raciocínios elevados para o esforço redentor das criaturas. Se a ciência descobre explosiva, esclarece o amor, quanto à utilização deles na abertura de estradas que liguem os povos; se a primeira confecciona um livro, ensina o segundo, como gravar a verdade consoladora.
O mundo permanece em obscuridade e sofrimento, porque a ciência foi assalariada pelo ódio, que aniquila e perverte, e só alcançará o porto de segurança quando se render plenamente ao amor de Jesus Cristo!

Francisco Cândido Xavier

Machado AC. Avaliação da resposta tecidual dos extratos vegetais aquoso e hidroalcoólico de aroeira (*Astronium urundeuva)* pela análise edemogênica e histopatológica em rato [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia-Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Faculdade de Odontologia; 2009.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a compatibilidade biológica do extrato aquoso e hidroalcoólico de folhas da planta Aroeira do Sertão (*Astronium urundeuva*) empregando-se o teste edemogênico e implantes em subcutâneo de rato. Utilizou-se 48 ratos machos wistar com peso aproximado de 250g. Para quantificação do edema, 18 animais anestesiados, receberam injeção intravenosa de Azul de Evans a 1% (0,2 mg/kg). Após 30 minutos, foram injetados 0,1 mL do extrato e solução fisiológico na região dorsal do animal. Os ratos foram sacrificados após 3 e 6 horas. As peças obtidas foram colocadas em formamida por 72 horas em estufa a 45ºC. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm. Para a implantação no subcutâneo do rato (reação tardia), 30 ratos receberam implantes de tubos de polietileno contendo os extratos na região dorsal sendo posteriormente sacrificados após 7 e 28 dias para remoção das peças. As peças foram processadas, cortadas e coradas com Hematoxilina e Eosina. Os resultados foram obtidos pela leitura dos espécimes em microscópio óptico, em aumentos de 10 e 40x, para avaliação da espessura da cápsula fibrosa e quantificação do infiltrado inflamatório. Não foi observada diferença significante ($p>0,05$) na quantificação de edema dos diferentes grupos nos tempos operatórios, mas verificou-se haver diferença significante ($p<0,05$) entre as soluções analisadas, independente do tempo de estudo. A solução hidroalcoólica apresentou maior edema que a solução de aroeira aquosa e solução fisiológica. Foi apontado resultados semelhantes no período de 7 dias para os três grupos experimentais. Para o período de 28 dias, houve redução acentuada do número de células inflamatórias para a solução fisiológica e extrato aquoso.

Palavras-chave: Teste de materiais. Inflamação. Edema. Extratos vegetais. Plantas medicinais.

Machado A.C.Evaluation of the tissue response to the aqueous and hydroalcoholic extract of Aroeira (*Astronium urundeuva)* according to endemogenic and morphological analysis in rats.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate submucous tissue response to the extract of Aroeira's leaf employing the endemogenic analysis and implants in rats. The test groups consisted of aqueous and hydroalcoholic Aroeira's extracts and the control group consisted of physiological saline. Forty eight male Wistar rats weighing 250g were selected. For the edema quantification, 18 animals under anesthesia received intravenous injection of 1% Evans Blue (0,2mg/Kg). After 30 minutes, the extracts (0,1ml) and the physiological saline were injected on the rats' dorsum. The animals were killed after 3 and 6 hours. The samples were put in formamide for 72h in heater at 45°. The readings were realized in spectrophotometer with 630nm wavelength. For the submucous implantation, 30 rats received a polyethylene tube containing the extracts on their dorsum. The animals were killed after 7 and 28 days. The samples were processed for histological analysis and evaluated in optical microscope (10x and 40x original augmentation). The fiber capsule thickness was measured and the inflammatory infiltrate was quantified. The Two-way ANOVA, Mann-Whitney and Kruskall-Wallis tests were used for statistical analysis with a 95% confidence interval. There were no statistical significant differences ($P>0.05$) between groups in relation to edema quantification in the different periods. There were significant differences ($P<0.05$) between the solutions analyzed independent of the time period. The hydroalcoholic solution resulted in more edema than the aqueous and saline solutions. Similar results were found on the 7-day period for the 3 groups. On the 28-day period there was a notable reduction on inflammatory cell number for the saline and aqueous extract groups.

Key words: Inflammation; Edema; Medicinal plants; Material testing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Procedimentos cirúrgicos da Análise Edemogênica. 33,34

Figura 2- Procedimentos cirúrgicos da Análise Microscópica. 35,36

Figura 3- Grupo Soro fisiológico. 44,45,46,47

Figura 4- Grupo Extrato de Aroeira Aquoso. 48,49,50,51

Figura 5- Grupo Extrato de Aroeira Hidroalcoólico. 52,53,54,55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 41

Gráfico 1A- Representação gráfica do valor médio do edema ocorrido nos tempos operatórios de 3 e 6 horas
Gráfico 1B- Representação gráfica do valor médio do edema ocorrido nos grupos avaliados (aquoso, hidroalcoólico e soro)
Gráfico 1C- Representação gráfica do valor médio do edema nos dois tempos estudados para os três grupos avaliados.

Gráfico 2 58

Gráfico 2A- Representação gráfica da influência dos tempos pós-operatório nos resultados obtidos independentemente do grupo implantado.
Gráfico 2B- Representação gráfica da influência dos grupos analisados nos resultados obtidos, independentemente do tempo pós-operatório.
Gráfico 2C- Representação gráfica dos postos médios atribuídos aos grupos experimentais em função dos tempos operatórios.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores da intensidade do exsudato inflamatório induzido pela inoculação das soluções experimentais, obtidos em densidade óptica (D.O) 38

Tabela 2- Marcação dos escores atribuídos aos eventos histológicos observados na análise microscópica dos grupos experimentais em função do tempo. 24

Tabela 3-.Solução X Período Experimental- Médias dos postos das amostras: 41

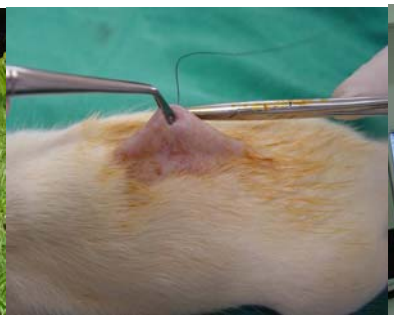
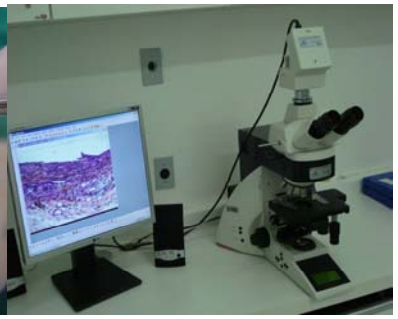
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Símbolos	**Descritivo**
cm	centímetro
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
&	e
et al	e colaboradores
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
°C	Grau Celsius
HE	Hematoxilina e Eosina
=	igual
Lab	Laboratório
+	mais
>	maior
®	marca registrada
<	menor
µm	micrometro
mm	milímetro
ug/ mL	micrograma por mililitro
mg/ kg	miligrama por quilograma
mL	mililitro
min.	minutos
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	nível de significância
nº	número
OMS	Organização Mundial de Saúde
%	porcentagem
SJRP	São José do Rio Preto
Unesp	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
x	vezes

SUMÁRIO

1	Introdução.	18
2	Proposição.	24
3	Materiais e Métodos.	26
3.1	Preparo dos extratos vegetais.	26
3.2	Animais.	28
3.3	Teste Edemogênico- Reação Imediata	28
3.4	Implante em tecido subcutâneo de ratos - reação tardia	30
3.5	Análise Estatística	32
4	Resultados.	38
4.1	Análise Edemogênica.	38
4.2	Análise Microscópica.	42
5	Discussão.	60
5.1	Da Concepção.	60
5.2	Da Metodologia	61
5.3	Dos Resultados.	63
6	Conclusão	66
	Referências.	68
	Anexos	74

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O homem busca, desde tempos remotos, a cura ou o alívio das doenças com o uso das plantas medicinais. O conhecimento passado de geração para geração, no decorrer do tempo, é responsável pela medicina popular. Atualmente, diversos fitoconstituintes já são conhecidos e estudados em modelos experimentais para entendimento de suas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* (CATÃO et al., 2006).

Apesar do estudo das plantas medicinais ter surgido no século passado, acredita-se que a utilização das plantas como medicamento seja tão antiga quanto à própria humanidade (DI STASI, 1996; LORENZI, 2002; MARTINS et al., 2003; VOLPATO et al*.,* 2002). O uso de recursos naturais por populações 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 natureza próxima (CASTELLUCCI et al., 2000). Numerosas etapas marcaram essa evolução da arte de curar, porém, torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve por muito tempo associada às práticas mágicas, místicas e ritualísticas (CORDEIRO et al., 1996).

De acordo com Castro e Ferreira (2001), a medicina indígena é um processo mágico-religioso, onde o pajé, médico-feiticeiro, recorre à aplicação tópica ou oral das plantas, desenvolvendo paralelamente procedimentos ritualísticos. O pajé não atua sozinho, mas em estreita conexão com seus guias espirituais e as fontes de energia da natureza (água, mata, pedra). Os autores ainda afirmam que a relação entre os conhecimentos popular e os conhecimentos científicos, no que se refere ao uso das plantas medicinais, pode ser enquadrada dentro da visão dialética, que prevê a transformação e a evolução das idéias. O conhecimento popular por um lado, associado com práticas mágicas e religiosas, leva aos questionamentos na tentativa de se compreender com mais racionalidade o método terapêutico. Por outro lado, o conhecimento científico estabelece uma relação racional entre o uso das plantas medicinais e a cura das doenças. A síntese entre esses dois pontos de vista é alcançada quando os pesquisadores, em busca de novas fontes de substâncias biologicamente ativas, vão até a população para efetuarem levantamentos etnobotânicos e, a partir destes, realizarem pesquisas laboratoriais.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Isso porque o custo é menor que os fármacos alopáticos (WHO, 1998). A OMS ainda estimula e recomenda o uso daquelas plantas que tiverem comprovado eficácia e segurança terapêuticas e desenvolvimento de programas que permitam cultivar e utilizar as espécies vegetais na forma de preparações dotadas de eficácia, segurança e qualidade (LORENZI; MATOS, 2002). Assim, as plantas medicinais seriam a maior e melhor fonte de obtenção de fármacos para a humanidade (SANTOS et al., 1995).

A busca de novos medicamentos a partir de plantas é, hoje, a esperança mais concreta para pacientes que possuem doenças graves, como exemplo principal, o câncer e a Aids. A indústria farmacêutica chega a gastar em torno de 250 milhões de dólares e 10 anos de trabalho na pesquisa de uma nova droga (CASTRO; FERREIRA, 2001).

Existe a idéia, na população em geral, que as ervas medicinais e outros produtos naturais como recursos farmacológicos eficientes no tratamento de patologias bucais, não causam efeitos colaterais (VIEIRA; MARTINS, 2000). Muitas plantas apresentam toxicidade se usadas incorretamente ou com alta concentração na dosagem. De acordo com Mutti (1999), *Ruta chalepensis, Eucalyptus, Ricinus communis e Brugmansia arbórea* são exemplos de plantas tóxicas.

Planta medicinal é aquela que contém um ou mais de um princípio ativo que lhe confere atividade terapêutica. Nem sempre os princípios ativos de uma planta são conhecidos, mas mesmo assim ela pode apresentar atividade medicinal satisfatória e ser usada desde que não apresente efeito tóxico. Dentre os efeitos benéficos de compostos vegetais, encontram-se aqueles relacionados à saúde bucal, de relevante importância para os cirurgiões-dentistas.. Muitos estudos estão sendo feitos com o objetivo de pesquisar plantas com atividades antimicrobiana, antibacteriana e adstringente para que possam combater a cárie e a doença periodontal. No Japão, extrai-se do chá verde, amplamente consumido pelos japoneses, um polifenol chamado tânina, substância que tem um efeito bactericida contra o *S. mutans,* bactéria causadora da cárie (OTAKE et al., 1991; SAKANAKA et al., 1989).

A arnica também tem sido usada há milhares de anos na medicina popular. Suas atividades biológicas comprovadas são antiinflamatória, antifúngica e antiviral. A *arnica montana* é uma planta herbácea e perene com hábito rastejante cujo extrato possui atividades citotóxicas. A atividade antimicrobiana da Arnica não foi investigada (KOO et. al., 2000).

Destaca-se no vasto contexto etnográfico mundial, a utilização da romã, fruto da *Punica granatum L*. para o tratamento de processos infecciosos internos ou externos (CATÃO et al., 2006). A casca do caule é empregada como vermífugo, em especial contra tênias, do fruto são utilizadas as cascas dessecadas ou frescas para o tratamento de diarréias, infecções de pele e mucosas, e as sementes frescas, com seus envoltórios rosados e suculentos, para as afecções da boca e garganta (CATÃO et al, 2006; MATOS, 2002).

Alguns produtos medicinais com propriedades terapêuticas já se encontram no mercado. É o caso da *Calendula officinalis L*. e da *Casearia sylvestris Sw*. que destacam-se como dentifrícios com poder antiinflamatório, antimicrobiano e cicatrizante (ARANTES et al., 2005).

Em 2005, Landucci afirmou que, com relação à Máxima Diluição Inibitória (MDI), as diluições inibitórias maiores foram detectadas para o extrato da folha de araçá (*P. cattleianum*), tanto na forma hidroalcoólica quanto na forma aquosa, e as menores para a casca de louro-de-mato-grosso (*C.glabrata*) em ambas as formas de apresentação. Os resultados desses estudos sugerem que os extratos aquosos e hidroalcoólico de plantas nativas presentes no Cerrado do Brasil podem exercer uma ação inibitória sobre cocos cariogênicos *in vitro*, evidenciando a necessidade de estudos em modelos animais para se avaliar a eficácia dos mesmos *in vivo.* A segurança de seu emprego clínico, associado a um maior conhecimento dos princípios ativos, poderia colaborar para um futuro emprego em ensaios clínicos (BIANCO, 2004; NOVAIS, 2008). Landucci (2005) também concluiu que os extratos de aroeira, araçá, candeia, jacarandá e guajuvira foram os que mais afetaram a adesão microbiana de *S .mutans* e a maioria dos extratos não inibiu a capacidade hemaglutinante de *F .nucleatum*.

Mesmo após a escolha da planta medicinal a ser estudada, deve-se observar, que o vegetal oferece algumas dificuldades na uniformidade e estabilidade do produto a ser utilizado. 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 (VOLPATO et al., 2002). Portanto, no presente estudo, foram retirados folhas, caules e cascas de caule de um único exemplar de coleta única (LANDUCCI et al., 2004).

Novais (2008) comprovou a biocompatibilidade dos extratos aquoso e hidroalcoólico de araçá, e observou que, em geral, o edema se apresentou constante com o

tempo, porém o extrato hidroalcoólico apresentou edema inicial maior com decréscimo no período final, tornando-se semelhante às outras soluções estudadas. Já o extrato de araçá aquoso, aos 7 dias, apresentou menor inflamação e o extrato hidroalcoólico apresentou o maior reparo biológico aos 28 dias.

Outro estudo feito com o araçá foi realizado por Ruviére (2008), em que o soro, extrato de araçá aquoso e hidroalcoólico foram associados a bactérias anaeróbicas e facultativas inativadas no subcutâneo de rato, com o intuito de avaliar a resposta tecidual por meio da análise edemogênica e microscópica. Observou que o extrato aquoso apresentou-se ligeiramente melhor, causando menor edema, seguido do grupo controle e do extrato hidroalcoólico que apresentou o maior edema inicial. Tanto o grupo controle quanto aquoso apresentaram ligeiro aumento do edema no decorrer do tempo, enquanto que o extrato hidroalcoólico apresentou decréscimo. O processo de reparo se conduziu de forma esperada no decorrer do tempo, evidenciando que os extratos ou o soro acrescido da solução de microorganismos inativos, não foram capazes de exercer influência negativa.

A espécie *Astronium urundeuva*, é conhecida pelos nomes populares de urundeuva, aroeira, aroeira-do-sertão, aroeira-do-campo, aroeira-da-serra, urindeúva e arindeúva. Essa planta apresenta as seguintes características morfológicas: altura de seis a quatorze metros no cerrado e caatinga e até 25 metros em solos mais férteis da floresta latifoliada semidecídua, com tronco de 58 centímetros de diâmetro. São encontradas nos Estados do Ceará até o Paraná e Mato Grosso do Sul. É mais freqüente no nordeste do país, oeste dos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo e sul dos estados do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (LORENZI; MATOS, 2002). decorrer do tempo, evidenciando que os extratos ou o soro acrescido da solução de microorganismos inativos, não foram capazes de exercer nenhuma influência negativa.

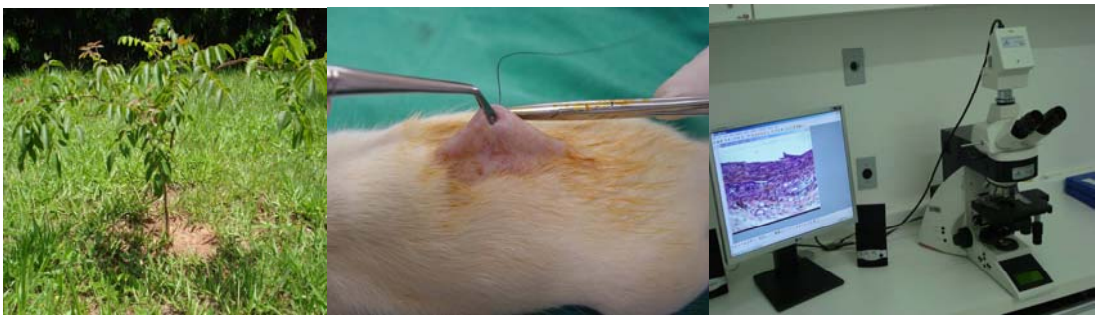
A madeira da aroeira é muito pesada com densidade de 1,19g/cm3, de grande resistência mecânica e praticamente imputrescível. Floresce durante os meses de junho e julho, geralmente com a planta totalmente despida da sua folhagem. A maturação completa dos frutos inicia-se no mês de setembro, prolongando-se até outubro. A madeira é excelente para obras externas, como postes, moirões, esteios, estacas, dormentes, vigas e armações de pontes, moendas de engenho. Na construção civil podeser utilizada como caibros, vigas, tacos para assoalhos e ripas para peças torneadas. A árvore é indicada para arborização em geral

pela beleza de sua copa aproximadamente piramidal e, por outras qualidades ornamentais. Seu único inconveniente é a perda de folhas no inverno e as reações alérgicas que causa em certas pessoas que entram em contato com a planta (LORENZI; MATOS, 2002).

Estudo anterior de Landucci (2005) demonstra que os extratos de aroeira hidroalcoólico apresentaram atividade inibitória frente a todos os microorganismos testados e foram capazes de inibir a adesão microbiana de forma significante. Sendo oúnicotrabalho encontrado.

Na literatura científica há a necessidade de aprofundamento científico *in vitro* e *in vivo* para possibilitar, no futuro, o uso do princípio ativo do extrato da aroeira como antimicrobiano no tratamento odontológico.

PROPOSIÇÃO

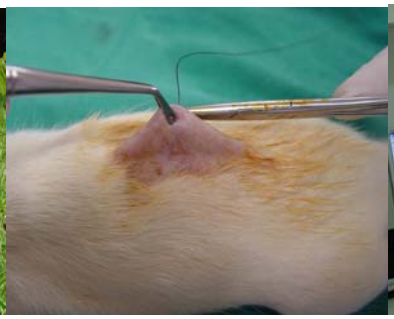
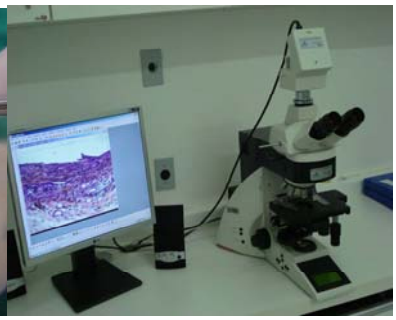


2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta biológica imediata e tardia às soluções preparadas à base de extratos vegetais aquoso e hidroalcoólico de aroeira e compará-las com o soro fisiológico, por meio de:

- Análise edemogênica, quantificando o edema.
- Análises morfológicas, avaliando a resposta tecidual frente aos implantes subcutâneos em ratos.

MATERIAl E MÉTODOS

3 MATERIAl E MÉTODOS

Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação da Comissão de Ética na Experimentação Animal, sendo aprovado (CEEA-FOA/UNESP – Processo n º 2007-008938) (Anexo A).

3.1 Preparo dos extratos vegetais

As plantas foram coletadas em áreas não desmatadas e mantidas como reserva permanente em propriedades rurais do município de Carolina, extremo sul do Estado do Maranhão, onde estão alguns dos maiores e mais bem preservados remanescentes do Cerrado. O período da coleta correspondeu ao período chuvoso na região (dezembro a fevereiro).

3.1.a Das folhas

As folhas de aroeira utilizadas no preparo dos extratos foram colhidas de plantas com aspecto sadio e bom desenvolvimento, sem sinais de envelhecimento, doenças e pragas, em pequenos pedaços no período chuvoso. Antes de retirá-las, foi realizada uma leve raspagem para remover a superfície impregnada com poeira e insetos. As folhas foram, em seguida, lavadas em água corrente e colocadas para secar inicialmente em locais ventilados à temperatura ambiente (média de 27°C), seguida pela secagem em estufa a temperatura controlada de 37°C, até que se apresentassem secas e quebradiças. Os extratos hidroalcoólico e aquoso foram preparados de acordo com a metodologia empregada por Novais (2008) e Ruviére (2008).

3.1.b Preparo dos extratos hidroalcoólicos

As folhas coletadas passaram pela etapa de fragmentação, que consiste na divisão em partículas grosseiras, com tamanho homogêneo, por meio de trituração manual. Cada espécime fragmentado foi transferido para frascos âmbar (500 mL) identificados. Foram utilizadas 20 gramas da espécie vegetal. Posteriormente, foi adicionado 250 mL de etanol 80%. O frasco foi agitado vigorosa e manualmente durante três minutos. Essa operação foi realizada cinco vezes ao dia durante 12 dias, a fim de assegurar a adequada extração dos princípios ativos da planta.

Finalmente, foi realizada a filtragem das preparações com o uso de filtros de papel. O produto resultante foi então transferido a frascos âmbar (100 mL), de forma a obter-se um mínimo de 25 mL. A seguir, os extratos foram esterilizados por filtração em membranas de éster de celulose de 0,22 μm (Millipore) e armazenados em frascos âmbar esterilizado.

3.1.c Preparo dos extratos aquosos

Vinte gramas de folhas trituradas da planta foram adicionadas a 250 mL de água destilada e mantidas a 100ºC por 5 minutos, a 55ºC por 1 hora e em temperatura ambiente por 72 horas. Cada mistura foi agitada a cada 24 horas. A seguir, foram realizadas as etapas de filtração e esterilização, de modo semelhante ao anteriormente descrito.

3.2 Animais

Para a realização os experimentos foram utilizados 48 ratos machos, Wistar (*Rattus norvegiccus*), que foram padronizados quanto à saúde, com idade de 2 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 AS, Brasil) e água *ad libitum*.

3.3 Teste edemogênico-reação imediata

Para a quantificação do edema proporcionada pelo extrato vegetal, utilizou-se a metodologia descrita por Taveira (1988). Foram empregados 18 (dezoito) animais, em grupos de 03 (três) para cada período experimental (3 e 6 horas) e para cada extrato utilizado.

3.3.a Procedimentos cirúrgicos

Para a realização da intervenção cirúrgica, os animais foram submetidos à anestesia geral com xilazina (Coopazine-Coopers), na proporção de 25 mg/kg e quetamina (Vetaset-Fort Dodge), 50 mg/kg misturados na mesma seringa, via intramuscular (parte posterior da coxa do animal).

A seguir, os animais receberam na veia peniana a injeção de azul de Evans a 1 % (Evans Blue Difco Lab.) aplicada com seringa de insulina na proporção de 0,2 mL da solução para 100 g de massa corporal (Fig.1-A).

Após 30 minutos de injeção do corante, os animais receberam no tecido conjuntivo da região dorsal, com auxilio de seringas hipodérmicas de 1mL e agulhas 13 x 0,3 descartáveis, 0,1 ml do extrato ou solução fisiológica (Fig. 1-B). Em cada animal foi injetado apenas um material na região dorsal, tendo a linha média como referência e próximo à região caudal.

Decorridos os períodos experimentais de 3 e 6 horas, os animais foram mortos por inalação de halotano.

Foi realizada a tricotomia manual da região dorsal do animal, evidenciando a área de edema, representado por um halo de coloração azul (Fig. 1-C e D). Com o auxilio de uma tesoura foi removida a pele do dorso do animal , com uma margem de segurança (Fig. 1-E). A padronização das peças removidas foi realizada por meio de um vazador de ferro com 23 mm de diâmetro contendo a região de edema no centro da peça (Fig. 1-G, H). As peças foram picotadas (Fig. 1-I) e colocadas em frascos contendo 4 mL de formamida (Fig. 1-J) (Vetec-Química-RJ-Brasil), permanecendo em estufa a 45ºC por 72 h para extração do corante (Fig. 1-K), pela dissolução do tecido.

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.

A leitura do filtrado foi realizada em um espectrofotômetro Cary 50 Bio (Varian) (Fig. 1-L), utilizando comprimento de onda de 630 nm, correspondente ao pico de absorção do corante. Os dados obtidos foram tabelados e submetidos à análise estatística.

3.4 Implante em tecido subcutâneo de ratos - reação tardia

Para esta etapa foram utilizados 05 ratos para cada grupo experimental (aroeira aquoso, aroeira hidroalcoólico e controle) em dois períodos de análise, 07 e 28 dias, totalizando 30 animais para o experimento. Cada animal recebeu dois implantes, hidroalcoólico, aquoso ou solução fisiológica, portanto soma-se 10 implantes para cada grupo experimental e controle.

3.4.a Obtenção dos Tubos de Polietileno:

Foram confeccionados tubo de polietileno a partir de cortes de sonda uretral número 4 (Mac Méd, São Paulo, Brasil), com 7 mm de comprimento e 1mm de diâmetro, os quais serviram para acomodação das soluções (extratos aquoso, hidroalcoólico e soro). Com o 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 0,2 mm aquém do comprimento total, para que não houvesse contato direto do cone de papel com o tecido e ao mesmo tempo oferecesse condições de conter as soluções no interior dos tubos (Fig. 2-A). Após preparo, os tubos foram submetidos a processo de esterilização a óxido de etileno (Oximed-São José do Rio Preto) para que finalmente fosse injetado nestes, os extratos aquoso e hidroalcoólico de aroeira e o soro (Fig. 2-B) (NOVAIS, 2008; RUVIÉRE, 2008).

3.4.b. Procedimentos cirúrgicos para implante:

Os animais foram anestesiados, a região dorsal tricotomizada (Fig. 2-C) e feita a antissepsia com polivinilpirrolidona a 1% (Fig. 2-D) , realizou-se uma incisão longitudinal com lâmina de bisturi número 15 acompanhando a linha média, com extensão de 2 cm atingindo o tecido subcutâneo (Fig. 2-E). Realizada a divulsão com tesoura, com aproximadamente 3 cm de extensão, em ambos os lados da incisão, (Fig. 2-F) foram implantados 2 tubos de polietileno contendo o mesmo material teste (controle, aroeira aquosa e aroeira alcoólica) (Fig. 2-G). A incisão longitudinal da pele foi posteriormente suturada com fio de seda 4-0 (Fig. 2-H) (Ethicon, Johnson & Johnson) e, em seguida, feita novamente a antissepsia (Fig. 2-I).

Os animais foram sacrificados aos 7 e 28 dias para obtenção de peças contendo o tubo de polietileno, circundado por tecido conjuntivo adjacente (Fig. 2-J).

Uma vez removidos (Fig. 2-K), os tecidos foram fixados em solução de formalina a 10%, por 48 horas e lavadas em água corrente por 12 horas. 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 μm de espessura, foram corados com hematoxilina e eosina para análise microscópica.

Os resultados foram obtidos por meio da leitura dos espécimes em microscópio binocular (Leica, Alemanha) das respostas teciduais tardias induzidas pelo extrato de Aroeira, testados comparativamente ao grupo controle em um 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 o extrato de Aroeira ou solução fisiológica ficou em contato com os tecidos.

Valores como se segue: à análise microscópica dos três grupos experimentais foram atribuídos quanto à espessura da cápsula fibrosa: escore 0 (zero) para cápsula fibrosa de espessura inferior a 150 μm e escore 4 (quatro) para cápsula fibrosa, superior a 150 μm.

Material e Métodos

Na avaliação da inflamação tecidual produzida pelos extratos vegetais e solução fisiológica, foi levado em consideração o critério descrito por Bernabé et al. (1978) e pelo Federation Dentaire International Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics (1980). 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 dessas células inflamatórias recebeu escore 1 (um). Quando o número de células inflamatórias foi inferior a 25, o infiltrado inflamatório foi considerado pequeno (escore 2). O critério moderado (escore 3) 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 4).

3.5 Análise Estatística

Os resultados do Teste Edemogênico, relativos à quantidade de edema, foram analisados por meio do teste de análise de variância a dois critérios de avaliação (tempo e solução). O teste de Tukey foi empregado para comparar os três grupos nos dois períodos experimentais entre si, utilizando o software GMC 2002.

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 28 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%.

FIGURA 1- Procedimentos cirúrgicos da Análise Edemogênica

A- Injeção intravenosa de azul de Evans a 1% (Evans Blue Difco Lab.) na veia peniana.

B- Injeção de 0,1mL do extrato correspondente ou soro

Ce D- Evidenciação da área de edema após tricotomia manual da região dorsal do animal.

E- Remoção da pele do animal com margem de segurança

F- Padronização da peça com 23 mm de diâmetro

G- Vazador de ferro efetuando corte da peça

H- Aspecto interno da peça após corte

I- Peça sendo picotada com tesoura cirúrgica

J- Frasco com 4mL de formamida contendo peça picotada

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

L- Espectrofotômetro

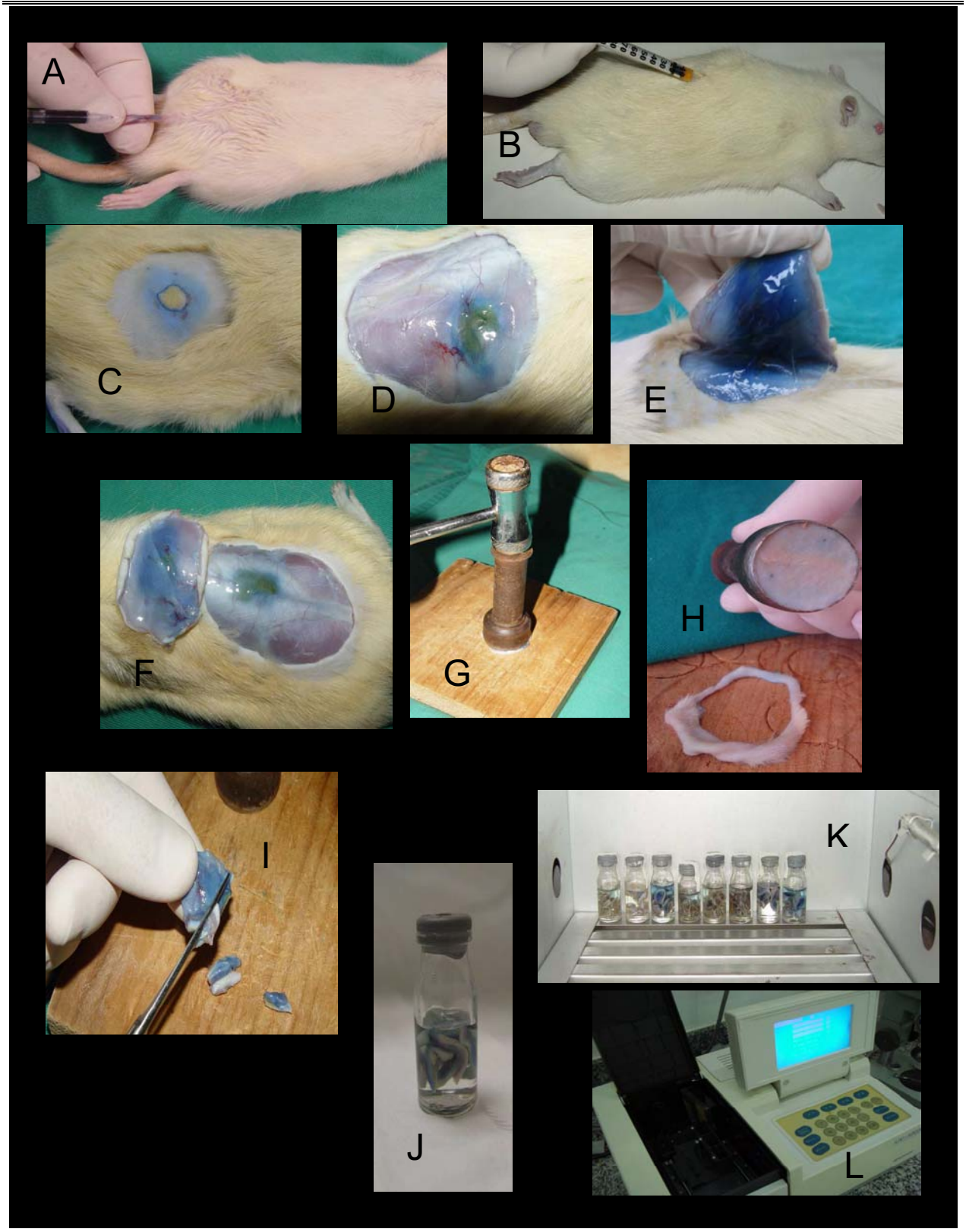

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

FIGURA 2- Procedimentos cirúrgicos da Análise Microscópica

A- Tubo de polietileno usado para implante contendo extrato

B- Injeção de extrato no tubo de polietileno com seringa

C-Tricotomia manual da região dorsal do animal

D- Antissepsia com polivinipirrolidona a 1 %

E - Incisão longitudinal atingindo o subcutâneo com lâmina de bisturi número 15

F- Divulsão com tesoura

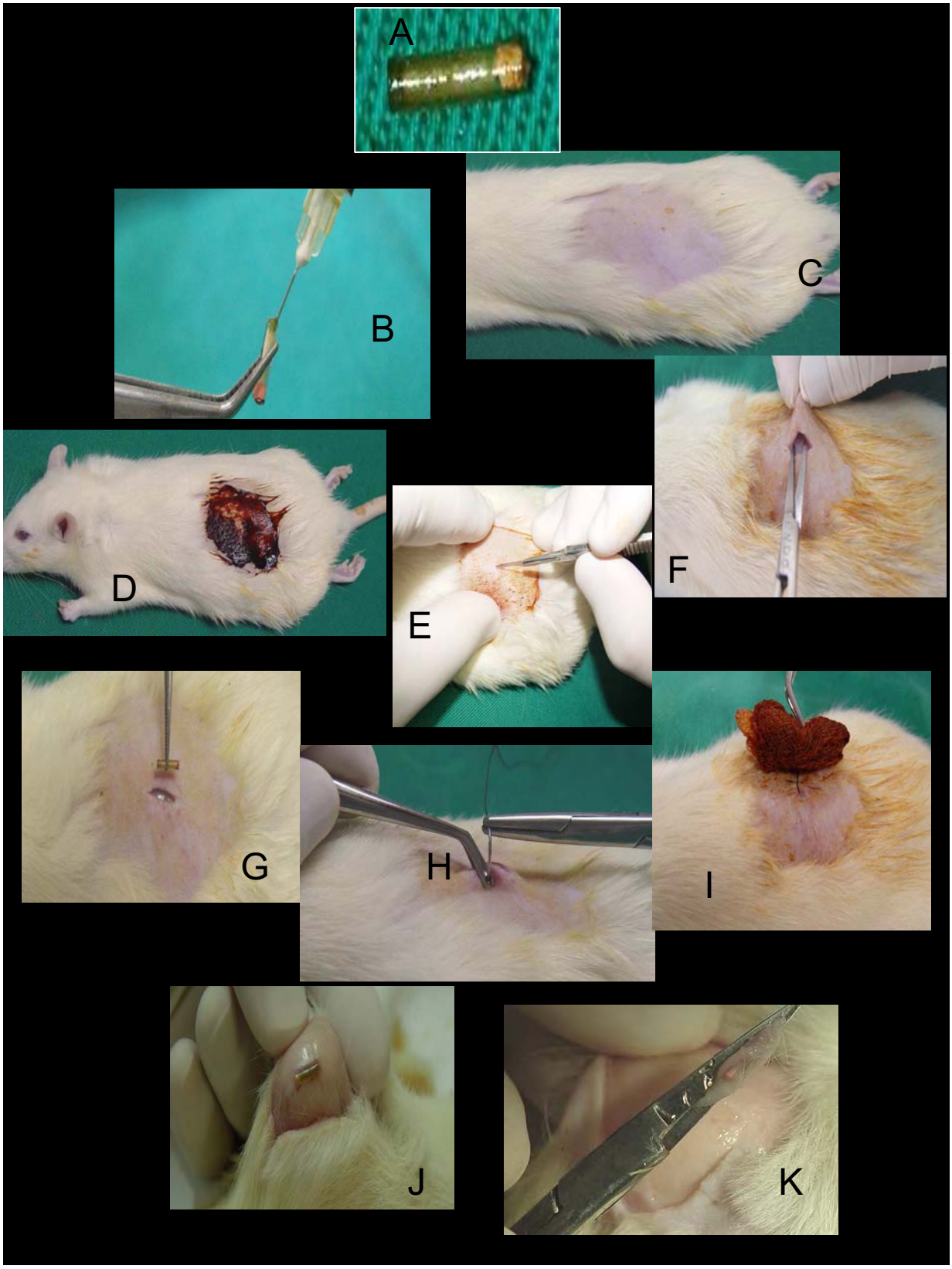
G- Implantação dos tubos de polietileno no tecido subcutâneo do animal

H- Sutura da incisão longitudinal da pele com fio de seda 4-0

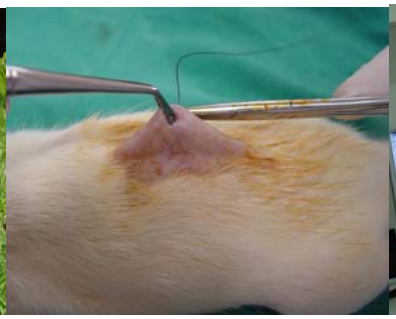
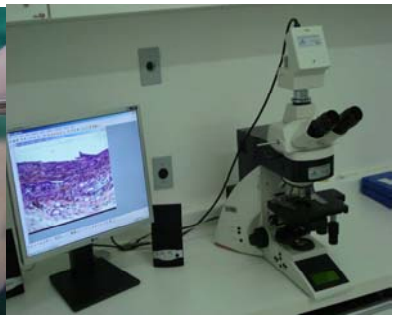
I- Antissepsia com polivinipirrolidona a 1 % após a sutura

J-Tubo de polietileno encapsulado no corpo do animal

K- Remoção da peça contendo o tubo e os tecidos circundantes com auxílio de tesoura


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise Edemogênica

Avaliação quantitativa da resposta tecidual imediata nos períodos experimentais

Os resultados das leituras da análise em espectrofotômetro, relativas à quantidade de edema expressos na tabela 1:

Tabela 1-Valores da intensidade do exsudato inflamatório induzido pela inoculação das soluções experimentais, obtidos em densidade óptica (D.O.):

Tempo / *Grupo*	*3 HORAS*	*6 HORAS*
AROEIRA AQUOSO	0.379 0.447 0.406	0.303 0.209 0.292
AROEIRA HIDROALCOÓLICO	1.158 1.559 1.806	1.535 1.266 1.263
SORO FISIOLÓGICO	0.339 0.625 0.482	0.541 0.610 0.554

Análise Estatística da Avaliação Edemogênica

Os resultados das leituras da análise em espectrofotômetro, relativas a quantidade de edema, foram submetidas ao teste de análise de variância a 02 critérios de variação: Solução e Tempo (Tabela 4 -Anexo B).

Pelo resultado da análise de variância verificamos não haver diferença significante (p=38) entre os tempos analisados, independentemente da solução empregada. Como pode ser observado no gráfico 1A.

Fator de variação: tempo

3 horas: 0.8001

6 horas: 0.7303

Pelo resultado da análise de variância, verifica-se haver diferença significante (p=0,001) entre as soluções analisadAs, independentemente do tempo de estudo.A solução de aroeira aquosa e soro apresentaram significativamente menor edema que a solução hidroalcoólica, como pode ser observado no gráfico 1B.

Fator de variação: solução ordenada do melhor para o pior resultado

Aroeira aquoso	0,3393b	t=0,2491
Soro	0,5252b	
Aroeira Alcoólico	1,4318a *	

*letras diferentes diante das médias apresentam significância estatística

Na interação tempo X material percebe-se que a solução hidroalcoólica apresenta maior edema nos dois períodos de tempo, como pode ser melhor observado no Gráfico 1C.

Tratando-se de seis grupos experimentais foi feito teste de Tukey para identificar esta diferença, dispostos a seguir do melhor para o pior resultado:

Grupo	Tempo	Edema	t=0,557
Aroeira aquoso	**3 h**	**0.41067b**	
Aroeira aquoso	**6 h**	**0.26800b**	
soro	**3 h**	**0.48200b**	
soro	6 h	0.56833b	
Aroeira alcoólico	**3 h**	**1,50767a***	
Aroeira alcoolico	**6 h**	**1,41067a**	

*letras diferentes diante das médias apresentam significância estatística

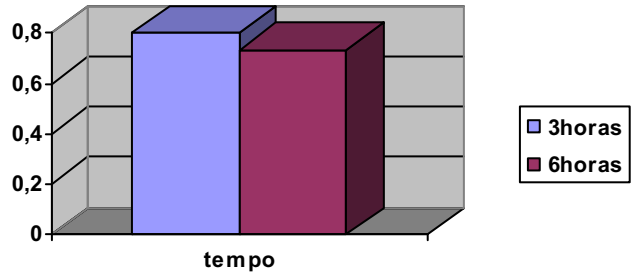


GRÁFICO 1A- Representação gráfica do valor médio do edema ocorrido nos tempos operatórios 3 e 6 horas.

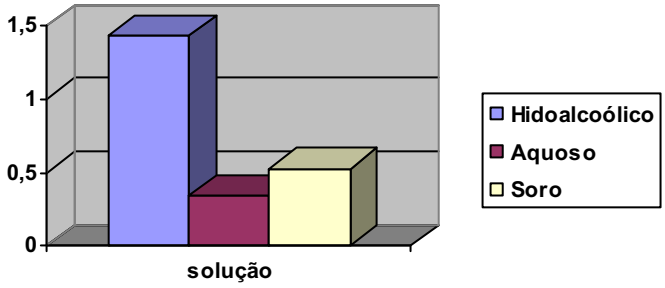


GRÁFICO 1B- Representação gráfica do valor médio do edema ocorrido nos grupos avaliados (aquoso, hidroalcoólico e soro).

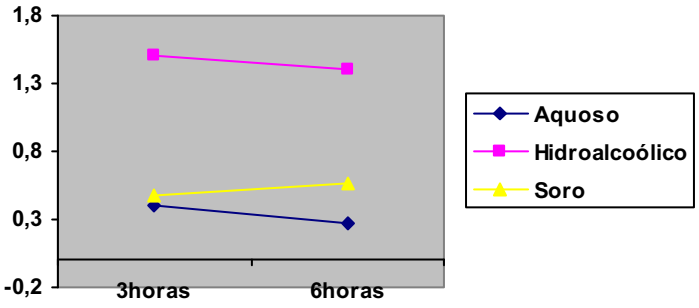


GRÁFICO 1C- Representação gráfica do valor médio do edema nos dois tempos tempos estudados para os três grupos avaliados.

4.2 Análise Microscópica

Avaliação qualitativa da resposta tecidual tardia aos implantes nos períodos experimentais (Anexo F).

●Soro fisiológico- 7 dias -Figuras 3A e 3B

Resposta inflamatória agressiva, reação tecidual ampla. As amostras, no gera,l apresentaram espessura de tecido de granulação maior que 150 µm.
Observa-se no tecido de granulação, macrófagos e linfócitos. Fibroblastos apresentam-se próximos às fibras colágenas de forma complexa e desorganizada. Vasos sanguíneos distribuídos por todo o tecido.

●Soro fisiológico- 28 dias -Figuras 3C e 3D

As amostras, no geral, apresentaram espessura de tecido fibroso ou cápsula menor que 150µm.
Os linfócitos, fibroblastos e macrófagos estão em menor quantidade comparada à amostra anterior. Capilares sanguíneos dispersos no tecido conjuntivo e em menor número.
Fibrócitos organizados e enfileirados nas fibras colágenas do tecido conjuntivo e na periferia.

●Aroeira Aquoso- 7 dias-Figuras 4A e 4B

Todas as amostras apresentaram espessura de tecido conjuntivo maior que 150 µm.
De maneira geral, este grupo apresentou tecido de granulação mais espesso com infiltrado inflamatório, constituídos por linfócitos e macrófagos. Vasos sanguíneos espalhados por todo tecido de granulação. Os fibrócitos se apresentam dispersos de forma complexa nas fibras colágenas.

●Aroeira Aquoso- 28 dias-Figuras 4C e 4D

Todas as amostras apresentaram espessura de tecido conjuntivo fibroso menor que 150 µm. Poucos fibroblastos e alguns linfócitos, macrófagos e vasos sanguíneos no tecido de granulação que já se apresenta menos espesso que a amostra anterior.
Os fibrócitos estão em maior quantidade na periferia e enfileirados junto às fibras colágenas.

●Aroeira Hidroalcoólico- 7 dias- Figuras 5A e 5B

De maneira geral, este grupo apresentou tecido de granulação maior que 150 µm.
Existe uma riqueza de células inflamatórias formando o tecido de granulação como macrófagos, linfócitos, fibroblastos e raros neutrófilos. Vários vasos sanguíneos estão espalhados por todo tecido.
Poucos fibrócitos dispersos em fibras colágenas desorganizadas, mais concentradas na região periférica.

●Aroeira Hidroalcoólica- 28 dias- Figuras 5C e 5D

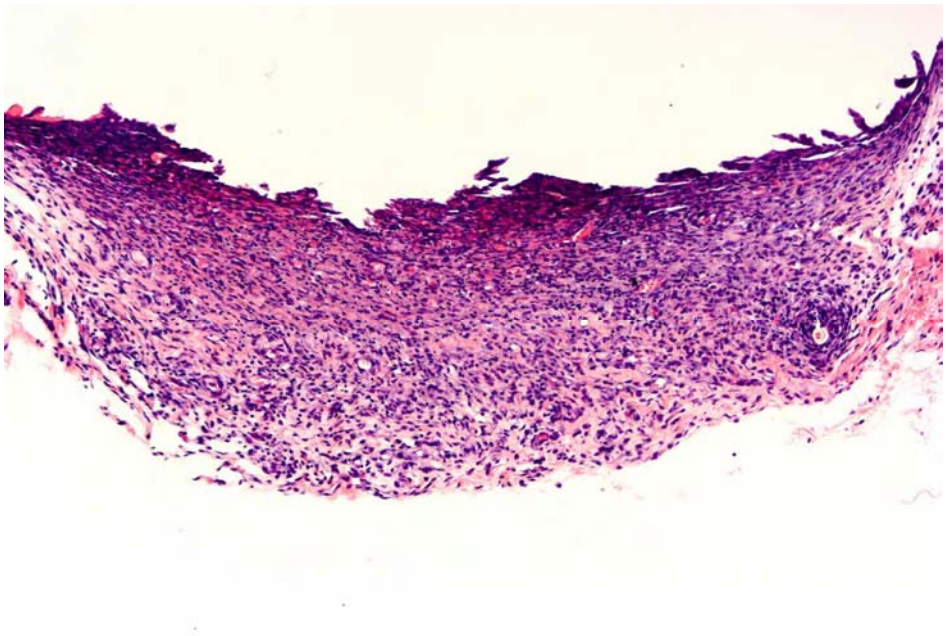
De maneira geral este grupo apresentou tecido conjuntivo fibroso delgado, com espessura menor que 150 µm e células inflamatórias.
Linfócitos, fibroblastos, macrófagos e vasos sanguíneos dispersos em todo tecido de granulação. Uma grande área hemorrágica foi encontrada no tecido com pigmentação de hemossiderina. Observou-se fibrócitos ordenados junto às fibras colágenas na periferia e na região central do tecido de granulação.

FIGURA 3-Grupo Controle-Soro Fisiológico

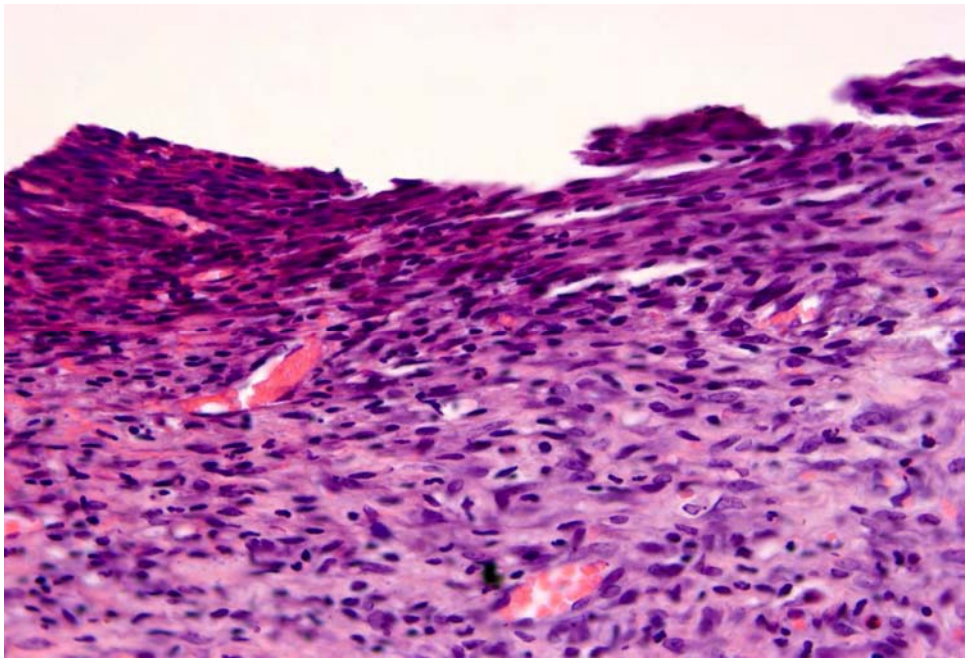
3A- HE, 10X, 07 dias.

3B- HE, 40X, 07 dias.

Resposta inflamatória agressiva, reação tecidual ampla. Tecido de granulação espesso com a presença de macrófagos e linfócitos. Fibroblastos apresentam-se próximos às fibras colágenas de forma complexa e desorganizada. Vasos sanguíneos estão distribuídos por todo o tecido.



A



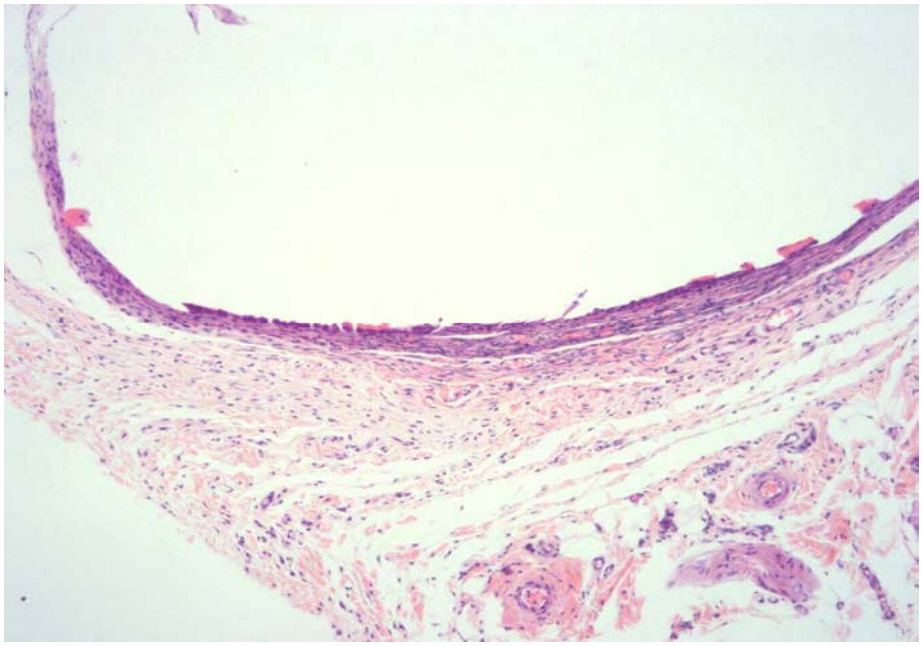
B

FIGURA 3-Grupo Controle-Soro Fisiológico

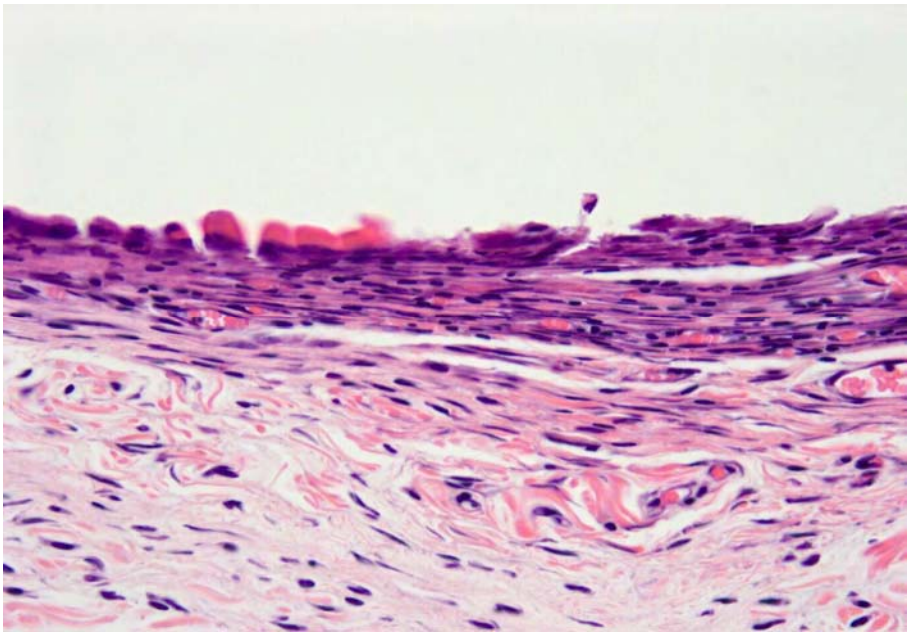
3C- HE, 10X, 28 dias.

3D- HE, 40x, 28 dias.

Tecido fibroso ou cápsula fibrosa fina com fibras colágenas bem organizadas, condensadas e dispostas paralelamente ao implante. Os leucócitos, linfócitos, fibroblastos e macrófagos estão em menor quantidade comparada à amostra anterior. Capilares sanguíneos dispersos no tecido conjuntivo e em menor número. Fibrócitos organizados e enfileirados nas fibras colágenas do tecido conjuntivo e na periferia.



C



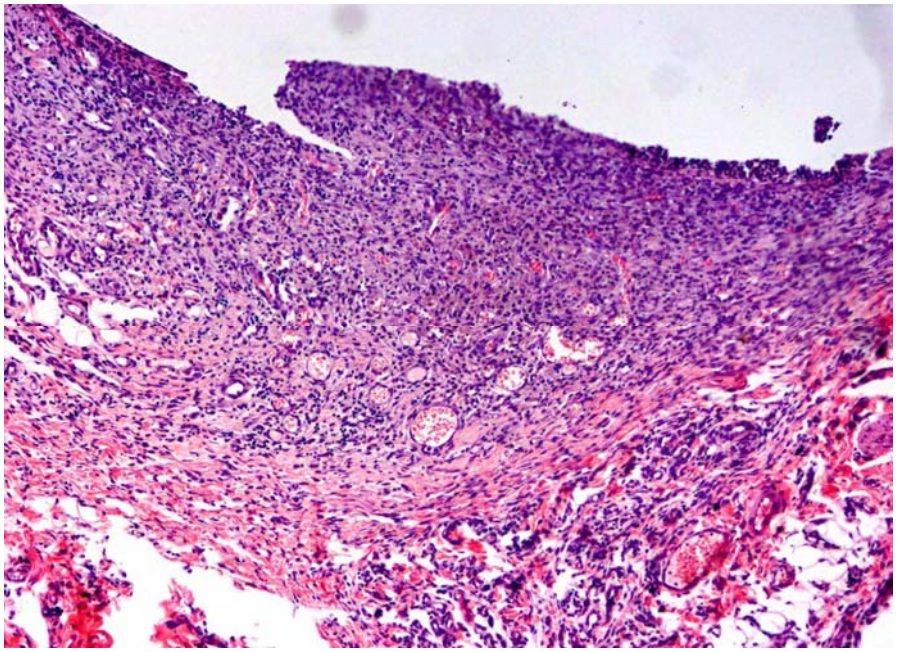
D

FIGURA 4- Grupo Extrato de Aroeira Aquoso

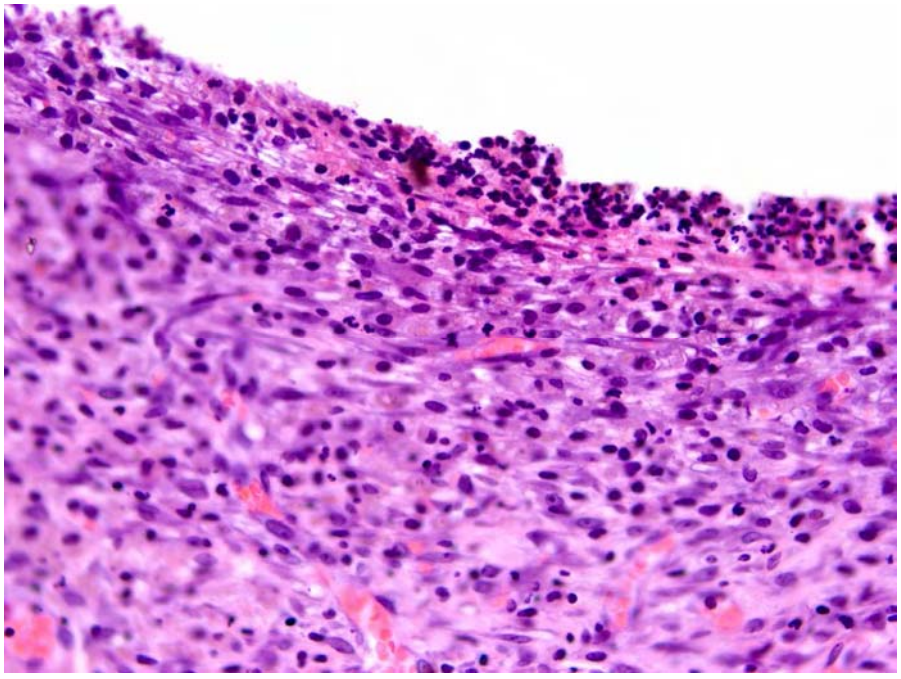
4A-HE, 10X, 07 dias.

4B-HE, 40X, 07 dias.

Tecido de granulação espesso com infiltrado inflamatório, maior número de células inflamatórias como linfócitos e macrófagos. Os fibrócitos se apresentam dispersos de forma complexa junto às fibras colágenas. Vasos espalhados por todo tecido de granulação.



A



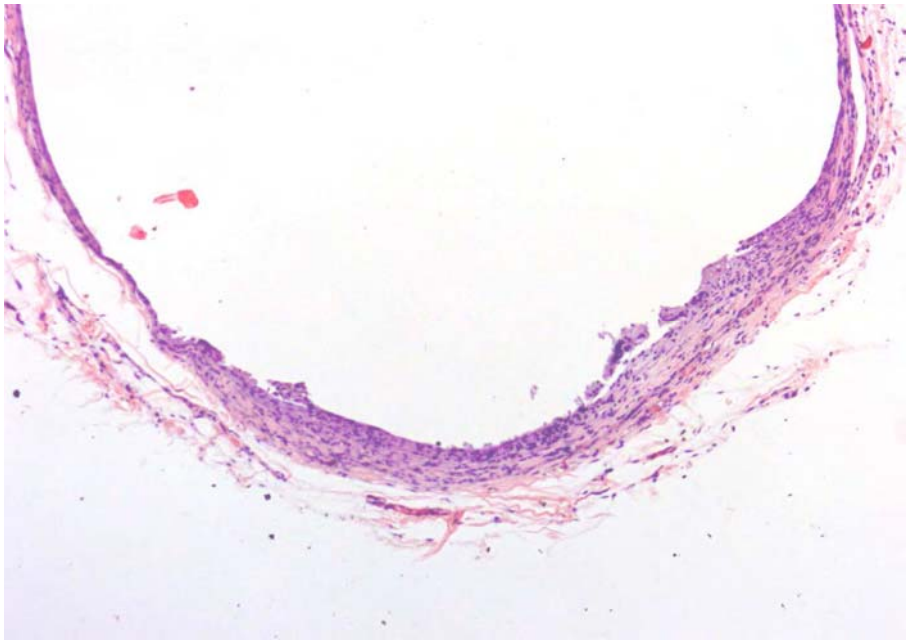
B

FIGURA 4- Grupo Extrato de Aroeira Aquoso

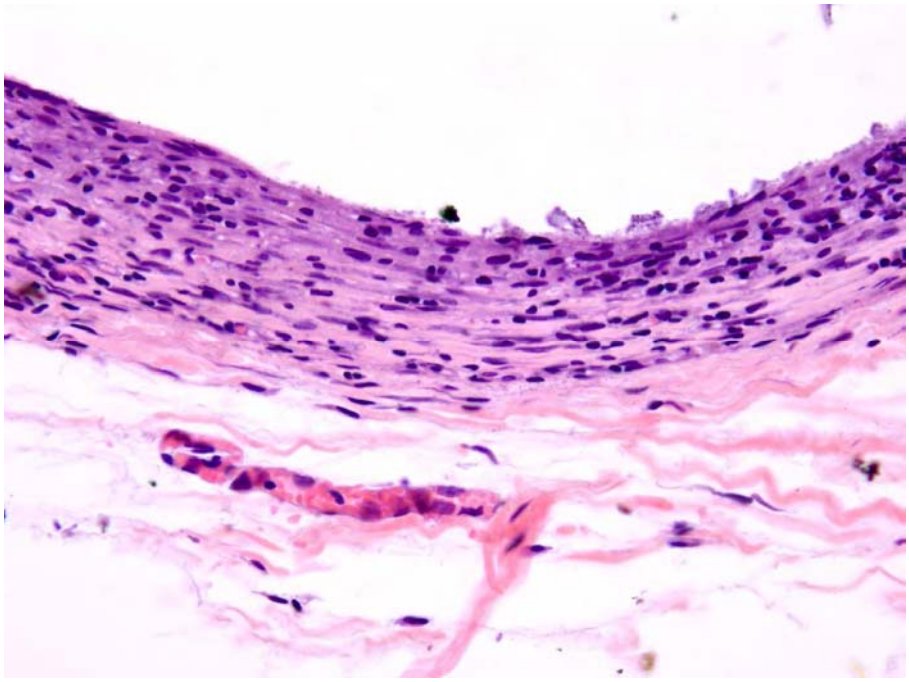
4C-HE, 10X, 30 dias.

4D-HE, 40X, 30 dias.

Tecido conjuntivo menos espesso que a amostra anterior. Poucos fibroblastos e alguns linfócitos, macrófagos e vasos sanguíneos no tecido de granulação. Os fibrócitos estão em maior quantidade na periferia e enfileirados junto às fibras colágenas.



C

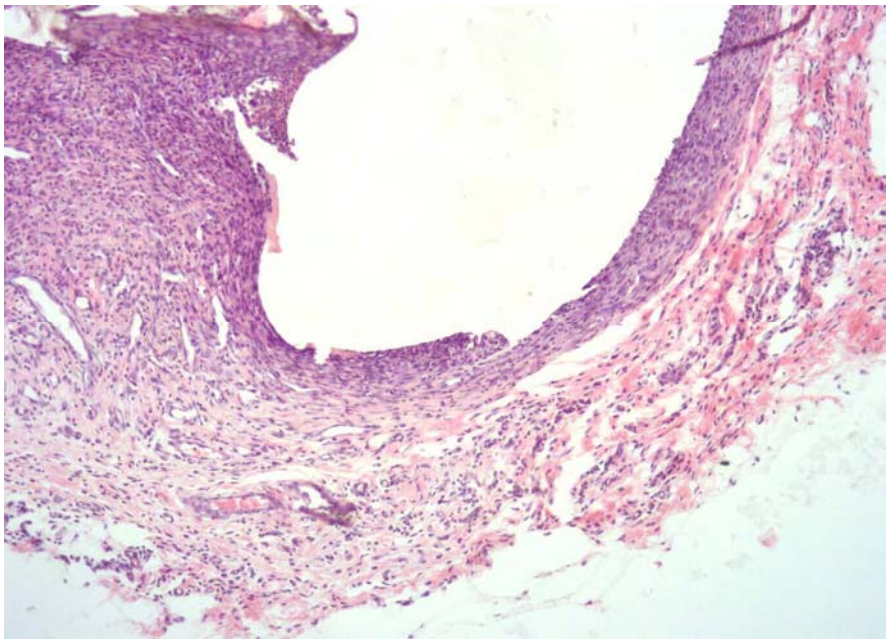


D

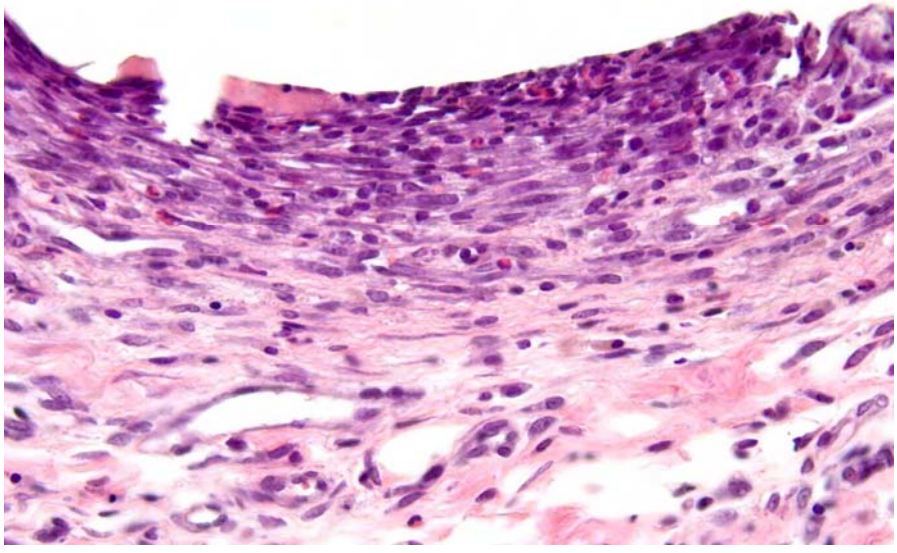
Figura 5: Grupo Extrato de Aroeira Hidroalcoólico

5A-HE, 10X, 07 dias.
5B-HE, 40x, 07 dias.

Tecido de granulação espesso, apresentando uma riqueza de células inflamatórias formando tecido de granulação como macrófagos, linfócitos, fibroblastos e raros neutrófilos. Vários vasos sanguíneos espalhados por todo tecido. Poucos fibrócitos dispersos em fibras colágenas desorganizadas, mais concentradas na região periférica.



A



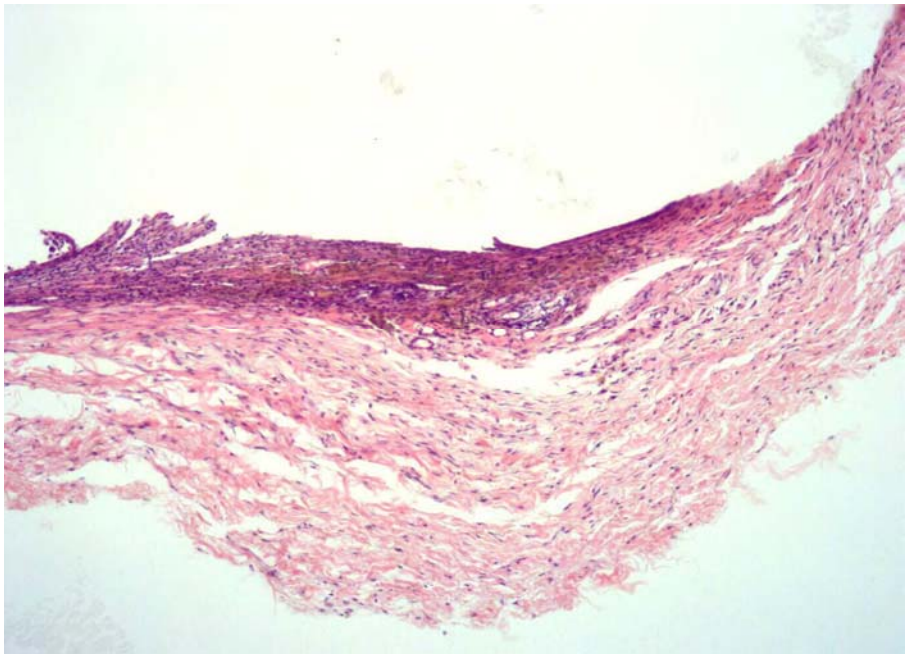
B

FIGURA 5: Grupo Extrato de Aroeira Hidroalcoólico

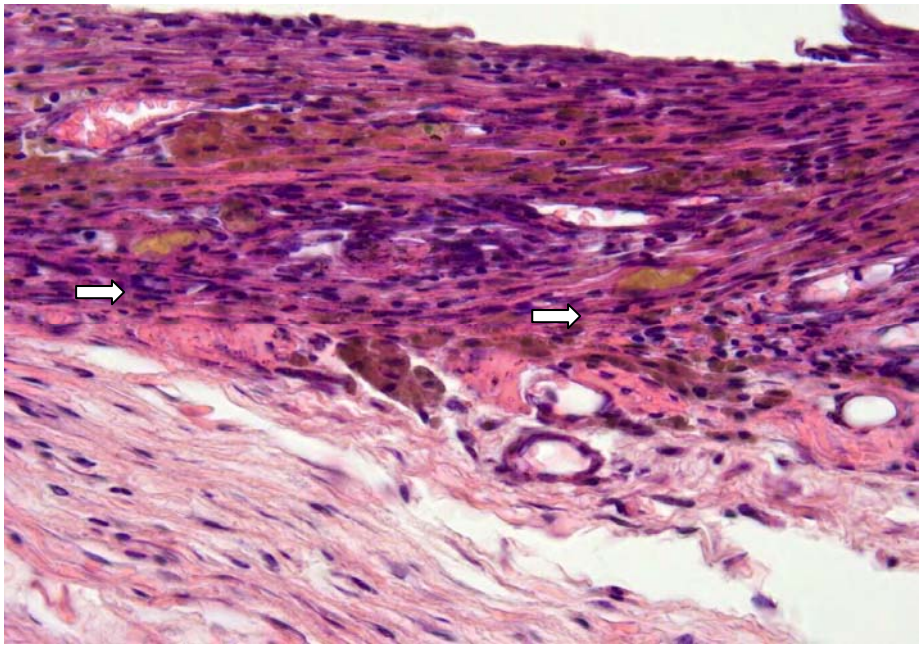
5C-HE, 10X, 28 dias.

5D-HE, 40X, 28 dias.

Tecido conjuntivo fibroso mais delgado com raras células inflamatórias. Linfócitos, fibroblastos, macrófagos e vasos sanguíneos dispersos em todo tecido de granulação. A região destacada pelas flechas apresenta uma grande área hemorrágica que foi encontrada no tecido com pigmentação de hemossiderina. Observou-se fibrócitos ordenados junto às fibras colágenas na periferia e na região central do tecido de granulação.



C



D

Avaliação quantitativa da resposta tecidual tardia aos implantes nos períodos experimentais

Análise Estatística da Avaliação Microscópica

Inicialmente foi analisada a influência dos dois períodos estudados, 7 e 28 dias, cujos resultados apresentam-se na Tabela 5 (ANEXO C).

Quando analisada de forma independente dos grupos empregados, houve diferença significante, sendo que o período de 28 dias apresentou reparo superior ao de 7 dias, independente do extrato empregado (p=0,005). O gráfico 2A ilustra o resultado dessa comparação.

Na seqüência, analisou-se a influência dos extratos sem considerar o tempo pós - operatório (Tabela 6), (ANEXO D). Pelo resultado da análise de variância, verificou-se não haver diferença significante entre as soluções analisadas, independentemente do tempo de estudo como pode ser observado no Gráfico 2B.

Em relação à interação das soluções e o período experimental, ordenamos do melhor para o pior tratamento:

Tabela-3 Solução X Período Exprimental-
Médias dos postos das amostras:

Amostra	*Soma de postos*	*Média*
30 AQUOSO	173	21.6
30 SORO	298	29.8
7 HIDROALCOÓLICO	994	45.2
30 HIDROALCOÓLICO	1001	45.5
7 SORO	558	55.8
7 AQUOSO	893	55.8

Quando analisamos os extratos em função do tempo obtivemos resultados encontrados na tabela 6(ANEXO D). Os melhores resultados foram do extrato aquoso e soro que apresentaram menor número de células inflamatórias. O hidroalcoólico interferiu significantemente no reparo.

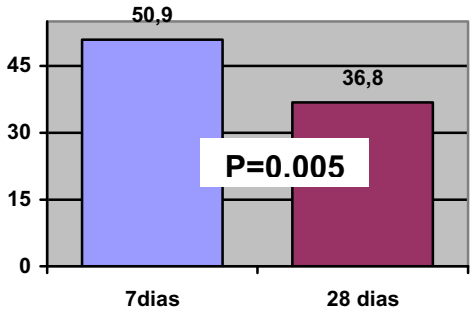


GRÁFICO 2A- Representação gráfica da influência dos tempos pós-operatório nos resultados obtidos independentemente do grupo implantado

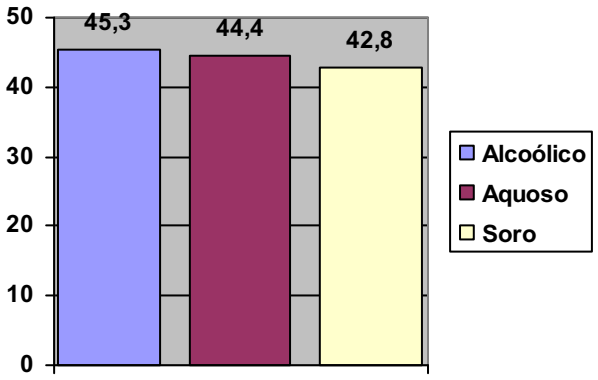


GRÁFICO 2B- Representação gráfica da influência dos grupos analisados nos resultados obtidos, independentemente do tempo pós-operatório

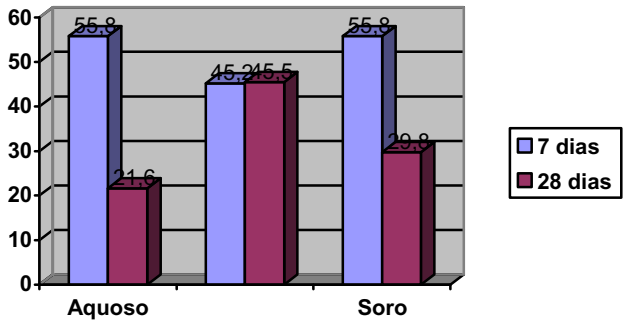
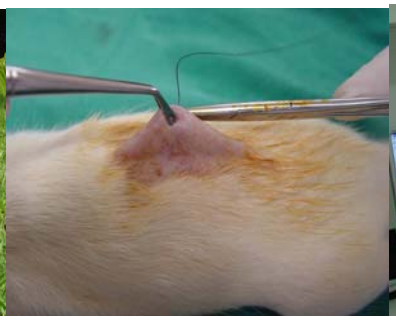
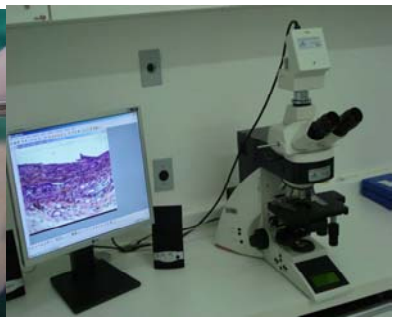


GRÁFICO 2C- Representação gráfica dos postos médios atribuídos aos grupos experimentais em função dos tempos operatórios.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 da concepção

Da riqueza florística existente em toda zona tropical, da grande importância de seu uso medicinal pela população, as estimativas mais otimistas citam que menos de 1 % já foi quimicamente estudada (VIEIRA; MARTINS, 2000).

No presente estudo, optou-se por estudar extratos de aroeira em função dos resultados favoráveis obtidos em estudos *in vitro*, evidenciando a capacidade do extrato em reduzir significantemente a colonização de superfície de vidro, bem como apresentar notável atividade inibitória sobre cocos cariogênicos, e outros microorganismos importantes na formação do biofilme microbiano (BIANCO, 2004; LANDUCCI, 2005).

Sua coleta, deve-se observar se o vegetal oferece alguma dificuldade na uniformidade e estabilidade do produto a ser utilizado. 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 (VOLPATO et al., 2002). Portanto, para o presente estudo, foram retiradas folhas de um único exemplar da espécie e a coleta foi realizada de uma única vez, sendo a quantidade suficiente para a produção dos extratos utilizados em todos os testes.

A área escolhida para a coleta das folhas é representativa dos principais tipos de vegetação do cerrado, sendo que se optou pela inclusão de áreas não submetidas a agressões humanas. A contribuição dos moradores locais no manejo e obtenção de plantas medicinais foi essencial, uma vez que os mesmos apresentam habilidade em localizar, identificar, extrair e manipular os recursos utilizados na elaboração de remédios caseiros há gerações.

5.2. da Metodologia

Da Análise Edemogênica

O edema é um dos principais sinais de inflamação, que leva ao aumento da permeabilidade vascular. Isto acontece quase que imediatamente após a agressão. Nos tecidos saudáveis a barreira tissular do sangue é livremente permeável à água, eletrólitos, e pequenas moléculas, porém pouco permeável a proteínas. Esse conjunto de substâncias produz aumento de permeabilidade da parede capilar, causando exsudação e edema. 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 do plasma do interior dos vasos para a matriz extracelular, caracterizando o exsudato ou edema inflamatório. Corantes vitais como o azul de Evans, quando administrados endovenosamente têm capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, formando um complexo corante-albumina, o qual funciona como um marcador de plasma. Assim a presença desse corante nos locais edemaciados, possibilita a detecção de infiltração de proteínas na área do edema (SWINGLE, 1974), permitindo estimar a intensidade da agressão (RUTBERG et al., 1977; TAVEIRA, 1988).

Segundo Rutberg et al.(1977), o mecanismo de implantação subcutânea para a análise microscópica pode acarretar em inflamação devido ao trauma cirúrgico gerado. A análise edemogênica seria uma maneira mais segura de se testar a biocompatibilidade nos períodos iniciais.

Para realização da 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 realizado 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 depilação poderia interferir nos resultados.

Da Análise Microscópica

O método de implantação subcutânea foi utilizado neste estudo para avaliar a biocompatibilidade pois de acordo com Costa, em 2001 apresente inúmeras as vantagens, como: a facilidade na execução e na manutenção dos animais, possibilitando 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.

Tubos de polietileno foram utilizados por Makkes et al. (1977), 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 certa flexibilidade, permitindo melhor ajuste ao corpo do animal, sendo mais confortável à sua movimentação. Segundo Tornek (1967) após duas semanas da implantação, os tubos iniciam o reparo de alguns sintomas da inflamação que induziram, e depois de três semanas a inflamação praticamente desaparece. Os tubos de polietileno foram indicados para este estudo pela não interferência nos princípios ativos do material testado e pela facilidade no seu manuseio.

O material a ser testado, sendo líquido, foi adaptado para a colocação no tubo. Um cone de papel foi introduzido no interior do tubo de polietileno para impedir e dificultar o escoamento das soluções, tendo o cuidado de mantê-lo aquém do comprimento total do tubo, evitando contato direto com o tecido. A possibilidade do uso de um veículo em gel foi descartada para evitar qualquer interferência química no princípio ativo dos extratos vegetais devido à ausência de estudos prévios como parâmetros, tratando-se de material novo neste tipo de pesquisa *in vivo.*

Quanto aos períodos experimentais, baseados nos trabalhos de Holland et al. (2002), optou-se por 7 e 28 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.

5.3 Dos resultados

Da Análise Edemogênica

O edema apresentou-se semelhante nos períodos de tempo avaliados independente do grupo estudado, mesmo que no período de 6 horas tenha ocorrido uma ligeira diminuição da sua quantidade. Novais em 2008, avaliou os extratos de araçá pela mesma metodologia empregada que o estudo presente, e, o edema apresentou-se semelhante nos dois períodos, porém com ligeiro acréscimo do volume no período de 6 horas.

No resultado das soluções, o extrato de aroeira aquoso foi que apresentou melhor resultado, seguido do soro, mas sem diferença significante entre ambos. O extrato de aroeira hidroalcoólico foi a que apresentou maior edema provavelmente provocado pelo álcool. No caso de Novais (2008), o soro obteve melhor resultado seguido do extrato de araçá aquoso, que com edema ligeiramente maior, uma vez que o resultado geral do edema provocado pelo extrato hidroalcoólico ficou elevado devido ao álcool ainda presente no organismo do rato por um longo período.

Os extratos de aroeira aquoso e hidroalcoólico apresentaram mínima diminuição do edema em relação ao tempo comparados com soro que obteve um ligeiro aumento.

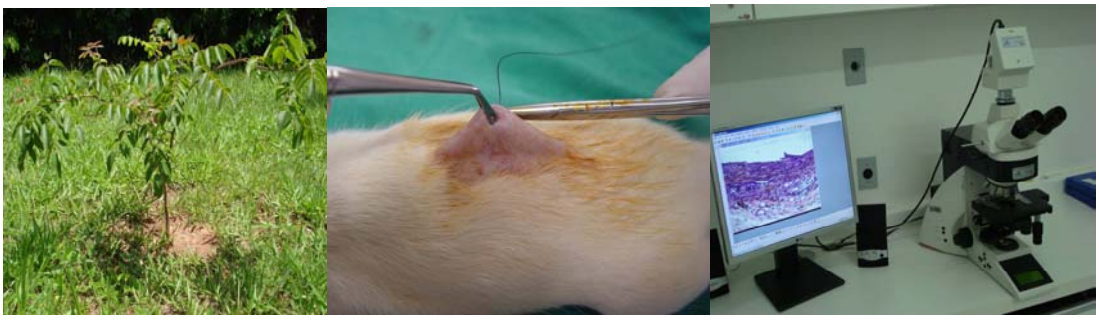
Da Análise Microscópica

No período de 7 dias foi observado inflamação moderada devido provavelmente ao trauma causado durante os procedimentos cirúrgicos (Torneck,1967). No período de 28 dias observou-se reparo mais adiantado, com níveis de inflamação diminuídos em comparação a 7 dias, principalmente no soro e extrato aquoso. Diferente de Novais (2008), o extrato hidroalcoólico continuou com o tecido de granulação com grande quantidade de células inflamatórias no período de 28 dias, sem haver um reparo adequado, comparado com os outros grupos.

No período de 28 dias, provavelmente não seja o álcool o fator irritante que cause a manutenção do processo inflamatório, e sim que durante o processo deobtenção haja produção de algum componente pelo processo hidroalcoólico que não foi obtido com a água, e esse possível componente possa ser o agente causador da manutenção do processo inflamatório no período de 28 dias.

No trabalho de Novais (2008), com a extração hidroalcoólica do extrato de araçá, isso não ocorre, visto que o extrato hidroalcoólico de araçá apresentou os melhores resultados.

CONCLUSÃO



6 **CONCLUSÃO**

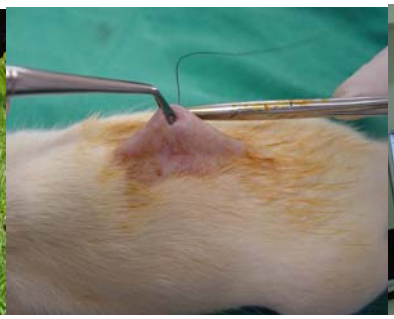
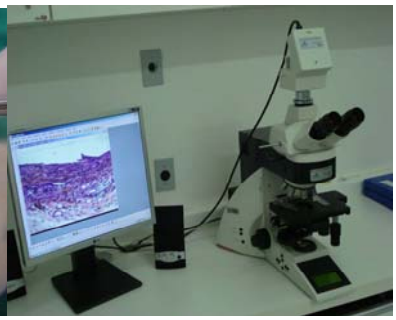
Pelas análises dos resultados obtidos a partir da metodologia empregada no presente estudo, pode-se concluir que:

•O extrato aquoso de aroeira apresenta resposta biológica semelhante ao soro.

●Em geral, o edema apresentou-se constante com o tempo. O extrato de aroeira aquoso apresentou um edema semelhante ao soro, sendo inferiores ao extrato de aroeira hidroalcoólico.

●Na resposta tardia para o soro e o extrato aquoso houve evolução do reparo. O extrato hidroalcoólico interferiu no reparo mantendo índices de inflamação no período de 28 dias semelhantes ao de 7 dias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Arantes AB, Luz MMS, Santos CAM, Sato MEO. Desenvolvimento de dentifrícios com extratos fluidos de *Calendula officinalis L*. (Asteraceae) e *Casearia sylvestris Sw*. (Flacourtiaceae) destinado ao combate à placa bacteriana. Rev Bras Farm 2005; 86(2):61-64.

Bernabé PFE, 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.

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, Faculdade de Odontologia; 2004.

Castelluci 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.

Castro HG, Ferreira I. A dialética do conhecimento no uso das plantas medicinais. Rev Bras Pl Med 2001; 3(2):19-21.

* Normalização de acordo com a Norma da Vancouver (Anexo F)

Catão RMR, Antunes RMP, Arruda TA, Pereira MSV, Higino JS, Ales JÁ et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de *Punica granatum linn* (Romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus.* Rev Bras Anal Clin 2006; 38(2):111-4.

Cordeiro R, Nunes VA, Almeida CR. Plantas que curam. 2 ed. São Paulo: Editora Três; 1996.

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

Di Stasi LC. Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp; 1996.

Fereration Dentaire international Comprission of Dental Materials Instruments, equipment and therapeutics. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Int Dent J 1980;30 (02):140-88.

Gentil M, Pereira JV, Sousa YTCS, Pietro R, Sousa Neto MD, Vansan LP et al. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytoterapeutic agent used in intracanal dressings. Phytoter Res 2006; 20(3): 184-186.

Gonçalvez AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq Inst Biol 2005; 72(3): 353-8.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabe PF, Otoboni Filho JA et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with a hite mineral trioxide aggregate. Braz Dent J 2002; 13(1): 23-6.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. Arch Oral Biol 2000; 45(2):141-8.

Landucci LF, 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 2005; 6 (3):21-60.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.

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.

Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa: Editora UFV, 2003.

Matos FJA. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4 ed. Fortaleza: UFC; 2002.

Mutti O. Intoxication by medicinal plants. Acta Hortic 1999; 501:323-327.

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, Faculdade de Odontologia; 2008.

Olsson B, Sliwkoswski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. J Endod 1981; 7(8): 355-367.

Otake S, Makimura M, Turoki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res 1991; 25(6): 438-443.

Rutberg M, Spangberg E, Spangberg L. Evaluation of enhanced vascular permeability of endodontic medicaments in vivo. J Endod 1977; 3(9): 347-351.

Ruviére DB. Avaliação da resposta tecidual em ratos, a microorganismos anaeróbios e facultativos inativados associados a soluções preparadas com extratos vegetais aquoso e hidroalcoólico de Araçá (*Psidium cattleianum*) [tese] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista ,Faculdade de Odontologia; 2008.

Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, et al: Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. Agric Biol Chem 1989; 53: 2307-2311.

Santos PRV, Oliveira ACX, Tomassini TCB. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. Rev Farm Bioquim Univ São Paulo 1995; 31 (1): 35-38.

Swingle KF. Evaluation for anti-inflammatory activity. In: Scherre RA, Whitehouse M. Anti-inflammatory agents: chemistry and pharmacology. London: Academic Press; 1974. p.33-109.

Taveira LAA. Estudo do poder flogógeno da placa dental íntegra e tratada com diferentes soluções extratoras [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1988.

Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1967; 24(5):674-83.

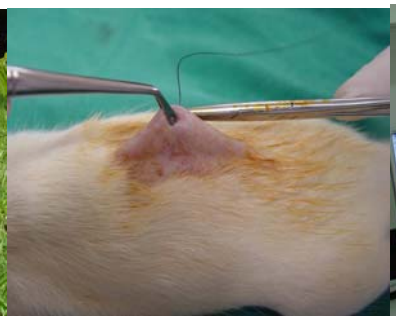
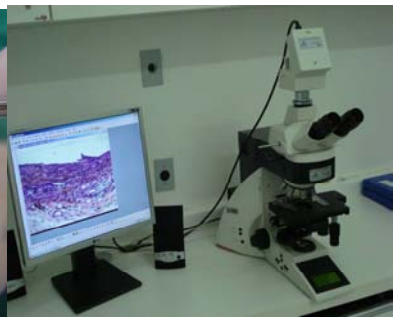
Tsuchiya H, Sato M, Iinuma M, Yokoyama J, Ohyama M, Tanaka T, et al. Inhibition of growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. Experientia 1994; 50(9): 846-849.

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

Volpato GT, Damasceno DC, Calderon IMP, Rudge MVC. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do *Diabetes mellitus*. Rev Bras Plantas Med 2002; 4(2):35-45.

World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide rewiew. Geneva: WHO;1998. 45p.

ANEXOS

ANEXO A

unesp 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 AROEIRA PELA ANÁLISE EDEMOGÊNICA E HISTOPATOLÓGICA EM RATOS"** sob responsabilidade do **Prof Dr ELOI DEZAN JUNIOR E ALESSANDRA CURY MACHADO** e colaboração de **ÉLERSON GAETTI JARDIM JUNIOR** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 29 de fevereiro de 2008, de acordo com o protocolo no. 2007- 008938.

Araçatuba, 05 de março de 2008.

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

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-3200

ANEXO B

TABELA 4--ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Fonte de variação	Soma de Quadr.	G. L.	Quadr. Méd.	(F)	Prob. H0
Tempo (T)	0,0219	1	0,0219	0,84	38,129%
Solução (S)	4,0949	2	2,0475	78,27	0,001%
Interação TxS	0,0549	2	0,275	1,05	38,171%
Resíduo	0,3139	12	0,0262		
Variação total	4,4857	17			

ANEXO C

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

Valores de U:	
U (1): 7 DIAS	1268,5
U (2):30 DIAS	651,5
Valor calculado de z:	2,5852
Probabilidade de igualdade:	0,49%
Significante ao nível de 0,49% (p<0,01)	

ANEXO D

Tabela 6 – Teste de Kruskal-Wallis para os extratos analisados

Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado	:	0,1596
Valor do x^2 para 2 graus de liberdade	:	0,16
Probabilidade de H0 para esse valor	:	92,33%

Não Significante (p>0,05)

Amostra	*Soma de postos*	*Média*
Alcoólico	1995	45.3
Aquoso	1066	44.4
Soro	855	42.8

ANEXO E

Tabela 7–Teste de Kruskal-Wallis para comparar todos os tratamentos realizados

Valor (H) de Kruskal-Wallis calculado	:	16,7415
Valor do x^2 para 5 graus de liberdade	:	16,74
Probabilidade de H0 para esse valor	:	0,50 %
Significante ao nível de 0,2% (p=0,0050)		

Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferenças entre médias	Valores críticos (p)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
Aquoso 7 x Aquoso 28	34,1875	19,2321	25,5207	33,0862	0,1%
Aquoso 7 x Alcoólico 7	10,6307	14,5931	19,3648	25,1053	ns
Aquoso 7 x Alcoólico 28	10,3125	14,5931	19,3648	25,1053	ns
Aquoso 7 x Soro 7	0,0625	17,9041	23,7585	30,8015	ns
Aquoso 7 x Soro 28	26,0625	17,9041	23,7585	30,8015	1%
Aquoso 28 x Alcoólico 7	23,5568	18,3371	24,3330	31,5464	5%
Aquoso 28 x Alcoólico 28	23,8750	18,3371	24,3330	31,5464	5%
Aquoso 28 x Soro 7	34,1250	21,0677	27,9565	36,2441	1%
Aquoso 28 x Soro 28	8,1250	19,8629	26,3577	34,1712	ns
Alcoólico 7 x Alcoólico 28	0,3182	13,3915	17,7703	23,0382	ns
Alcoólico 7 x Soro 7	10,5682	16,9391	22,4779	29,1413	ns
Alcoólico 7 x Soro 28	15,4318	16,9391	22,4779	29,1413	ns
Alcoólico 28 x Soro 7	10,2500	16,9391	22,4779	29,1413	0,1%
Alcoólico 28 x Soro 28	15,7500	16,9391	22,4779	29,1413	ns
Soro 7 x Soro 28	26,0000	19,8629	26,3577	34,1712	5%

ANEXO F- Normas da 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 legendsshould be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular Table orfigure.

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, Sikic 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.