

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR  
PROGRAMA MULTI INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**ANDRÉ AUGUSTO FRANCO MARQUES**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DA REAÇÃO  
TECIDUAL PROVOCADA POR PASTAS ENDODÔNTICAS  
CONTENDO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Pothomorphe umbellata*  
EM TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

*Tese apresentada ao Programa Multi  
institucional de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do  
Amazonas, para obtenção do título de Doutor  
em Biotecnologia.*

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Delfina Bittencourt Garrido  
Co - Orientador: Prof. Dr. Raphael Carlos Comelli Lia**

**MANAUS  
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR  
PROGRAMA MULTI INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DA REAÇÃO  
TECIDUAL PROVOCADA POR PASTAS ENDODÔNTICAS  
CONTENDO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Pothomorphe umbellata*  
EM TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

**ANDRÉ AUGUSTO FRANCO MARQUES**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Delfina Bittencourt Garrido**

**Co - Orientador: Prof. Dr. Raphael Carlos Comelli Lia**

**MANAUS  
2009**

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da  
Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

M357a	<p>Marques, André Augusto Franco, 1976 - Análise morfológica e morfométrica da reação tecidual provocada por pastas endodônticas contendo fração acetato de etila de <i>Pothomorphe umbellata</i> em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos / André Augusto Franco Marques. - - Ribeirão Preto, 2009. 145 f. : il. color.</p>
	<p>Orientador(a): Profa. Dra. Ângela Delfina Bittencourt Garrido.</p>
	<p>Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Biotecnologia. Manaus, 2009.</p>
	<p>1. Biotecnologia. 2. <i>Pothomorphe umbellata</i>. 3. Endodontia. 4. Canal radicular – Tratamento I Título</p>

**Realização**



***Universidade Federal do Amazonas - UFAM***

**Apoio**



***Unidade de Biotecnologia Vegetal  
Universidade de Ribeirão Preto***

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana da Universidade Federal do Amazonas, com apoio da Unidade de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto.**

*Antes de alguém assumir um compromisso, sempre há hesitação, há chances de desistir. Seja qual for o seu sonho, pode começar a realizá-lo. A coragem é inspiradora, poderosa e mágica. Comece agora. (Goeth)*



*Dedicatória*

*Mais um caminho trilhado, o Doutorado.*

*Quando criança ao ver na televisão a opinião de “Doutores” em determinado assunto pensava serem pessoas superdotadas, estarem num patamar inatingível, seres especiais, escolhidos por sua inteligência e habilidade, filhos de importantes figuras do país.*

*Eu, um menino do interior, criado numa família de classe média, nunca conseguiria obter tal titulação.*

*Chegou a hora de escolher a profissão, Odontologia, sempre desejei.*

*Primeira frustração, não conseguia me identificar com nenhuma daquelas disciplinas até então ministradas, será que tinha feito a escolha certa?*

*Primeira aula, uma disciplina nova, odiada por muitos e venerada por outros: Endodontia.*

*Ao ouvir as primeiras explicações do Professor apaixonei-me á primeira vista, era isso, seria Endodontista, começou aí o meu caminho.*

*Especialização, primeiro degrau, meu amor pela Endodontia crescia.*

*Mestrado !*

*Quem me dera, estava longe demais daqueles seres super dotados que via na infância, fui incentivado e preparado pelos meus Mestres, passei.*

*Ao terminar o Mestrado, um novo desafio, ainda maior e mais sonhado, fazer o Doutorado, e numa Universidade Federal, era demais para mim.*

*Despedi-me dos meus familiares, me desfiz dos poucos bens que tinha e mudei para Manaus, com uma mochila nas costas contendo poucas mudas de roupas. Começava aí a busca do meu sonho, no começo foi difícil, mas a vontade era maior.*

*E hoje, chega o dia da realização desse sonho, ser Doutor em Biotecnologia, na Universidade Federal do Amazonas e estudando uma nova medicação para ser utilizada na Endodontia*

*Os seres superdotados ficaram no passado, ficou a lição de humildade, perseverança, luta e dever para com o meu país e meu povo.*

*Professor Doutor André?*

*Não, somente André, não fiz mais do que a minha obrigação, a de contribuir com a formação das pessoas do meu país.*

Este trabalho é dedicado ao meu avô **Ramón Franco** (*in memoriam*), homem que deixou grande exemplo de vida, retidão e coragem. Suas palavras de incentivo e seus conselhos me guiam até hoje. Obrigado querido avô, onde quer que esteja.

*É nesta conquista tão especial, que recordo os momentos vividos com ele. Meu Avô, que já partiu, nunca será esquecido, foi e será para sempre a base da minha vida.*

Dedico à minha mãe, **Nimia Eloisa Franco da Frota** por seu grande esforço pela minha educação. Sei que sonhou e lutou muito para que eu pudesse chegar até aqui. Dificuldades não faltaram, mas não tenho uma lembrança sequer de vê-la triste e derrotada, mas sempre confiante e decidida. Obrigado pelo exemplo de superação incansável que sempre nos dá. Te amo muito.

*Seus braços sempre se abrem quando preciso de um abraço. Teu coração sabe compreender quando preciso de uma amiga. Teus olhos sensíveis se endurecem quando preciso de uma lição. Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar.*

Ao meu pai **André Loureiro Marques**, que me deu apoio incondicional para a realização deste projeto. Pai, sem a sua importante ajuda e incentivo não teria conseguido vencer mais esse desafio. Amo você.

*Quando nasci meu pai, às vezes, aparecia para aplaudir minhas conquistas, quando me ia fazendo maior, era uma figura que me ensinava a diferença entre o mau e o bem. Durante minha adolescência era a autoridade que punha limites a meus desejos. Agora que sou adulto, é o melhor conselheiro e amigo que tenho.*

A minha avó **Jacyra Pissini**, por todos os cuidados e amor dedicados a mim até hoje. Seu carinho e amparo sempre serão exemplos para minha vida. Se amanhã serei Doutor, foi graças às horas sentadas à mesa comigo me ensinando a ler e a somar. Te amo.

À minha querida esposa **Renata Casemiro Franco**, razão das minhas vitórias e minha segurança. Flor bela, que apesar dos pequenos caules e frágeis pétalas, consegue ser resistente, decidida e ainda servir de abrigo nas grandes tormentas. Te amo

*Apenas em torno da mulher que ama se pode formar uma família.*

*F. Schlegel*

Aos meus irmãos **Fabrizio Franco Marques** e **Matheus Franco da Frota**, grandes amigos e companheiros de conquistas, agradeço muito a vocês, queridos irmãos.

*Não somos irmãos por que dividimos o mesmo teto ou a mesma mesa, mas sim por dividirmos as mesmas dificuldades de todo dia.*

Ao meu tio e padrinho querido, **João Augusto Franco**, muito obrigado pela sua ajuda e exemplo de simplicidade.

Ao Antônio **César da Frota**, pela ajuda e incentivo, e por ser o primeiro a mencionar a frase que muito sugere.

*O que nunca poderão tomar-nos é o conhecimento.*

À **Maria Aparecida Gomes de Freitas** meus sinceros agradecimentos. Obrigado pela amizade, compreensão e apoio.



*Agradecimientos*

Aos meus orientadores **Profa. Dra. Angela D. B. Garrido e Prof. Dr. Raphael Carlos Comelli Lia**, pela brilhante orientação e imensa disposição em me ajudar, abrindo as portas de suas casas e ambiente de trabalho, deixando de lado seus afazeres a familiares para que eu pudesse realizar este trabalho. Muito obrigado.

Aos meus Grandes Mestres, responsáveis pela minha formação na Endodontia, **Prof. Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho, Prof. Dr. Manoel. D. Sousa Neto, Prof. Dr. Luiz Pascoal Vansan e Prof. José Antônio Brufato Ferraz**. Devo muito a vocês. Obrigado.

*Se enxerguei mais longe, foi por que me apoiei no ombro de gigantes.*

*I. Newton*

Ao **Dr. Paulo César Felipe Franco e Naira Casemiro Franco**, por terem me recebido de forma especial em sua família e não medirem esforços para ajudar-me.

Aos Coordenadores do Curso de Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, **Profa. Dra. Tânia Miranda Chicre Alcântara e Prof. Benedito dos Santos Taveira** pela confiança em mim depositada frente à Coordenação da disciplina de Endodontia, aconselhamentos e ajuda durante a realização do curso de Doutorado.

Aos **Professores da disciplina de Endodontia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA**, pela convivência agradável e apoio durante os momentos que tive de me ausentar para realizar este trabalho.

A todos os **Colegas e Professores do Curso de Doutorado em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM**, muito obrigado pela convivência agradável e a todos os ensinamento passados durante o curso que muito contribuíram para a minha formação de Doutor.

Ao amigo ***Prof. Lucas da Fonseca R. Garcia*** pela ajuda incansável na realização deste e de outros trabalhos.

Ao ***Prof. Danilo A. de Oliveira, Prof. Fabricio Kitazono de Carvalho e Prof. Lioney Nobre Cabral*** pelos materiais, orientações e artigos científicos cedidos para a elaboração deste estudo.

Aos amigos ***Prof. Dr. Emilio C. Sponchiado Jr. e Profa. Juliana Vianna Pereira,*** que não pouparam esforços para ajudar-me na realização deste trabalho. Obrigado pela confiança e pela ajuda nas conquistas relacionadas ao ensino da Endodontia nesta cidade.

Ao ***Prof. Dr. José Odair Pereira e Profa. Dra. Suzeley de Castro França*** pela confiança, incentivo e ajuda inestimável na realização do Doutorado.

Ao ***Prof. Celso Bernardo de Souza Filho,*** pelo grande auxílio na parte estatística deste trabalho.

À ***Rosemary Alexandre e Sarazete Pereira,*** técnicas do Laboratório de Patologia e Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP, que com atenção, paciência e carinho, sempre estiveram dispostas a ajudar.

Aos ***Professores e Suplentes*** da banca examinadora de qualificação e defesa pela disposição em ajudar e engrandecer cientificamente este trabalho.

Às ***Funcionárias do Centro de Apoio Multidisciplinar em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas*** pela atenção e profissionalismo demonstrado durante a minha estada nesta Universidade.



*Resumo*

## RESUMO

Diversas substâncias químicas são utilizadas na Endodontia como medicação intracanal, visando à diminuição do contingente bacteriano presente em dentes com necrose pulpar. No presente estudo foram analisadas comparativamente 4 pastas medicamentosas, a saber: hidróxido de cálcio + propilenoglicol (Grupo 1), fração acetato de etila de *Pothomorphe umbellata* + propilenoglicol (Grupo 2), fração acetato de etila de *Pothomorphe umbellata* + propilenoglicol + hidróxido de cálcio (Grupo 3), fração acetato de etila de *Pothomorphe umbellata* + propilenoglicol + hidróxido de cálcio+ óxido de zinco (Grupo 4). Para tanto, 15 ratos machos pesando em média 250 g foram distribuídos de acordo com os períodos experimentais: 7, 21 e 42 dias. As pastas foram veiculadas em tubos de polietileno, que por sua vez foram implantados em tecido subcutâneo de ratos, na região dorsal, sendo 2 escapulares e 2 pélvicos, num total de 4 por animal. Decorridos os períodos estipulados, os animais foram ortotamizados e os tecidos foram processados em laboratório para a obtenção dos cortes histológicos, para posterior análise histopatológica. Os resultados foram classificados quanto à severidade da reação inflamatória e quantificados com relação ao número de células presentes em áreas pré-determinadas. Os resultados demonstraram a diminuição da resposta inflamatória e boa tolerância tecidual no decorrer dos períodos experimentais. A atividade macrofágica exercida por fagócitos mononucleares e células gigantes inflamatórias mostrou-se acentuada nos períodos iniciais com queda nos períodos finais e aceitável potencial irritativo no decorrer dos períodos estudados. A análise estatística demonstrou não haver diferença estatística significativa entre as pastas testadas em relação aos eventos histopatológicos avaliados, porém ocorreu diferença estatística significativa em relação aos eventos histopatológicos quando comparados os diferentes tempos experimentais. Conclui-se que as pastas contendo a fração acetato de etila de *Pothomorphe umbellata* apresentaram aceitável potencial irritativo quando utilizada em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

Palavras –chave: *Pothomorphe umbellata*, Endodontia, Tratamento do canal radicular



*Abstract*

## ABSTRACT

Several chemical substances are used in endodontics as intracanal medication, aiming at diminishing the bacterial contingent present in teeth with pulp necrosis. In this study 4 medicinal pastes were comparatively analyzed, namely: Calcium hydroxide + propylene glycol (Group 1), ethyl acetate fraction of *Pothomorphe umbellata* + propylene glycol (Group 2), ethyl acetate fraction of *Pothomorphe umbellata* + propylene glycol + calcium hydroxide (Group 3), ethyl acetate fraction of *Pothomorphe umbellata* + propylene glycol + calcium hydroxide + zinc oxide (Group 4). For this purpose, 15 male rats weighing 250 g in average were distributed in accordance with the experimental periods: 7, 21 and 42 days). The pastes were administered via polyethylene tubes that were then implanted in the subcutaneous tissue of rats, in the dorsal region, being 2 scapular and 2 pelvic regions totalizing 4 tubes per animal. After the stipulated periods, the animals were sacrificed and the tissues were processed in a laboratory to obtain the histological cuts for future histopathologic analysis. The results were classified regarding severity of the inflammatory reaction and quantified with regard to the number of cells present in pre-determined areas. The results showed diminishment of inflammatory response and good tissue tolerance during the course of experimental periods. Macrophagic activity carried out by the mononuclear phagocytes and giant inflammatory cells showed to be accentuated in the initial periods decreasing in the final periods and irritant potential becoming acceptable during the course of the periods studied. Statistical analysis showed no significant statistical difference between the pastes tested in comparison with the histopathologic events assessed, but there was a significant statistical difference regarding the histopathologic events when compared with the different experimental moments. It may be concluded that the pastes with ethyl acetate fraction of *Pothomorphe umbellata* presented an acceptable irritant potential when used in the subcutaneous conjunctive tissue of rats.

Descriptors: *Pothomorphe umbellata*, Endodontics, Root canal treatment.



*Lista de Ilustrações*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	(A) Coleção de plantas para pesquisa da UNAERP, (B) <i>Pothomorphe umbellata</i> .....	46
Esquema 1.	Obtenção da tintura e frações das folhas de <i>P. umbellata</i> .....	47
Figura 2.	Coluna 1.....	49
Figura 3.	Amostras aplicadas em placa de vidro.....	50
Figura 4.	Sequencia de manipulação da pasta de hidróxido de cálcio + Propilenoglicol....	52
Figura 5.	Preenchimento do tubo de polietileno com a pasta medicamentosa com auxílio de lântulo.....	52
Figura 6.	(A) Incisão realizada no dorso do rato; (B) Inserção do tubo de polietileno.....	54
Esquema 2.	Esquemática para implantação dos tubos.....	55
Figura 7.	(A) Dissecção do tecido; (B) Peça removida e fixada em formalina a 10%.....	56
Figura 8.	Regiões a serem determinadas para contagem (morfometria) dos eventos histopatológicos.....	58
Figura 9.	Imagem da tela do computador mostrando o Software <i>Image Tool</i> que será utilizado para aferir a área da cápsula reacional.....	59
Figura 10.	Grupo controle – 7 dias – Reação verificada em área representativa da lateral do tubo de polietileno, com índice geral da inflamação considerado moderado. H. E. Nikon 120 X.....	64
Figura 11	Grupo 1 - 7 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado intenso. H.E. Nikon 120 X. ....	64
Figura 12.	Grupo 2 - 7 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado intenso. H.E. Nikon 120 X. ....	65
Figura 13.	Grupo 3 - 7 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado intenso. H.E. Nikon 120 X. ....	65
Figura 14.	Grupo 4 - 7 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado intenso. H.E. Nikon 120 X. ....	66

Figura 15.	Grupo Controle - 21 dias - Reação verificada em área representativa da lateral do tubo de polietileno, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120 X.....	70
Figura 16.	Grupo 1 - 21 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.....	70
Figura 17.	Grupo 1 - 21 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado moderado. H.E. Nikon 120X.....	71
Figura 18.	Grupo 3 - 21 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado moderado . H.E. Nikon 120X.....	71
Figura 19.	Grupo 4 - 21 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.....	72
Figura 20.	Grupo Controle - 42 dias - Reação verificada em área representativa da lateral do tubo de polietileno, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.....	76
Figura 21.	Figura 23 - Grupo 1 - 42 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.....	76
Figura 22.	Grupo 2 - 42 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.....	77
Figura 23.	Grupo 3 - 42 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.....	77
Figura 24.	Grupo 4 - 42 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.....	78



*Lista de Tabelas e Gráficos*

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1.	Esquema de eluição para obtenção de sub-frações da fração acetato de etila de <i>P. umbellata</i> .....	48
Tabela 2.	Esquema de eluição para purificação da sub-fração Hex:AcOEt 30:70 oriunda da coluna 1.....	49
Gráfico 1.	Eventos histopatológicos encontrados no período de 7 dias. ....	63
Tabela 3.	Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 7 dias.....	63
Gráfico 2.	Eventos histopatológicos encontrados no período de 21 dias. ....	69
Tabela 4.	Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 21 dias.....	69
Gráfico 3.	Eventos histopatológicos encontrados no período de 42 dias. ....	75
Tabela 5.	Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 42 dias.....	75
Tabela 6.	Médias da quantidade de células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares encontrados nos três períodos estudados.....	79
Tabela 7.	Valores da análise de variância para o número de polimorfonucleares presentes nas amostras no período de 21 dias. ....	80
Tabela 8.	Valores da análise de variância para o número de polimorfonucleares presentes nas amostras no período de 7 dias. ....	81
Tabela 9.	Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de polimorfonucleares presentes nas amostras no período de 42 dias. ....	81
Tabela 10.	Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para polimorfonucleares.....	82
Tabela 11.	Teste de Dunn para o número de polimorfonucleares nos diferentes tempos experimentais.....	83
Tabela 12.	Médias da quantidade de fibroblastos encontrados nos três períodos estudados. ....	84

Tabela 13. Valores da análise de variância para o número de fibroblastos presentes nas amostras no período de 7 dias. ....	85
Tabela 14. Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de fibroblastos presentes nas amostras no período de 21 dias. ....	85
Tabela 15. Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de fibroblastos presentes nas amostras no período de 42 dias. ....	86
Tabela 16. Tabela 16 - Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para fibroblastos. ....	87
Tabela 17. Teste de Dunn para o número de fibroblastos nos diferentes tempos experimentais.....	87
Tabela 18. Médias da quantidade de vasos sanguíneos encontrados nos três períodos estudados. ....	88
Tabela 19. Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de vasos sanguíneos presentes nas amostras no período de 7 dias. ....	89
Tabela 20. Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de vasos sanguíneos presentes nas amostras no período de 21 dias. ....	89
Tabela 21. Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de vasos sanguíneos presentes nas amostras no período de 42 dias. ....	90
Tabela 22. Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para vasos sanguíneos. ....	91
Tabela 23. Teste de Dunn para o número de vasos sanguíneos nos diferentes tempos experimentais.....	91
Tabela 24. Médias da quantidade de macrófagos encontrados nos três períodos estudados. ....	92
Tabela 25. Análise de variância para o número de macrófagos no período de 7 dias.....	93
Tabela 26. Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de macrófagos presentes nas amostras no período de 21 dias.....	94
Tabela 27. Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de macrófagos presentes nas amostras no período de 42 dias.....	94

Tabela 28.	Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para macrófagos.	95
Tabela 29.	Teste de Dunn para o número de macrófagos nos diferentes tempos experimentais.....	95
Tabela 30.	Médias da quantidade de células gigantes inflamatórias encontrados nos três períodos estudados.....	96
Tabela 31.	Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de células gigantes inflamatórias presentes nas amostras no período de 7 dias.....	97
Tabela 32.	Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de células gigantes inflamatórias presentes nas amostras no período de 21 dias.....	97
Tabela 33.	Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de células gigantes inflamatórias presentes nas amostras no período de 42 dias.....	98
Tabela 34.	Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para células gigantes inflamatórias.....	99
Tabela 35.	Teste de Dunn para o número de células gigantes inflamatórias nos diferentes tempos experimentais. ....	99
Tabela 36.	Médias da medida da área da cápsula reacional (mm <sup>2</sup> ) gerada nos três períodos estudados.....	100
Tabela 37.	Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para a área da cápsula reacional gerada pelos grupos testados no período de 7 dias. ....	101
Tabela 38.	Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para a área da cápsula reacional gerada pelos grupos testados no período de 21 dias. ....	101
Tabela 39.	Valores da análise de variância para a área da cápsula reacional encontrada nas amostras no período de 42 dias .....	102
Tabela 40.	Teste de Dunn para a área da cápsula reacional nos diferentes tempos experimentais.....	102
Gráfico 4.	Involução da área da cápsula reacional nos diferentes períodos experimentais.	103



## *Sumário*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
1 - Biocompatibilidade do hidróxido de cálcio: .....	23
2 - <i>Pothomorphe ubellata</i> .....	35
<b>PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>
1 - Preparo dos extratos de <i>Pothomorphe umbellata</i> .....	46
2 - Cromatografia em coluna para fracionamento da fração acetato de etila .....	48
3 - Preparo das pastas medicamentosas.....	50
4 - Obtenção dos tubos de polietileno .....	53
5 - Preparo dos animais para o estudo .....	53
6 - Implante dos corpos-de-prova com as pastas testadas .....	53
7 - Biópsia dos tecidos.....	55
8 - Tramitação laboratorial .....	56
9 - Análise Histopatológica .....	57
10 - Análise estatística.....	59

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
1 - Análise Morfológica e Morfométrica.....	60
2 - Análise estatística dos dados obtidos na morfometria .....	78
3 - Infiltrado Inflamatório.....	79
4 - Celularidade .....	83
5 - Vascularização .....	88
6 - Atividade macrofágica .....	92
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>127</b>
1 - Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados. ....	127
2 - Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados. ....	133
3 - Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados. ....	139
4 - Determinação dos escores empregados para os eventos histopatológicos encontrados.....	145



## *Introdução*

## **INTRODUÇÃO**

O sucesso da terapia endodôntica depende da realização adequada do protocolo clínico. Inúmeros são os fatores que interferem no sucesso de tal terapia. Segundo Otoboni Filho (2000) existe uma relação direta entre a presença de microrganismos previamente à obturação do canal radicular e o insucesso do tratamento.

Sendo assim, a limpeza do sistema de canais radiculares ocorre por meio da ação mecânica dos instrumentos endodônticos que, associada às propriedades físico-químicas das soluções irrigantes, apresentam grande importância, pois eliminam agentes irritantes como bactérias, seus produtos e restos de tecido pulpar, proporcionando um ambiente favorável ao reparo dos tecidos periapicais (MARQUES et al., 2006; FIGDOR; SANDQVIST, 2007; MARQUES et al., 2008).

Entretanto, as variações da anatomia interna dos canais radiculares podem interferir no sucesso do preparo biomecânico. O achatamento dos canais, por exemplo, dificulta a execução das técnicas de instrumentação, favorecendo a persistência de remanescentes teciduais em istmos, reentrâncias e ramificações (MARQUES et al., 2008; SBERNA et al., 2009).

Em condições clínicas, o preparo biomecânico no sistema de canais radiculares não elimina por completo os microrganismos presentes, havendo necessidade da ação da medicação intracanal, com efetiva atividade antimicrobiana para que ocorra o sucesso do tratamento endodôntico (EVANS et al., 2003).

Neste sentido, Otoboni Filho (2000); Tanomaru Filho et al. (2002); Briso (2006); Leonardo et al. (2006) enfatizaram a necessidade da medicação intracanal com o objetivo de combater bactérias presentes nas ramificações do sistema de canais radiculares e erosões da

superfície cementária apical que não foram eliminadas durante o preparo biomecânico, proporcionando assim um ambiente favorável ao reparo dos tecidos periapicais.

A medicação mais indicada para atuar contra as bactérias presentes nos canais infectados é o hidróxido de cálcio, que tem sido amplamente utilizado como medicamento devido as suas propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias (LEONARDO et al., 2000; ESTRELA et al., 2003), solvente de matéria orgânica (FOREMAN; BARNES, 1990), indutora de tecido mineralizado (HOLLAND; SOUZA, 1985) e apoio à reparação tecidual, além de neutralizar as endotoxinas ou lipopolissacarídeos, presentes na parede celular das bactérias (LEONARDO, 2000; SIQUEIRA JR et al., 2008) . Diante da persistência da lesão apical e da não cicatrização da região periapical, podemos encontrar microrganismos resistentes ao preparo biomecânico e à ação do hidróxido de cálcio.

Dentre esses microrganismos encontra-se o *Enterococcus faecalis*, por ser capaz de resistir ao tratamento pela capacidade de multiplicar-se em pH alcalino, pois tal patógeno pode sobreviver em pH variando de 2 a 10 (WALTIMO et al., 1999; EVANS et al., 2002), sobrevive em ambientes hipotônicos, hipertônicos, ácidos, alcalinos, em ambientes com falta de nutrientes, além de possuírem mecanismos de aderência nas células do hospedeiro (GOMES et al., 2006; SPONCHIADO JR, 2006; SIQUEIRA JR et al., 2008), esta bactéria é frequentemente encontrada nos casos considerados refratários.

Na Endodontia há uma busca incessante pela melhoria e aperfeiçoamento da prática odontológica por meio da pesquisa e desenvolvimento de novos materiais e instrumentais.

O importante crescimento mundial da fitoterapia dentro de programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas. Segundo LORENZI; MATOS (2002), o hábito de empregar o uso de plantas no restabelecimento da saúde pelos próprios membros da comunidade, comum a todos os povos e quase esquecido por décadas, vem, nos últimos anos, se tornando a cada dia mais intenso no mundo civilizado.

Algumas pesquisas envolvendo fitoterápicos na Odontologia estão sendo realizadas, como as investigações da compatibilidade biológica do óleo - resina da *Copaifera multijuga* associado ao hidróxido de cálcio bem como sua análise fotoquímica foram estudados por Bandeira et al. (1999a, 1999b) e Bandeira (2000) e a atividade antimicrobiana por Abnader (2005). A *Copaifera Multijuga* também teve suas propriedades antimicrobianas estudadas sobre os microrganismos da microbiota endodôntica (GARRIDO et al., 2004) e como constituinte de um cimento endodôntico, (GARRIDO et al., 2006a; 2006b, 2006c), também realizou-se estudos com a planta *Arctium lappa* (PEREIRA, 2005) e Barbatimão (SPONCHIADO JR, 2007), cujos extratos exibiram atividade antimicrobiana sobre microrganismos encontrados no interior de canais radiculares.

Sponchiado Junior et al. (2006) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de uma medicação intracanal a base de *Pothomorphe umbellata* para controle do *Enterococcus faecalis*. A fração acetato de etila e suas subfrações obtidas do extrato da planta estudada apresentaram 2 ativos antimicrobianos capazes de inibir o crescimento do *E. faecalis*, demonstrando grande potencial para ser constituinte de uma nova medicação intracanal para uso na Endodontia.

O gênero *Pothomorphe* é constituído de um número pequeno de espécies. Diversos autores acreditam que o número de espécies deste gênero não ultrapasse meia dezena (YUNKER, 1960). Este gênero inclui plantas de porte arbustivo ou herbáceo, providas de folhas largas de contorno arredondado, base cordiforme ou peltada e ápice acuminado. Suas flores acham-se reunidas em inflorescências densas espiciformes e situadas nas axilas de pecíolos dilatados em bainhas (MORAES et al., 1987). No Brasil ocorrem duas espécies: *P. umbellata* e *P. peltata*, ambas conhecidas pelos nomes vulgares de pariparoba e de caapeba e empregadas no tratamento de diversas enfermidades, por suas atividades coleréticas, colagogas, gástricas, antiepilética, antimalárica e no tratamento de diabetes e doenças

hepáticas (COIMBRA, 1958; AMORIM et. al., 1986; FELZENSZWALB et al., 1987; ANDRADE-NETO et al., 2007).

Diante do exposto, o presente trabalho visa avaliar, de modo preliminar, a compatibilidade tecidual da fração acetato de etila de *Pothomorphe umbellata* e suas associações com o hidróxido de cálcio e óxido de zinco com o propósito de viabilizar futuramente a sua aplicação na Odontologia.



*Revisão da Literatura*

## REVISÃO DA LITERATURA

Para um melhor entendimento da revisão da literatura, este capítulo será abordado em duas partes: 1 - Trabalhos relacionados à biocompatibilidade do hidróxido de cálcio; 2 – Trabalhos relacionados com a *Pothomorphe umbellata*.

### 1 - Biocompatibilidade do hidróxido de cálcio:

Herman (1920) introduziu o hidróxido de cálcio na Odontologia, e o recomendou para recobrimento ou proteção de polpas expostas, surgindo uma nova época na Odontologia: a preservação da polpa dental. Apresentou a formulação do produto “CALXYL”, uma pasta a base de hidróxido de cálcio preparada com solução aquosa de cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, bicarbonato de potássio e de bicarbonato de sódio. Realçou na ocasião, sua boa tolerância tissular, associada à ação bactericida dessa substância, atribuindo estas propriedades ao seu conteúdo de íons hidroxila e ao pH fortemente alcalino, em torno de 12,8.

Rhoner (1940) utilizou pela primeira vez o hidróxido de cálcio como substância obturadora do canal radicular (Calxyl), realizando pulpectomia em 20 dentes humanos, destes, 18 foram analisados histologicamente. Treze casos foram considerados como sucesso, evidenciado o autor, através da análise histológica a formação de barreira mineralizada ao nível apical dos dentes pulpectomizados e obturados com uma formulação de pasta a base de hidróxido de cálcio.

Mitchel; Shankwalker (1958) avaliaram o potencial osteogênico do hidróxido de cálcio, quando nesta ocasião implantaram no tecido subcutâneo de ratos, diversos materiais, sendo um deste contendo hidróxido de cálcio misturado com água destilada. Através de

análise histopatológica, pela coloração de Von Kossa, observou-se na maioria dos corpos-de-prova calcificações heterotópicas ao redor dos cilindros de hidróxido de cálcio decorridos dez dias de sua implantação, mostrando que o hidróxido de cálcio tem importante ação na indução da formação de osso ectópico na execução desta técnica.

Mitchell (1959) avaliou o poder de irritação de materiais utilizados em Odontologia, implantando hidróxido de cálcio em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. O referido autor utilizou matrizes plásticas com 2 mm de diâmetro e 2 mm de comprimento produzindo então os materiais que seriam implantados no tecido conjuntivo subcutâneo do animal. A análise histopatológica foi realizada nos períodos de 2, 14 e 28 dias. A reação ao hidróxido de cálcio foi considerada demorada, sendo primeiramente apresentada uma zona de necrose circunjacente ao material, contornada por uma reação inflamatória e formação de uma cápsula fibrosa, tornando mais evidente aos 16 dias, ocasionando então uma reação inflamatória moderada com presença de tecido osteóide.

Yoshiki; Mori (1961) utilizaram cilindros e pastas de hidróxido de cálcio implantados em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, no qual puderam observar uma necrose superficial, ocorrendo logo abaixo desta necrose um arranjo estrutural de coloração basófila envolvida de tecido fibroso, corada positivamente pelo Von Kossa pelo nitrato de Urânio, demonstrando a presença de calcificações nesta região logo a partir do sétimo dia.

Holland et al. (1971) realizaram estudo histopatológico do comportamento de tecido subcutâneo do rato ao implante de alguns materiais obturadores de canal radicular, através da proporção pó-líquido sendo os seguintes materiais: hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol, composto de Rickert, composto de Wach, cloropercha, alphacanal e pyocidina. Foram utilizados 128 ratos, que foram operados e sacrificados após 5, 10 e 30 dias, com remoção das peças e fixação das mesmas em formalina a 10%. Após a fixação as peças foram cortadas e coradas em H/E. Os resultados demonstraram que o hidróxido de cálcio e o

composto de Rickert foram os materiais que apresentaram os melhores comportamentos com relação aos demais compostos estudados.

Provêncio (1982) analisou pastas à base de hidróxido de cálcio, utilizado para a obturação de canais radiculares, implantando no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, túbulos de dentina contendo misturas de pastas diferentes à base de hidróxido de cálcio, e sacrificando-os em períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, avaliando comparativamente as pastas através de análise histopatológica pela coloração com hematoxilina e eosina e tricrômico de Gomori, além da variação no potencial de reparação. A autora concluiu que todos os materiais testados, mesmo tendo um comportamento irritante, permitiram a evolução por colageinização da cápsula na sucessão dos períodos e que a lipossolubilidade do óleo mineral nujol interfere e retarda a provável indução da mineralização do hidróxido de cálcio.

Holland et al. (1985) avaliaram a habilidade do cimento obturador a base de hidróxido de cálcio para induzir a reparação tecidual. Utilizaram canais achatados de cães e macacos que foram obturados com Sealapex, Kerr e hidróxido de cálcio. Como controle, alguns canais foram deixados vazios. Após 6 meses, os animais foram sacrificados, os dentes removidos e preparados para análise histopatológica. O Sealapex e o hidróxido de cálcio induziram o fechamento apical pela deposição de cimento. O fechamento foi mais frequentemente observado nos casos com pulpectomia parcial do que nos casos com pulpectomia total.

Maurício et al. (1986/1987) realizaram um estudo histomorfológico em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, com implante de pasta de hidróxido de cálcio contida em tubos de dentina humana no período de 30, 60, 90 e 120 dias, e observaram os autores que as misturas correspondentes aos grupos I, II e III comportaram-se como irritantes ao tecido conjuntivo subcutâneo de rato, possibilitando, no entanto uma cápsula em colagenização progressiva no decorrer dos períodos; em ordem crescente de agressividade determinada pela histocompatibilidade, tem-se: Grupo II (hidróxido de cálcio + lipiodol), Grupo III (hidróxido

de cálcio + PMCC) e o Grupo I (hidróxido de cálcio + polietilenoglicol 400); massas amorfas, sugerindo estruturas mineralizadas ectópicas foram observadas nos Grupos I e III. Concluíram ainda que o lipiodol ultrafino interferiu nas propriedades do hidróxido de cálcio.

Birman et al. (1990) avaliaram as propriedades físicas e biológicas de um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio (Sealapex) através de sua histocompatibilidade, revestindo o cimento estudado com lamínulas de vidro, implantando-as em tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos, sendo que estes foram sacrificados aos períodos de 3, 7, 15, 30 e 60 dias. Os autores evidenciaram que houve uma reação tecidual inflamatória marcante, persistindo reação inflamatória mononuclear difusa, e que em 60 dias foi observada reação local de corpo estranho.

Foreman; Barnes (1990) realizaram uma revisão sobre o hidróxido de cálcio, evidenciando suas principais ações quando utilizado como medicação intracanal. Os autores afirmaram que o hidróxido de cálcio é o material de eleição no controle de infecções, atuando em regiões não atingidas pelas soluções irrigantes; reduz a infiltração de fluidos periapicais para dentro do canal, devido à formação de uma barreira fibrosa formada quando a medicação entra em contato direto com os tecidos, por contração dos capilares sanguíneos ou simplesmente por bloqueio mecânico; proporciona o fechamento apical de dentes não vitais, por desenvolvimento continuado da raiz, ou por formação de uma barreira calcificada de mineralização do tecido através do forame apical; tratamento de reabsorções inflamatórias interna e externa, com finalidade de parar o processo e estimular a reparação e para o reparo de perfuração radicular.

Leonardo et al. (1994) avaliaram radiograficamente o reparo apical e periapical em dentes de cães com lesões crônicas, experimentalmente induzidas após dois tipos de tratamentos clínicos e compararam a presença de microrganismos em cortes seriados, coloridos pelo método de Brown-Brenn da região apical e periapical. No grupo 1 utilizaram

como irrigação o hipoclorito de sódio 4-6% e como medicação intracanal o hidróxido de cálcio. O grupo 2 teve como solução irrigante a Solução de Dakin e não recebeu medicação intracanal. Os resultados evidenciaram que houve uma marcante redução ou mesmo desaparecimento da área radiolúcida com maior sucesso para o grupo 1. A extensão da invasão bacteriana nos túbulos dentinários foi maior e mais intensa no grupo 2. A quantidade de microrganismos detectados nas ramificações e no lúmen do canal foi intensa no grupo 2 e mediana ou ausente no grupo 1. Os autores afirmaram que a medicação penetrou em áreas não alcançadas por instrumentos e soluções irrigantes e também agiu como uma barreira física prevenindo a reinfecção, ou mesmo reduzindo o risco de proliferação de bactérias residuais.

Economides et al. (1995) estudaram a biocompatibilidade de quatro cimentos endodônticos, a saber: Sealapex, CRCS, AH-26 e Roth 811, e a influência do zinco e cálcio presentes em sua composição em vários órgãos, como cérebro, fígado, rins e útero. Para este estudo, foram implantados tubos de teflon em 75 ratos e usado um tempo de observação de 7, 14 e 21 dias. Após estes períodos a região onde estavam os tubos foi removida para estudo histopatológico. Os órgãos dos animais foram retirados apenas dos ratos no primeiro período (7 dias), onde foram analisadas as concentrações de zinco e cálcio, por meio da espectrofotometria. Concluiu-se que o cimento AH-26 provocou maior reação inflamatória no primeiro período, diminuindo com o tempo, os cimentos Roth 811 e Sealapex provocaram reação de suave a moderada. Ainda de acordo com este estudo, os cimentos CRCS e Roth 811 induziram redistribuição de zinco nos órgãos removidos e o cimento AH-26 induziu mudanças na quantidade de cálcio dos mesmos.

Mittal et al. (1995) estudaram a toxicidade tecidual em tecido subcutâneo de ratos, de quatro cimentos obturadores: Tubli-seal, Sealapex, Óxido de zinco e eugenol, Endoflas F. S. Foi observado que o cimento à base de Óxido de zinco e eugenol, Tubli-seal e Endoflas F. S. diminuíram a reação inflamatória de acordo com o aumento do tempo de controle, e neste

mesmo período, o cimento Sealapex, mostrou a menor reação inflamatória se comparado aos outros cimentos. Após o período de três meses, nenhum dos cimentos mostrou reação inflamatória.

Jacobovitz (1996) analisou a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de 32 ratos, implantando tubos de dentina preenchidos com cimentos à base de hidróxido de cálcio: Sealapex, Apexit, CRCS e Sealer-26. Biópsias foram feitas em períodos de 7, 28, 60 e 90 dias do procedimento cirúrgico. Os autores concluíram que, em ordem crescente de agressividade dos materiais, estão: Sealer-26 e Sealapex, CRCS e, por fim Apexit.

Kolokouris et al. (1998) estudaram *in vivo* a biocompatibilidade de dois cimentos obturadores implantados em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos sendo eles: Apexit (cimento à base de hidróxido de cálcio) e cimento à base de óxido de zinco e eugenol. Os autores utilizaram 44 ratos do tipo Wistar, implantando tubos de teflon com os respectivos cimentos no dorso dos ratos, com remoção dos implantes nos períodos de 5, 15, 60 e 120 dias, para posterior avaliação histopatológica. Concluíram os autores que houve reações severas de inflamação com relação ao Apexit nos períodos de 5 e 15 dias. A intensidade da reação mostrou-se diminuída a partir do período de 60 dias com queda progressiva até o período final. Foi observada presença pequena de macrófagos nos quatro períodos estudados. Uma inflamação de severa a moderada foi encontrada com áreas confinadas de necrose com relação ao cimento endodôntico convencional ao período de 5 dias. A intensidade da reação, com este cimento, diminuiu nos períodos de 15, 60 e 120 dias.

Bandeira et al. (1999a) realizaram análise fitoquímica através de cromatografia gasosa da *Copaifera multijuga*, visando identificar seus principais componentes e ainda obtiveram as frações deste óleo através de destilação, com o intuito de utilizá-las como veículo ao hidróxido de cálcio. Concluíram que o óleo de *C. multijuga* apresentou em sua composição

vários sesquiterpenos, principalmente  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, bisaboleno, cedreno e cadieno.

Bandeira et al. (1999b) investigaram a compatibilidade biológica do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga*, associados ao hidróxido de cálcio, haja vista as propriedades medicinais desse óleo. As pastas experimentais de hidróxido de cálcio associadas ao óleo essencial ou à resina foram confeccionadas na proporção 1:1. Pasta de hidróxido de cálcio mais polietilenoglicol 400 foi utilizada como controle. A biocompatibilidade foi avaliada utilizando-se 60 primeiros molares superiores de 30 ratos, com o objetivo de avaliar a reação pulpar das pastas experimentais utilizadas como agente de capeamento nos períodos de 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Analisando comparativamente a evolução dos eventos histopatológicos foi possível sugerir que, em todos os períodos, a pasta de hidróxido de cálcio mais óleo essencial apresentou melhor desempenho ao exame histopatológico, seguida das pastas de hidróxido de cálcio mais polietilenoglicol 400 e hidróxido de cálcio mais resina.

Bandeira (2000) analisou comparativamente a compatibilidade biológica do óleo essencial e do óleo in natura da *Copaifera multijuga* associados ao hidróxido de cálcio em capeamento pulpar de dentes de cães. Após a coleta “in locu” do referido óleo, foi realizada a análise química dos seus componentes por meio da cromatografia gasosa de alta resolução, acoplada a espectrometria de massas, a seguir obtiveram o óleo essencial por meio da destilação tipo CLAVENGER. Para avaliação histopatológica, utilizou-se 6 cães, sem raça definida, com peso variando entre 10 e 15 quilos. Foram utilizados 54 dentes, entre caninos e pré-molares, distribuídos em 3 grupos com 2 cães, utilizando-se 2 animais para cada período operatório. Os capeamentos pulpares foram realizados empregando pastas experimentais distintas na proporção de 1:1 de hidróxido de cálcio + óleo essencial (grupo I), Hidróxido de cálcio + óleo “in natura” (grupo II) e hidróxido de cálcio + polietilenoglicol 400 (grupo III -

controle) nos períodos de 7, 45 e 90 dias. A autora concluiu que o grupo controle (III) apresentou melhor desempenho na formação da barreira mineralizada na maioria dos casos, no período de 90 dias, seguido pelo grupo II e grupo I.

Holland et al. (2001) estudaram o cimento Portland, MTA e hidróxido de cálcio, associados a água destilada, inseridos em tubos de dentina e implantados em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Para controle foram implantados tubos de dentina vazios em 10 animais. Após 7 e 30 dias de implantação dos tubos, os animais foram sacrificados, os tubos e tecidos circundantes foram removidos e preparados para análise histopatológica para tecidos mineralizados. Os resultados foram similares para os três materiais utilizados. Próximo às aberturas dos tubos, foram observadas granulações Von Kossa positivas, birrefringentes à luz polarizada. Junto a essas granulações foi observado um tecido irregular na forma de uma ponte, também Von Kossa positivo. As paredes de dentina dos tubos exibiram uma estrutura altamente birrefringente à luz polarizada, no interior dos túbulos, formando uma camada em diferentes profundidades. Os autores concluíram que os mecanismos de ação do MTA e do cimento Portland, estimulando a deposição de tecido duro, tem alguma similaridade com o mecanismo de ação do hidróxido de cálcio.

Tanomaru Filho et al. (2002) estudaram o efeito da solução irrigadora e do curativo de demora à base de hidróxido de cálcio na reparação apical e periapical tecidual, após a realização de tratamento endodôntico em dentes de cães com necrose pulpar e com lesões periapicais crônicas. Setenta e dois canais de 4 cães jovens foram tratados e preparados biomecanicamente, utilizando-se como solução irrigadora hipoclorito de sódio 5,25% e/ou digluconato de clorexidina 2%. Pelo período de 15 dias deixou-se como curativo de demora hidróxido de cálcio, com posterior obturação com cimento endodôntico Sealapex. Os canais radiculares dos grupos 3 e 4 foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (2,5g de hidróxido de cálcio, 1g de óxido de zinco p.a., 0,05g de colofônia, 2,0 ml de polietilenoglicol

400, e 0,04g de paramonoclorofenol canforado – Callen/PMCC), usando-se uma seringa de 5 ml com agulha gengival 27, munida de *stop* de borracha no comprimento de trabalho. Após 7 meses, os animais foram sacrificados por sobredose anestésica, e as secções histológicas obtidas coradas com hemotoxilina/eosina, sendo a reparação apical e periapical analisadas sob microscopia óptica. Os resultados histológicos do reparo foram superiores nos grupos de canais radiculares com curativo de demora, do que nos grupos obturados imediatamente. O Grupo que sofreu irrigação com clorexidina apresentaram resultados superiores em relação ao reparo quando comparados aos dentes irrigados com hipoclorito de sódio.

Walton et al. (2003) avaliaram por meio de questionário e escores, a relação do hidróxido de cálcio com a dor após o tratamento em diferentes períodos. Participaram do estudo, 140 pacientes que tiveram as patologias pulpares e periapicais diagnosticadas. Primeiramente foram realizadas a limpeza e a modelagem do canal radicular até o instrumento número 25, sob irrigação de hipoclorito de sódio a 2,5%. Posteriormente, metade dos dentes recebeu medicação com hidróxido de cálcio, preparado com água e a outra metade recebeu apenas algodão seco. Todos os dentes foram selados com restauração provisória. Os pacientes foram avaliados em relação à dor após 4, 24 e 48 horas em: sem dor, suave, moderada ou severa. Não houve diferença estatística significativa no pós-operatório dos pacientes que receberam hidróxido de cálcio daqueles que não receberam medicação em nenhum período. Os autores concluíram que o uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal não está relacionada à incidência ou severidade da dor pós-operatória.

Nassri et al (2003) realizaram um estudo comparativo *in vivo* da reação tecidual quanto ao uso de diferentes materiais usados em endodontia, a saber: Sealapex (Kerr) e Apexit (Vivadent). Os autores utilizaram 12 ratos, machos, pesando em média 250g e de idade entre 3 e 5 meses, dividindo-os em três grupos de acordo com seu tempo de controle. Durante o procedimento cirúrgico, foram realizadas 4 incisões em cada rato, onde foram

implantados no tecido subcutâneo, quatro tubos de polietileno, preenchidos com os cimentos em teste, sem a ocorrência de espaços vazios. Concluíram os autores, através de análise qualitativa que houve constante atividade macrofágica nos dois grupos, com o Apexit provocando uma reação tecidual mais agressiva com relação ao grupo Sealapex.

Basrani et al. (2004) estudaram as propriedades físico-químicas da clorexidina e do hidróxido de cálcio na forma de gel em diferentes concentrações, avaliando: pH, ângulo de contato, tempo de ação, radiopacidade e viscosidade. O pH foi aferido mediante o uso de um pHmêtro, o ângulo de contato através de um goniômetro, a radiopacidade e o tempo de trabalho foram mensurados de acordo com a *International Organization for Standardization*. A viscosidade foi avaliada usando-se um viscosímetro. Os resultados evidenciaram que a clorexidina não afeta o pH, a radiopacidade e o tempo de trabalho das pastas que contém Hidróxido de Cálcio. Entretanto, ao se adicionar gradativamente a clorexidina, o ângulo de contato e a viscosidade do hidróxido de cálcio são diminuídas significativamente. Os autores concluíram que a combinação da clorexidina ao hidróxido de cálcio apresenta propriedades físico-químicas satisfatórias para serem usadas como medicação intra-canal.

Lee (2004), avaliando pacientes que apresentavam dentes com lesões periapicais de grande extensão, apresentou dois casos em que ocorreu a reparação periapical completa em dentes tratados somente pela terapia endodôntica conservadora, sem a necessidade de intervenção cirúrgica, somente com a utilização de uma troca de medicação à base de hidróxido de cálcio.

Briso (2006) avaliou a resposta biológica de polpas dentais submetidas à dois diferentes materiais de capeamento, o hidróxido de cálcio p.a. e o agregado de trióxido mineral (MTA), aplicados sobre a polpa dental de cães, visando a manutenção da vitalidade e função pulpar. Decorridos seis dias, os animais foram sacrificados e os espécimes foram preparados e analisados por histopatologia. Neste trabalho, os autores observaram que os dois materiais

testados foram eficazes na manutenção da função e vitalidade pulpar, porém, o MTA apresentou melhores resultados quando comparado ao hidróxido de cálcio.

Leonardo et al. (2006) realizaram um estudo histológico do efeito de pastas à base de hidróxido de cálcio na reparação de lesões periapicais em dentes de cães, comparando a obturação endodôntica em sessão única com dentes submetidos ao hidróxido de cálcio nos períodos de 15, 30 e 180 dias.

As pastas de hidróxido de cálcio foram também comparadas ao alendronato por Mori et al. (2007), substância utilizada com o propósito de evitar reabsorções em dentes avulsionados e reimplantados. Foram utilizados 30 dentes incisivos centrais de ratos, instrumentados e irrigados com hipoclorito de sódio a 2%. Os dentes foram removidos e reimplantados e divididos em dois grupos, de acordo com a medicação intracanal testada. Decorridos 15, 30 e 60 dias, os espécimes foram sacrificados e o material testado foi enviado para análise morfológica por meio de microscopia. Os resultados demonstraram que a pasta de hidróxido de cálcio e a solução de alendronato, limitaram a reabsorção radicular, porém, nenhuma das soluções testadas, impediram o surgimento das mesmas. A análise histológica mostrou melhores índices de reparo apical em dentes submetidos à medicação com pasta de hidróxido de cálcio, quando comparadas a dentes tratados em uma única sessão.

Fernandes et al. (2008) estudaram a biocompatibilidade do hidróxido de cálcio e de sistemas adesivos dentinários Single Bond<sup>®</sup> quando utilizados no capeamento pulpar direto em tecido dental de cães. Os pesquisadores confirmaram a presença de ponte de dentina, ocasionada pelo hidróxido de cálcio, fato que não ocorreu com o outro elemento do estudo. O hidróxido de cálcio apresentou biocompatibilidade satisfatória, permanecendo como material de primeira escolha em casos de capeamento pulpar em exposições pulpares acidentais.

Mousavinasab et al. (2008) avaliaram resposta pulpar ao uso de cimento de ionômero de vidro resinoso, cimento de ionômero de vidro comum e o cimento de hidróxido de cálcio.

Para o estudo, foram utilizados 50 dentes com cárie profunda e capeados com os cimentos estudados. Decorridos 30 e 60 dias, os dentes foram extraídos e encaminhados à análise histopatológica. Os resultados mostraram não haver diferença estatística significativa em relação à resposta pulpar entre os três diferentes cimentos nos mesmos intervalos de tempo.

O potencial genotóxico de alguns materiais utilizados na Endodontia foi pesquisado por RIBEIRO (2008), que avaliou a capacidade de indução de danos genéticos do paramonoclorofenol, formocresol, compostos fenólicos, cimentos endodônticos a base de resina, agregado de trióxido mineral e pasta de hidróxido de cálcio. Dentre os materiais estudados, os compostos fenólicos, o formocresol e o paramonoclorofenol mostraram ação nociva para o material genético. O autor sugere estudos mais aprofundados sobre o tema, para uso seguro desses materiais na Endodontia.

Garcia et al. (2008) analisou comparativamente 2 pastas medicamentosas, a base de hidróxido de cálcio + óleo de mamona e pasta de hidróxido de cálcio + polietilenoglicol inseridos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, avaliados nos períodos de 7, 21 e 42 dias. As pastas foram veiculadas em tubos de polietileno, que por sua vez foram implantados em tecido conjuntivo subcutâneo, num total de 4 por animal. Os resultados foram classificados quanto à severidade da reação inflamatória e quantificados com relação ao número de células presentes. Concluiu-se, neste estudo, que as pastas avaliadas apresentaram-se como irritantes ao tecido conjuntivo subcutâneo do rato, permitindo no decorrer do período, colagenização progressiva da cápsula inflamatória junto à abertura tubular, não atingindo a evolução ideal caracterizada junto à interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno (controle). Considerando a somatória de eventos histopatológicos através da análise comparativa, observou-se que a associação hidróxido de cálcio + óleo de mamona apresentou menor potencial irritativo.

## 2 - *Pothomorphe ubellata*

A primeira citação ao gênero *Pothomorphe* no Brasil consta em um manuscrito de 600 páginas escrito por um padre português, cujo nome é desconhecido. O manuscrito foi responsável por espalhar informações, recuperadas dos arquivos jesuítas em Roma e orientava sobre composição da fórmula, até então secreta, da *Triaga Brasilica*, um medicamento composto por dezenas de ervas inteiras, raízes, sementes e cascas de plantas identificadas por seus nomes comuns. Quase três séculos depois muitos ainda podem ser duvidosamente identificados enquanto outros são reconhecidos com certeza, dentre esses componentes reconhece-se a *Pothomorphe*, identificada na formulação com o nome de caapeba. O *Triaga Brasilica* foi desenvolvido por jesuítas que tentavam reconstituir o modelo europeu do *Theriac* uma mistura de extratos de muitas plantas, no mínimo 100, prescrita para muitas doenças, mas principalmente para a cura de todos os tipos de envenenamentos, acima de todos, como antídoto para as picadas de animais venenosos (PEREIRA et al., 1996).

SILVA (1926) incluiu a *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. nos monográficos da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil, sob a sinonímia de *Heckeria umbellata*, atribuindo a esta espécie o nome pariparoba, recomendando o uso das suas raízes. O vegetal inteiro é freqüentemente utilizado, e, na tentativa de se evitar fraudes ou trocas na matéria prima, existem trabalhos descritivos que fornecem subsídios que servem de auxílio na resolução deste problema através de uma correta identificação do vegetal (MORAES et al., 1984, 1985, 1987). Segundo PECKOLT (1941), as folhas, caules e especialmente os frutos desta espécie também são dotados de propriedades farmacológicas, apesar da Farmacopéia Brasileira consagrar exclusivamente o uso das raízes para fins farmacológicos.

Dentre as diversas propriedades das plantas do gênero *Photomorphe*, pode-se citar: propriedade antiepilética, diurética (FELZENSZWALB et al., 1987), antiinflamatória

(TOURNON et al., 1986; DE FEO, 1991; DI STASI, 1994; DESMARCHELIER et al., 2000), febrífuga (RUTTER, 1990), hepatoprotetora (SOUKUP, 1987), anti-malárica, colagoga, colerética (PECKOLT, 1941; COIMBRA, 1958), para o tratamento de úlceras cutâneas e infecções locais (DESMARCHELIER, 1996) e atividade específica contra o *Enterococcus faecalis* (SPONCHIADO Jr., 2006). O extrato fluído, a tintura, o xarope e o xarope composto são as formas farmacêuticas oficializadas.

As folhas de *P. umbellata* também são usadas no tratamento de problemas estomacais. Fascinelli et al. (1999) avaliaram atividades analgésicas, antiulcerogênicas, toxicidade aguda e perfil fitoquímico das folhas desta espécie. Extrato metanólico 70% foi usado nos testes farmacológicos; os resultados comprovaram a atividade analgésica e antiulcerogênica desta espécie além de indicar os principais constituintes químicos essenciais nos quais foram detectados ácidos fixos, esteróides, saponinas, taninos, xantonas, flavononas, flavonóis e flavonas.

Moraes (1983) citou que os primeiros estudos fitoquímicos foram executados por Peckolt; Peckolt (1896) que descrevem a composição química da planta dividida entre substâncias, como por exemplo: princípio amargo, resmas, ácido resinoso, nitrato de potássio e cálcio, ácidos orgânicos, substâncias albuminosas, gomas, celulose, sais orgânicos e outros. Em 1933, FREISE cita a presença de um óleo essencial em *P. umbellata* na porcentagem de 2,25% cujo principal componente seria a azarona.

Costa (1937) aplicou à *P. umbellata* o método químico Bourquelot visando a detecção de glicósidos nesta planta. Com base nos seus resultados o autor concluiu pela presença de holósidos e heterósidos hidrolisáveis (invertina e emulsina, respectivamente) e propôs a denominação de piperósido para o heterósido presente no caule e na folha de *P. umbellata*.

Hegnauer (1969), por meio de investigações fitoquímicas em piperáceas, observou que as classes de compostos mais características são amidas, lignanas, óleos voláteis e outros produtos derivados do ácido cinâmico.

Silva; Bauer (1972) estudando o óleo essencial desta espécie indicaram a presença de um fenilpropanóide denominado dilapiol (1-alil-2,5-dimetoxi-3,4-metilenodioxibenzeno).

Luz et al. (1999) analisaram os óleos essenciais obtidos das folhas e ramos de *P. umbellata* e *P. peltata*. Os autores identificaram o beta-cariofileno (14,8%), germacrene D (27,4%), biciclogermacrene (11,5%) e delta-cadinene (13,3%), compreendendo 67% do óleo. Os maiores componentes identificados no óleo de *P. peltata* foram beta-cariofileno (39,0%), alfa-humuleno (6,4%), germacrene D (8,7%), (E)-nerolidol (li, 7%) e óxido cariofileno (7,2%), correspondendo a 73% do óleo. Com exceção para o octadecanol encontrado no óleo de *P. peltata*, todos os outros compostos identificados em ambas as espécies foram classificados como sesquiterpenos.

Kijoa et al. (1980) isolaram do extrato hexânico das folhas e raízes de *P.umbellata* o sitosterol e uma substância até então não estudada, o 4-nerolidileatecol.

Gustafson et al. (1992), observaram *in vitro* a atividade anti-HIV de dímeros do 4-nerolidilcatecol extraídos de *P. peltata*, denominados de peltatois. Os autores relataram que a utilização do agente o 4-nerolidilcatecol, usado isoladamente, foi inativo contra o HIV, no estudo proposto.

O teor de óleo na *P. umbellata*, foi estudado por MORAES (1983) que definiu em 0,2% v/m como sendo o volume de óleo identificado na *P. umbellata*, os autores relataram a inexistência de azarona no óleo essencial pesquisado. MORAES et al. (1984) em trabalho semelhante, realizam a caracterização cromatográfica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* onde se padronizou as condições cromatográficas utilizando-se como fase móvel benzeno ou as misturas de n-hexano e acetato de etila, etanol e acetato de etila. A

visualização das manchas foi feita com luz UV 366 nm, antes da revelação e, com luz natural, após revelação com anisaldeído sulfúrico ou cloreto férrico a 4%. Neste trabalho o 4-nerolidilcatecol foi encontrado somente nas raízes. Não foram detectadas Azaronas nos extratos fluídos bem como nos óleos essenciais da espécie.

Felzenszwalb (1987) utilizou os testes desenvolvidos por AMES (1975) para detectar possível toxicidade genética das duas espécies: *P. umbellata* e *P. peltata*. Os testes mostraram ausência de toxicidade genética para ambas as espécies.

A atividade anti-malária da *P. umbellata* foi desenvolvida por AMORIM et al. (1988). Neste estudo foram administrados extratos etanólicos destas duas espécies via oral e via subcutânea em ratos infectados com *Plasmodium berghei*. Os extratos de *P. umbellata* estudados, evidenciaram suficiente atividade anti-malária, reduzindo significativamente os níveis de parasitemia através de um efeito inibitório dose-dependente. Nos extratos administrados oralmente, efeito anti-malárico de menor intensidade foi obtido, sugerindo que o princípio ativo, provavelmente, é melhor absorvido pela via subcutânea, ou possa ser parcialmente destruído no trato gastrointestinal. Os resultados mostraram que os extratos etanólicos de *P. peltata* não foram efetivos para diminuir os níveis de parasitemia em ratos contaminados.

Ferreira-da-Cruz et al. (2000) observaram que não é possível definir uma atividade antimalária efetiva da *P. umbellata*, pois, foram observados dois padrões de parasitemia: um “baixo” e outro “padrão” ocorrendo em frequências similares em ambos os grupos de ratos infectados (tratados e não tratados). Todavia a existência de dois perfis distintos de parasitemia não foi obtida de forma satisfatória nos animais do estudo, indicando a necessidade de novas pesquisas em relação aos aspectos da interação hospedeiro/parasita em ratos infectados com o *Plasmodium berghei*.

Mongelli (1995) pesquisando a atividade antimicrobiana de quatro plantas, entre as quais *Pothomorphe peltata*, usadas para o tratamento de diversas enfermidades por grupos indígenas da Amazônia peruana, evidenciou que todas as decocções mostraram atividade contra alguns dos microrganismos testados. O autor também avaliou os extratos metanólicos das plantas estudadas, que foram submetidas ao bioensaio do *methyl green*-DNA, com o objetivo de se investigar a interação com o DNA como um dos possíveis mecanismos de ação. Os resultados obtidos com o extrato metanólico de *Pothomorphe pellata* foram positivos, indicando ser a interação com o DNA o seu possível mecanismo de ação antimicrobiano.

Desmarchelier et al. (1996), bem como Mongelli et al. (1997), pesquisaram extratos de plantas utilizadas como anti-inflamatórias na América do Sul, ambos os autores relataram um efeito antioxidante verdadeiro dos extratos metanólicos de *P. peltata*, através do método de quimiluminescência; com os resultados os autores sugeriram um ensaio para a determinação do dano oxidativo induzido por Fe (II) na desoxirribose presente no DNA. Além disso, avaliando a atividade antioxidante dos extratos em estudo, observaram que a presença de diferentes concentrações do extrato metanólico da referida planta levou à diminuição do dano oxidativo observado no material genético, sugerindo o grande potencial antioxidante *in vivo* destes extratos.

Barros et al. (1996) avaliaram *in vitro* a atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata*. Os autores utilizaram uma fração purificada a partir do extrato hidroalcolico contendo 4-nerolidilcatecol comparado ao  $\alpha$ -tocoferol. Homogenatos de cérebro de rato foram incubados com alíquotas crescentes de extrato hidroalcolico bruto de raiz, caule e folhas de *P. umbellata*. Malondialdeido (MDA) e quimiluminescência (CL) foram os parâmetros empregados para avaliar a autooxidação espontânea dos homogenatos de cérebro. Os resultados indicaram uma importante atividade antioxidante de raiz de *P. umbellata*

provavelmente decorrente da presença de 4-nerolidilcatecol, que apresentou atividade antioxidante superior à do  $\alpha$ -tocoferol.

Desmarchelier et al. (1997), em um estudo comparativo obtiveram como resultado um maior potencial antioxidante de extratos metanólicos de *P. umbellata* em relação à *P. peltata* e ao 4-nerolidilcatecol isolado. Os experimentos foram feitos em amostras extraídas de cultivos *in natura* desta planta. Apesar das práticas convencionais de plantio, cultivo e seleção terem um êxito notável na produção de variedades com maiores rendimentos, resistência a enfermidades, pragas e tolerância ao estresse, alguns aspectos ambientais ainda dificultam certos aspectos de seleção deste tipo de material tais como sazonalidade, temperatura e geografia ideal, estado fisiológico e idade da planta, por exemplo, gerando variáveis.

Utilizando-se a biotecnologia com vistas ao aumento da produção de metabólitos secundários, Figueiredo et al. (1999) estudaram o efeito da variação da concentração de sacarose (1 a 6%) sobre culturas em suspensão de células de *P. umbellata* visando o aumento da produção de 4-nerolidilcatecol. Neste estudo a concentração mais efetiva para o estímulo da produção de 4-nerolidilcatecol foi a concentração de 4% de sacarose que elevou os teores desta substância nas células estudadas.

Um protocolo de micropropagação de *P. umbellata in vitro* foi estabelecido por Pereira (2000) a partir de segmentos de folhas cultivados em meio de cultivo Murashige and Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 0,5 mg/L de benziladenina, 0,1 mg/L de ácido giberélico e 10 g/L de sacarose; raízes foram conseguidas usando-se meio “MS” sem reguladores de crescimento. Um estudo anatômico confirmou regeneração via organogênese direta.

Otero et al. (2000) em estudos de etnobotânica com comunidades rurais da Colômbia, citaram a *P. umbellata* como uma das 101 espécies de ervas medicinais utilizadas por

curandeiros locais no tratamento de picadas de cobras, especialmente envenenamentos por *Bothrops*, *Pothidium* e *Bothriechis*.

Mors et al. (2000), por meio de ensaios biológicos, confirmaram a atividade protetora de muitas plantas capazes de neutralizar a ação letal do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*), mais de 100 espécies de plantas foram testadas, entre as quais *Pothomorphe umbellata*. Tal efeito se deve a compostos pertencentes à classe de metabólitos secundários, capazes de interagir com macromoléculas alvo - receptores e enzimas. Proteção igual a 100% não foi encontrada com estes compostos (metabólitos secundários) isoladamente, mas somente com extratos das plantas, um fato que pode levar ao entendimento de que um simples constituinte não reproduz a atividade total do extrato e que neste caso, com muitas ervas medicinais, há a alta probabilidade de compostos ativos presentes nas plantas agirem sinergicamente em estruturas alvo. Para os testes com *P. umbellata*, 1,70% de sobrevivência foi alcançada; o fato de haver sobreviventes deve ser considerado, uma vez que, todos os elementos do grupo controle pereceram.

Mello (2001) afirmou que na ausência de luminosidade ocorre variação na atividade da peroxidase. Essa variação pode ser uma adaptação do tecido vegetal à condição proposta (ausência de luz), o que provoca um aumento da oxidação dos lipídeos da membrana sob condição de *stress*. O aumento da atividade da peroxidase devido a esta variação poderia indicar um papel protetor da enzima contra o *stress*.

Ropke et al. (2002) pesquisaram diferentes formulações (gel, gel-emulsão, emulsão) na absorção percutânea de 4-nerolidylcatecol, um composto antioxidante isolado do extrato de *Pothomorphe umbellata* e compararam com o extrato etanólico de *Pothomorphe umbellata* incorporado a um gel. Todas as formulações pesquisadas mostraram penetração percutânea satisfatória.

Mongelli et al. (2002) avaliaram a eficácia inseticida do ativo 4-nerolidilcatechol extraído da planta *pothomorphe peltata* contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*. Os resultados demonstraram que o ativo foi eficaz na eliminação das larvas do mosquito.

Ropke et al. (2003) avaliaram a atividade da *Photmorphe umbellata* em relação à proteção contra a incidência de raios ultravioletas, nos períodos de irradiação de 4 horas por semana, totalizando 22 semanas. Os autores utilizaram a superfície dorsal de ratos, que foram tratados com gel contendo o fitoterápico para posterior irradiação dos raios. Os resultados mostraram que a *P. umbellata* pode ser usada, com sucesso, na proteção epitelial contra os efeitos deletérios dos raios ultravioletas do sol.

Bergamo (2003) avaliou quimicamente os compostos voláteis e não voláteis de *Pothomorphe umbellata* e descreveu o isolamento de onze substâncias pertencente a várias classes: flavonóides (vitexina, orientina, trimetoxiflavona e velutina), amidas (arboreumina), lignanas (didiocubetina e sesanina) e fenilpropanóides (ácido cumárico e 4-nerolidilcatecol).

Ropke et al. (2005) avaliaram a eficácia da proteção antioxidativa de um gel a base da planta *Photomorphe umbellata* contendo 0,1% de 4-nerolidylcatechol em tecido cutâneo de ratos utilizando irradiação ultravioleta. Os resultados demonstraram que o grupo em que foi aplicado o gel a base de *Pothomorphe umbellata* foi capaz de proteger o tecido contra a irradiação ultravioleta. Os autores concluem que a *Pothomorphe umbellata* é um ótimo agente fotoprotetor.

Noriega et al. (2005) analisaram as condições de extração do 4-nerolidilcatecol, um princípio ativo extraído a partir do extrato hexânico de raízes e folhas da *P. Umbellata*, utilizado como agente antioxidante. Os autores observaram que os fatores tempo, temperatura e hidromódulo não favoreceram a extração do 4-nerolidilcatecol.

Barros et al. (2005) estudaram a toxicidade do extrato de 4-nerolidilcatecol da *P. umbellata* administrado na cavidade oral de ratos adultos. Os autores avaliaram a toxicidade aguda e crônica, estudos histopatológicos, análise hematológica, bioquímica e atividade

mutagênica. Os resultados obtidos a curto e médio prazo demonstraram que o extrato não apresentou propriedades tóxicas e mutagênicas.

Perazzo et al. (2005) avaliaram as propriedades antiinflamatórias e analgésicas de um extrato da planta *Pothomorphe umbellata* em animais. Os resultados mostraram que a *Pothomorphe umbellata* possui propriedades analgésicas e antiinflamatórias que confirmam o uso popular para esses fatos.

Ropke et al. (2006) estudaram o efeito do extrato etanólico de *P. umbellata* em matrizes de metaloproteínas, sendo elas: MMP-2 e MMP-9 encontradas em casos de câncer de pele. A inibição *in vitro* de MMP-2 e de MMP-9 foi medida pela gelatina zymográfica na presença de concentrações diferentes do extrato de *P. umbellata* e na presença de seu princípio isolado 4- nerolidilcatecol. O efeito inibitório do extrato de *P. umbellata* foi maior do que o apresentado pelo princípio ativo isolado. O método pela gelatina zymográfica e pela análise histológica revelaram que a *P.umbellata* foi eficaz em inibir a atividade da MMP-9 *in vivo* nos ratos sacrificados 2 h após a irradiação de UV. A intensidade da faixa MMP-2 era inalterada. Os resultados contribuíram com a elucidação do mecanismo da prevenção antioxidativa da *P. umbellata* e podem fornecer uma base racional para o uso desta planta na profilaxia e no tratamento do câncer da pele.

Sponchiado Jr. (2006) avaliou *in vitro* a atividade antimicrobiana de uma medicação intracanal preparada com a fração acetato de etila do extrato de *P. umbellata* e hidróxido de cálcio, para controle do *Enterococcus faecalis*. No teste da atividade antibacteriana em dentes humanos, o autor utilizou 57 caninos superiores extraídos e posteriormente contaminados. Concluiu-se que as medicações à base de *P. umbellata* e de hidróxido de cálcio apresentaram efetividade antimicrobiana contra o *E. faecalis*.

Andrade-Neto et al. (2007) avaliaram *in vitro* a inibição do *Plasmodium falciparum* por substâncias obtidas de plantas amazônicas com capacidades antimaláricas, dentre elas, a

*Photomorphe peltata*. Os autores concluíram que os extratos estudados possuem estruturas que atuam sobre o vetor da malária, e podem ser utilizados em experimentos pré-clínicos para esse fim.

Barros et al. (2007) avaliaram *in vitro* a inibição do extrato etanólico na inibição da matriz de metaloproteinase (MMP), enzima responsável pela degradação da matriz extracelular após reação inflamatória intensa, na córnea normal e injuriada de ratos. Os autores concluíram que o extrato estudado pode ser utilizado como terapia alternativa no controle da atividade desta enzima.

Sponchiado Jr et al. (2007) realizaram uma revisão de literatura sobre a espécie *Photomorphe umbellata*, bem como seus aspectos químicos e farmacológicos importantes. Os autores concluíram que pesquisas realizadas até o momento retratam as diversas atividades farmacológicas da *Photomorphe*, correlacionando-as com seus compostos químicos. A atividade antimicrobiana dessa planta exige estudos complementares e aprofundados e novas pesquisas devem ser realizadas com o propósito de concretizar formulações seguras e eficazes que possam ser utilizadas para fins terapêuticos.

Noriega et al. (2008) realizaram um estudo com o objetivo de aprimorar a aparência, estabilidade centrífuga e a permeabilidade de emulsões contendo a *P. umbellata*. Estes autores utilizaram desenhos experimentais para avaliar os diferentes modos de mistura com representações gráficas dos diagramas das diferentes fases da emulsão. Os resultados mostraram que a aparência da solução segue um resultado linear e sua fase aquosa é o principal fator que influencia nesta aparência. O parâmetro de estabilidade centrífuga seguiu um modelo matemático e a interação entre diferentes fatores resultou em emulsões mais estáveis. A penetração cutânea da pasta aumentou na fase oleosa, segundo um modelo linear obtido pela análise dos dados. Os autores sugeriram que para aperfeiçoar as emulsões contendo a *P. umbellata* as seguintes concentrações devem ser empregadas: 68,4% na fase aquosa, 26,6% na fase oleosa e 5% na fase auto - emulsionante.



*Proposição*

## **PROPOSIÇÃO**

Este trabalho tem com objetivo avaliar morfológica e morfometricamente o grau de irritação tecidual induzido por pastas medicamentosas constituídas da fração acetato de etila de *Pothomorphe umbellata* associadas, ou não, com o hidróxido de cálcio e óxido de zinco veiculado em propilenoglicol, por meio de implantes de tubos de polietileno em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, em relação aos seguintes eventos histopatológicos: infiltrado inflamatório, celularidade, vascularização, atividade macrofágica e área da cápsula reacional.



## *Material e Métodos*

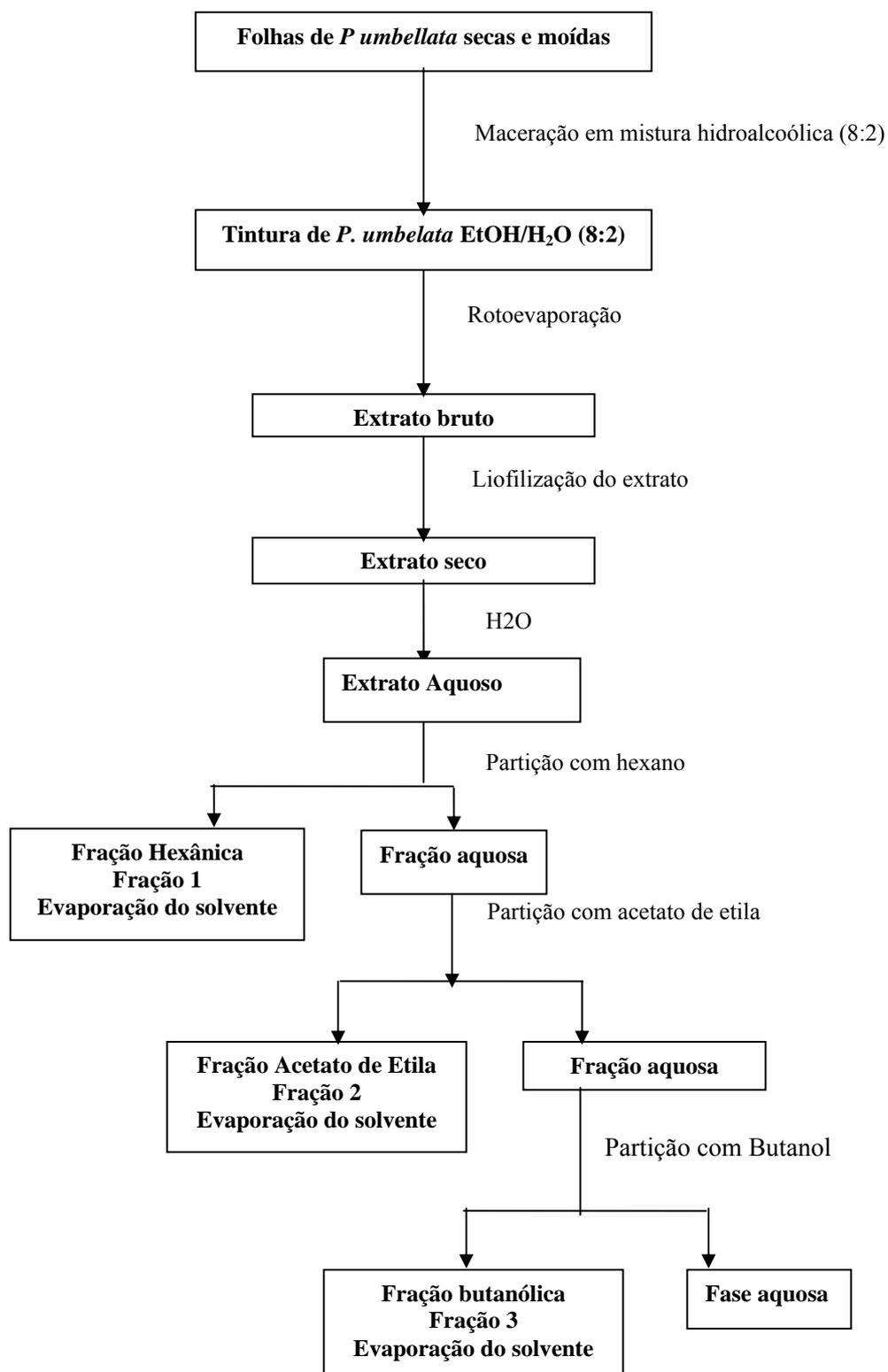
## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 - Preparo dos extratos de *Pothomorphe umbellata*

As folhas de *Pothomorphe umbellata* utilizadas para o preparo dos extratos foram coletadas em março de 2004, na Coleção de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP (Figura 1). As partes aéreas foram secas em estufa com circulação forçada de ar e, em seguida, maceradas em etanol/água (8:2) em recipiente âmbar por 48 horas. A tintura resultante foi concentrada em evaporador rotativo e, posteriormente, liofilizada. As frações foram obtidas pela partição líquido/líquido em funil de separação, acrescentando-se 100 mL de água destilada e, sucessivamente, os solventes em escala crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e butanol, obtendo-se, dessa forma, após evaporação até secagem, as frações hexânica, acetato de etila, butanólica e aquosa, respectivamente (Esquema 1).



**Figura 1** – (A) Coleção de plantas medicinais da UNAERP; (B) *Pothomorphe umbellata*.



**Esquema 1.** Obtenção da tintura e frações das folhas de *P. umbellata*.

## 2 - Cromatografia em coluna para fracionamento da fração acetato de etila

Com base no trabalho de Sponchiado Jr. (2006) que evidenciou a fração acetato de etila como inibidora do crescimento do *E. faecalis* tanto no teste de difusão em ágar quanto no teste microbiológico em dentes naturais, a mesma foi submetida a um fracionamento por meio da cromatografia em coluna na tentativa de iniciar a separação de seus constituintes.

Tal metodologia é utilizada para caracterizar a fração estudada, fornecendo uma “identidade química” ao produto analisado. Toda vez que se realizar uma pesquisa com a pasta estudada, as características cromatográficas deverão apresentarem-se compatível à utilizada neste experimento.

Para tal, foram colocados 6g da fração acetato de etila na coluna utilizada para fracionamento (Figura 2), a seguir os solventes foram dispensados na coluna (Tabela 1).

Condições cromatográficas - Coluna 1 (CC1): Suporte sólido: sílica gel, altura de coluna:174cm, diâmetro da coluna:2,5cm, amostra: fração acetato de etila da partição do extrato bruto de *P. umbellata* (6g), eluentes: hexano (Hex.); Acetato de etila (AcOEt); Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e Metanol (MeOH) em ordem crescente de polaridade.

**Tabela 1** – Esquema de eluição para obtenção de sub-frações da fração acetato de etila de *P. umbellata*.

Eluente	Concentração (%)	Volume (mL)
Hex:AcOEt	50:50	1000
Hex:AcOEt	30:70	1000
AcOEt	100	1000
$\text{CHCl}_3$	100	1000
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	90:10	1000
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	80:20	1000
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	70:30	1000
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	60:40	1000
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	50:50	1000
MeOH	100	1000



**Figura 2** - Coluna 1.

Em seguida, foram escolhidas umas sub-frações obtidas da primeira coluna CC1 (Hex:AcOEt 30:70) que foi, mais uma vez, submetida a cromatografia em coluna para um novo fracionamento (Tabela 2).

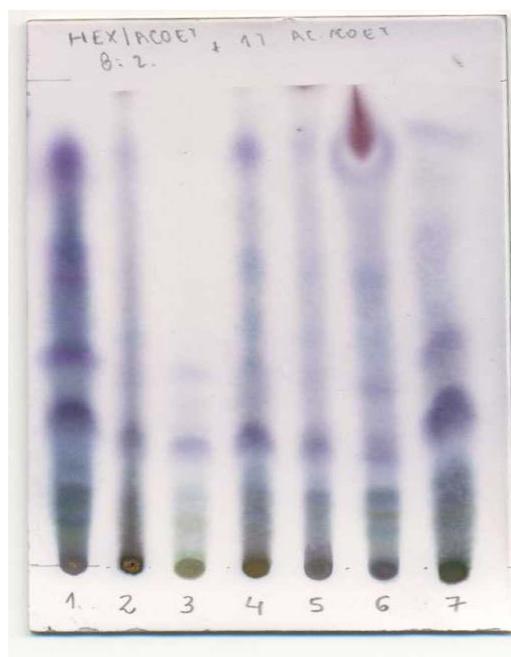
Condições cromatográficas - Coluna 2 (CC2): Suporte sólido: sílica gel, altura de coluna:15cm, diâmetro da coluna:1,5cm, amostra: sub-fração Hex:AcOEt 30:70 oriunda da coluna 1 (0,150g), eluentes: Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e Metanol (MeOH) em ordem crescente de polaridade.

**Tabela 2** – Esquema de eluição para purificação da sub-fração Hex:AcOEt 30:70 oriunda da coluna 1.

<b>Eluente</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Volume (mL)</b>
$\text{CHCl}_3$	100	200
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	80:20	200
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	70:30	200
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$	50:50	200
MeOH	100	200

Após a realização da cromatografia em coluna foi necessário realizar, com as novas sub-frações, a cromatografia em camada delgada. Tais amostras foram solubilizadas em 0,5

mL de Metanol/clorofórmio e aplicadas em placas de vidro revestidas com sílica gel F<sub>254</sub> e aplicadas por meio de um capilar (Figura 3).



**Figura 3** – Amostras aplicadas em placa de vidro.

Após a aplicação das sub-frações as placas foram colocadas em cubas de vidros saturadas com o eluente (fase móvel). A seguir estas foram secas e observadas em luz UV e posteriormente reveladas com o reagente de coloração vanilina/ácido sulfúrico, seguida de aquecimento a 110°C.

### **3 - Preparo das pastas medicamentosas**

Para a realização do experimento, primeiramente foi aviada uma “pasta base”, obtida pela diluição de 0,167 mg da fração acetato de etila de *Pothomorphe umbellata* e 1 mL de propilenoglicol, acondicionados em recipiente plástico de 3 mL com tampa, com o intuito de se obter uma mistura mais homogênea e fluida, para posteriormente, ser misturada ao

hidróxido de cálcio e o óxido de zinco (grupos 3 e 4). Tal consistência foi obtida agitando-se o recipiente com o auxílio de cuba ultra-sônica (Dabi Atlante<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, Brasil, 1999) por um período de 20 minutos, devido à dificuldade para homogeneização da mesma em placa de vidro

Após a obtenção da “pasta base” fluida, partiu-se para a confecção dos grupos experimentais, que depois de manipulados tiveram seu pH aferidos por meio de uma fita para aferição de pH (Merck, Jacarépagua, RJ, 2006).

As pastas que representam s grupos experimentais foram obtidas seguindo as seguintes formulações:

- Grupo 1: 90 mg de Hidróxido de cálcio (P. A.) + 85  $\mu$ L de propilenoglicol (Biofarma, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2006) com pH equivalente a 11,8;
- Grupo 2: 200 mg da fração acetato de etila de *P. Umbellata* + 150  $\mu$ L de propilenoglicol (pH = 4,0);
- Grupo 3: 23  $\mu$ L da “pasta base” +30 mg de hidróxido de cálcio (pH=8,2);
- Grupo 4: 70  $\mu$ L da “pasta base” + 50 mg de hidróxido de cálcio +25 mg de óxido de zinco (P. A.). (pH = 8,5).

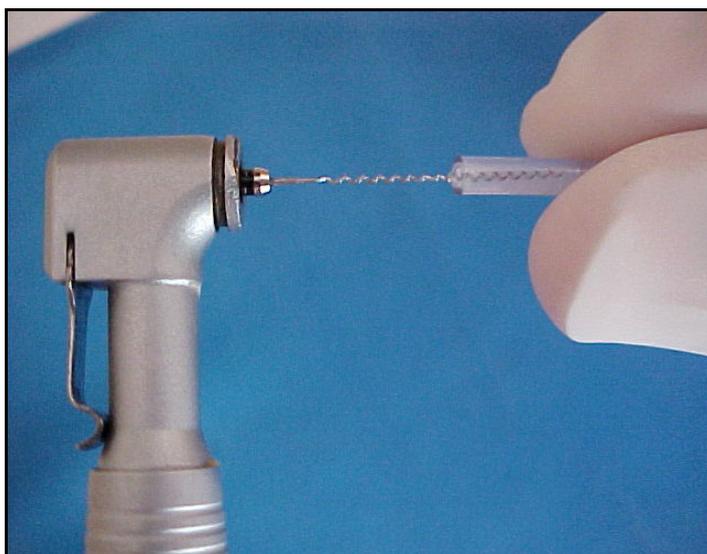
A seguir, os corpos-de-prova, previamente esterilizados foram preenchidos totalmente com as pastas a serem testadas.

As pastas do grupo 3 e 4 foram obtidas mediante a mistura do soluto (hidróxido de cálcio pró-análise e óxido de zinco p.a.) à “pasta base”, previamente preparada (Figura 4). Todos os grupos foram espatulados com auxílio de uma placa de vidro e espátula 24F até que fosse obtida uma consistência cremosa, similar à consistência do creme dental, com características físico-químicas de uma medicação adequada ao preenchimento hermético do canal radicular e ao mesmo tempo, com uma boa propriedade de escoamento, consistência compatível à adotada por Sponchiado Jr (2006) e Garrido (2004).



**Figura 4** - Sequência de manipulação da pasta de hidróxido de cálcio + propilenoglicol.

Obtidas as pastas, os corpos-de-prova foram preenchidos imediatamente, com auxílio de uma broca odontológica do tipo lântulo (Dentsply, Maillefer, Ballaiges, Suíça, 1999), estéril, compatível com o diâmetro interno do tubo de polietileno (Figura 5).



**Figura 5** - Preenchimento do tubo de polietileno com a pasta medicamentosa com auxílio de lântulo.

#### **4 - Obtenção dos tubos de polietileno**

Para obtenção dos tubos de polietileno, foi utilizado um catéter de uretra de 0,8 mm de diâmetro interno, que foi seccionado seqüencialmente com intervalos de 10 mm, e cada tubo, após a secção, teve uma de suas extremidades vedadas com adesivo à base de éster de cianoacrilato (Super Bonder<sup>®</sup>, Aachen, Alemanha, 2005), para evitar o extravazamento do material a ser testado e foram colocados em uma caixa metálica e autoclavados a uma temperatura de 120°C durante 20 minutos.

#### **5 - Preparo dos animais para o estudo**

Para o presente estudo, foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus, Holtzman) machos, adultos jovens, com peso corporal inicial variando entre 200 e 250 gramas, mantidos em caixas plásticas (40x32x17 cm), em sala climatizada (temperatura de 23° C), com luz controlada (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e recebendo água e ração sólida comercial balanceada à vontade.

Durante o experimento, os ratos ficaram sob observação diária para verificação de possível alteração em seu comportamento e observação macroscópica do local dos implantes.

#### **6 - Implante dos corpos-de-prova com as pastas testadas**

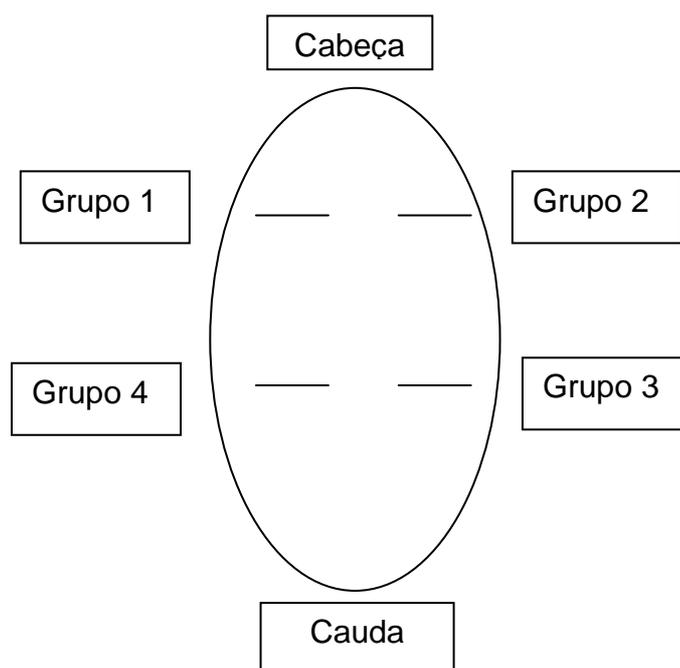
Os animais foram anestesiados com cloridato de cetamina 10% (Laboratórios Calier S/A, Barcelona – Espanha, 200) na proporção de 0,2 mL para cada 100 g do peso corporal do animal, e administrado intraperitonalmente.

Após anestesia, foi realizada a tricotomia da região dorsal do animal, e anti-sepsia do campo operatório, com gaze estéril embebida em iodopovidona.

As incisões para o implante dos corpos-de-prova foram realizadas no dorso do animal, sendo duas próximas à região escapular e duas próximas à região pélvica. Utilizou-se lâmina de bisturi nº 15, acoplada ao cabo Bard Parker nº 03, para a incisão, com um diâmetro de aproximadamente 5 mm de largura, compatível com a largura do corpo-de-prova. A divulsão do tecido conjuntivo subcutâneo foi feita com tesoura de ponta romba, introduzida, aproximadamente, 20 mm no tecido subcutâneo. Os corpos-de-prova contendo as pastas medicamentosas (Figura 6) foram inseridos no local da incisão. Assim, cada par de lojas cirúrgicas recebeu uma pasta diferente (Esquema 2).



**Figura 6** – (A) Incisão realizada no dorso do rato; (B) Inserção do tubo de polietileno.



**Esquema 2** - Esquematização para implantação dos tubos.

As bordas das feridas foram suturadas com agulhas montadas de 1,6 cm com fio de seda 3-0.

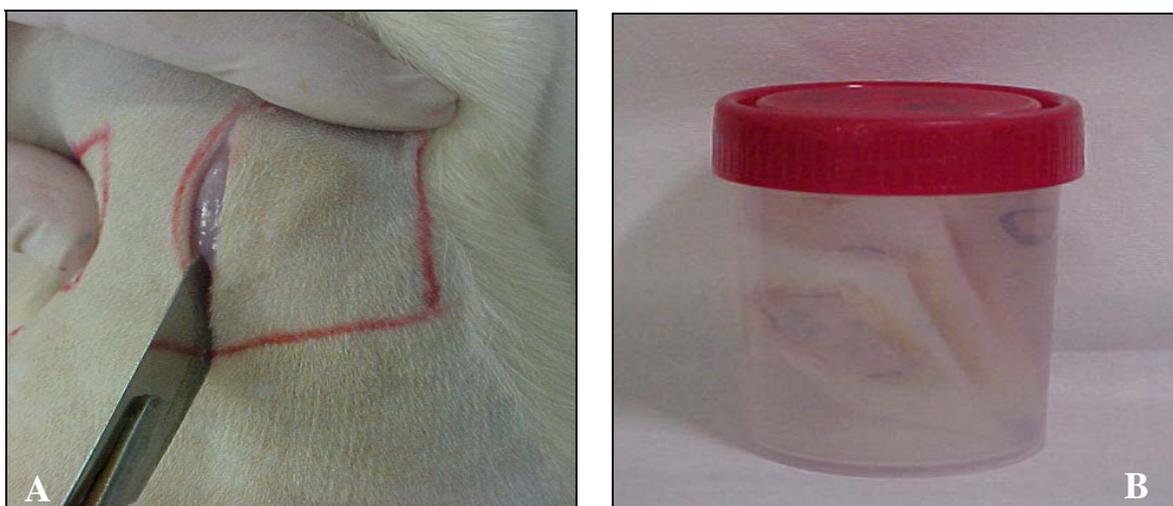
Realizados os implantes, todos os animais, ainda anestesiados, receberam por via intramuscular, uma dose 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Laboratório Wyeth, Brasil).

Os animais foram, então, separados em três grupos a serem ortotamizados nos períodos de: 7, 21 e 42 dias.

## **7 - Biópsias dos tecidos**

Cinco animais para cada período experimental (7, 21 e 42 dias após a cirurgia) foram ortotamizados por sobredose de inalação de Éter Sulfúrico. Após tricotomia e antissepsia, as áreas dos implantes sofreram dissecação e remoção, tomando-se o cuidado de prendê-las com grampos metálicos em cartolina para que as peças não dobrassem durante o processo de

fixação em solução de formalina a 10% durante 24 horas (Figura 7). Preconizou-se por abranger, além da área a ser estudada, suficiente tecido normal circunjacente, de aproximadamente 20 mm de largura por 30 mm de comprimento.



**Figura 7** – (A) Dissecação do tecido; (B) Peça removida e fixada em formalina a 10%.

## 8 - Tramitação laboratorial

Decorridas as primeiras 24 horas as peças foram lavadas em água corrente pelo mesmo período de tempo, sendo então aparadas e cortadas macroscopicamente e acondicionadas em cassetes unitários. Este procedimento permitiu a localização dos corpos-de-prova, com suficiente margem de segurança.

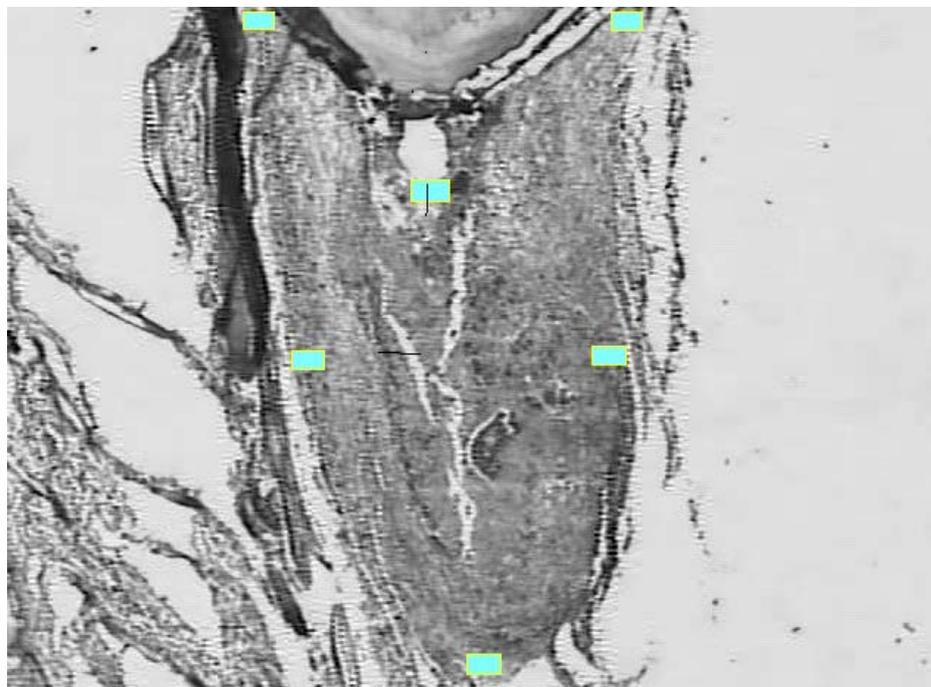
Para a análise das peças, utilizou-se o processamento histotécnico de rotina, com processamento automático de tecido. Primeiramente, os espécimes foram desidratados em uma bateria ascendente de álcool (70%, 90%, 95% e 100%), a seguir, as peças sofreram imersão em Xilol, e em seguida realizou-se a parafinização para obtenção dos blocos e posterior corte dos tecidos a serem analisados.

Posicionados os blocos de parafina em micrótomo, estes, passaram por desgaste até encontrar-se os tubos de polietileno, cuidadosamente removidos. Cortes semi-seriados com 5 micrômetros de espessura foram realizados, posteriormente, corados com Hematoxilina e Eosina.

## **9 - Análise Histopatológica**

As análises dos resultados foram feitas com base nas respostas teciduais causadas pelas pastas testadas, comparando-as entre si. Foi considerado controle positivo a reação tecidual desencadeada nas regiões do corpo-de-prova preenchidos com hidróxido de cálcio + propilenoglicol (grupo I), e controle negativo a porção lateral dos tubos e polietileno, por apresentarem ausência de material testado. Avaliou-se, por meio de análise histopatológica, os eventos a seguir descritos: infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e células mononucleares), capacidade de celularidade e vascularização (fibroblastos e vasos sanguíneos) e atividade macrofágica (fagócito mononuclear ou macrófago e células gigantes inflamatórias). Estes eventos histopatológicos foram avaliados e aferidos com imagens em aumento de 120 X, utilizando-se um microscópio óptico Nikon (Tóquio, Japão), sendo os aumentos de 40X para a lente objetiva, aumento de 10X para a ocular e de 3X da câmera JVC acoplada ao microscópio, que transfere a imagem para o computador mediante o uso do software Adobe Photoshop 5.0 (Windows XP). Estas imagens corresponderam a uma área de 0,021 mm<sup>2</sup>, dentro da cápsula reacional, previamente determinadas, em número de seis, sendo três áreas próximas ao corpo-de-prova (uma central e duas periféricas), duas na porção intermediária da cápsula reacional (nas bordas laterais da mesma) e uma na região mais distante do corpo-de-prova (na extremidade da cápsula). A análise morfológica e

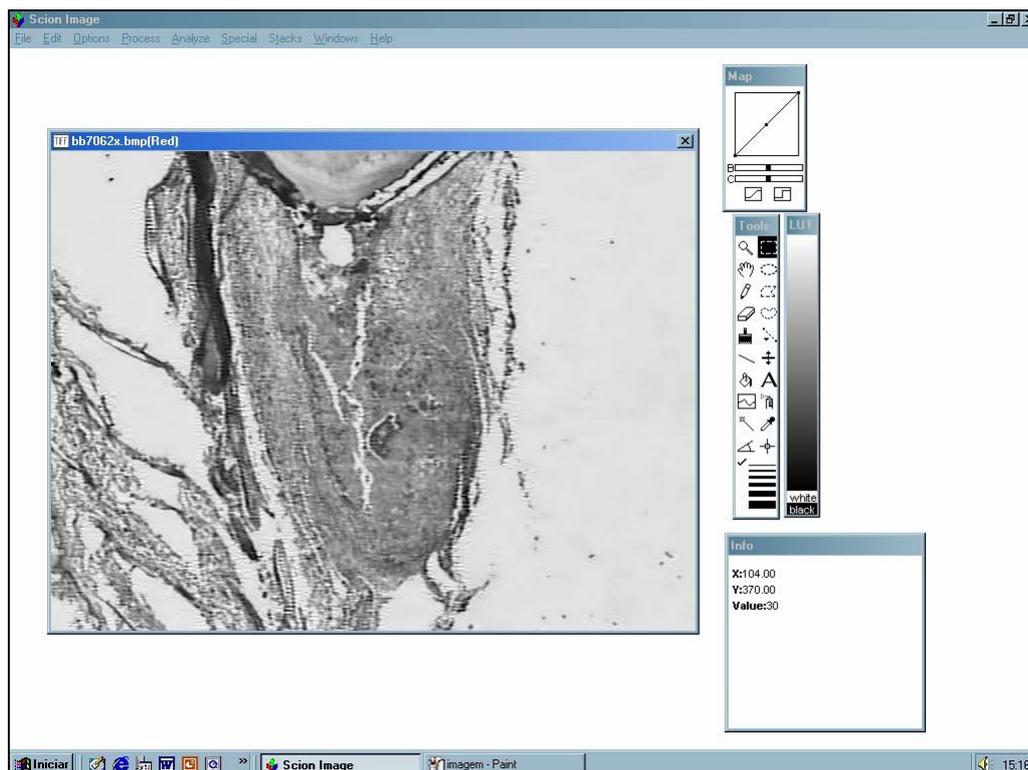
morfométrica (contagem dos eventos) foram realizadas por meio da avaliação e quantificação dos eventos mencionados acima, dentro destas áreas situadas na cápsula reacional (Figura 8).



**Figura 8** - Regiões a serem determinadas para contagem (morfometria) dos eventos histopatológicos.

Fichas especiais foram confeccionadas quantificando qualitativamente os eventos histopatológicos básicos em graus de intensidade (Apêndice), estes índices foram utilizados para registro de infiltrado inflamatório, com seus tipos celulares, divididos em células polimorfonucleares, mononucleares e células gigantes inflamatórias; fenômenos vasculares como hiperemia, edema, hemorragia e trombose; presença de fibroblastos, vascularização, mineralização, colageinização e necrose.

Já a área total da cápsula reacional foi calculada com o uso do programa *Image Tool* (InstallShield Corporation, EUA) (Figura 9).



**Figura 9** - Imagem da tela do computador mostrando o Software Image Tool que será utilizado para aferir a área da cápsula reacional.

## 10 - Análise estatística

Quantificados os diversos componentes dos eventos histopatológicos, os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o software *Graph Pad*<sup>®</sup> para Windows.



## *Resultados*

## RESULTADOS

### 1 - Análise Morfológica e Morfométrica

Os resultados foram obtidos a partir da análise qualitativa (morfológica) e quantitativa (morfométrica) dos tecidos, levando-se em consideração os seguintes eventos histopatológicos: infiltrado inflamatório, celularidade, vascularização e atividade macrofágica (nódulos reacionais) na cápsula reacional. Os valores determinados para os eventos histopatológicos são as médias encontradas nas áreas pré-determinadas para a aferição dos mesmos e estão listados nas tabelas que se seguem à análise, agrupados de acordo com os períodos estratégicos estudados. Os valores originais estão listados no apêndice.

#### Período de 7 dias

##### Grupo 1

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 1,425 mm<sup>2</sup>, considerada moderada, com moderada população de fibroblastos (23,6) e vascularização (1,6) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se intenso (30,1), com predomínio de células mononucleares. Observou-se moderada atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (2,2) e por células gigantes inflamatórias (1,1), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se intenso (1,8).

## **Grupo 2**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 1,367 mm<sup>2</sup>, considerada moderada, com intensa população de fibroblastos (35,8) e vascularização (2,3) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se intenso (39,6), com predomínio de células mononucleares. Observou-se moderada atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (2,2) e por células gigantes inflamatórias (1,2), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se intenso (2,5).

## **Grupo 3**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 1,370 mm<sup>2</sup>, considerada moderada, com intensa população de fibroblastos (36,4) e vascularização (2,0) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se intenso (39,7), com predomínio de células mononucleares. Observou-se moderada atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (2,3) e por células gigantes inflamatórias (1,2), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se intenso (1,7).

#### **Grupo 4**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 1,424 mm<sup>2</sup>, considerada moderada, com moderada população de fibroblastos (23,6) e vascularização (1,8) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

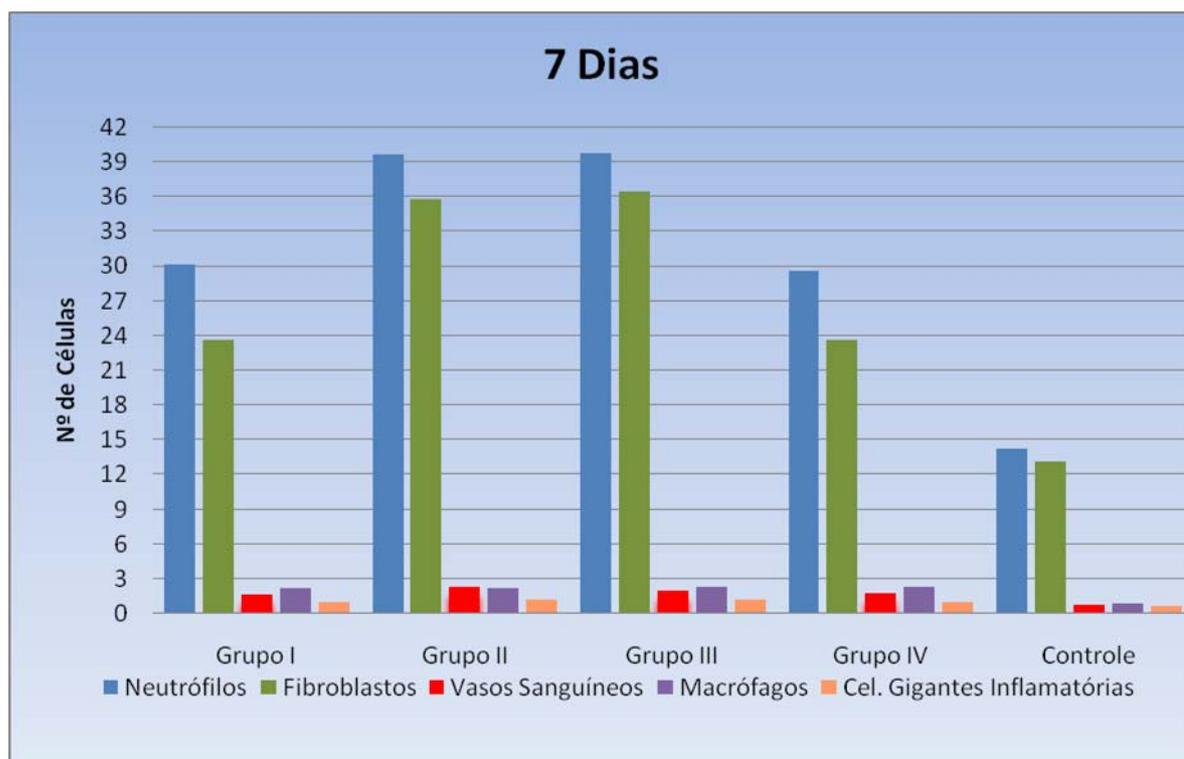
Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se intenso (29,6), com predomínio de células mononucleares. Observou-se moderada atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (2,3) e por células gigantes inflamatórias (1,0), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se intenso (1,8).

#### **Grupo Controle**

O grupo controle não apresentou cápsula reacional. A área principal da análise apresentou intensa população de fibroblastos (23,0) e vascularização (1,7) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se discreto (14,2), com predomínio de células mononucleares. Observou-se discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (0,9) e por células gigantes inflamatórias (0,7), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se moderado (1,2).

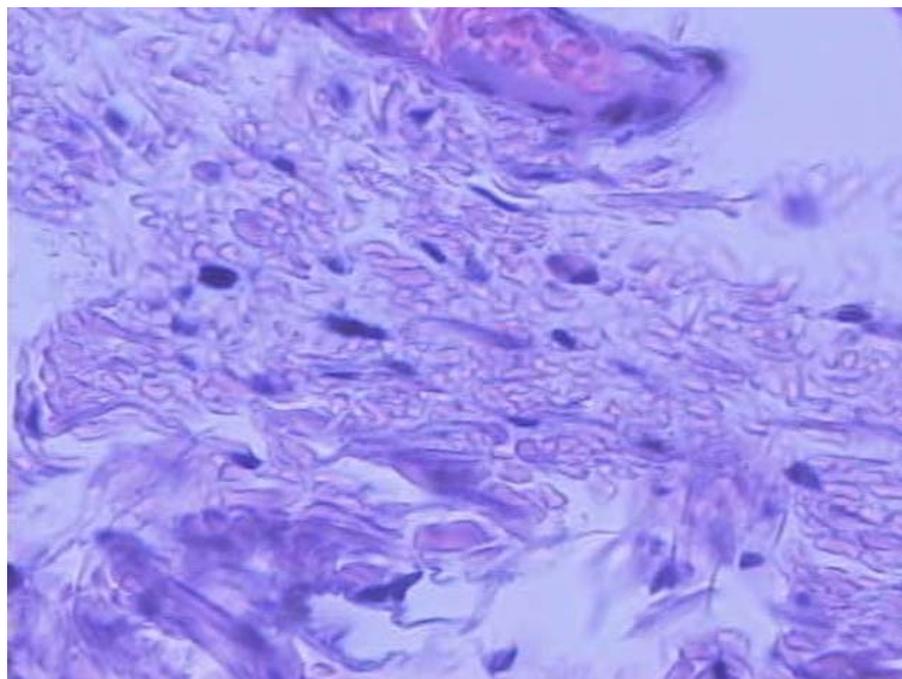
O gráfico 1 ilustra os eventos histopatológicos encontrados no período de 7 dias e a tabela 3 ilustra os valores médios dos eventos observados.



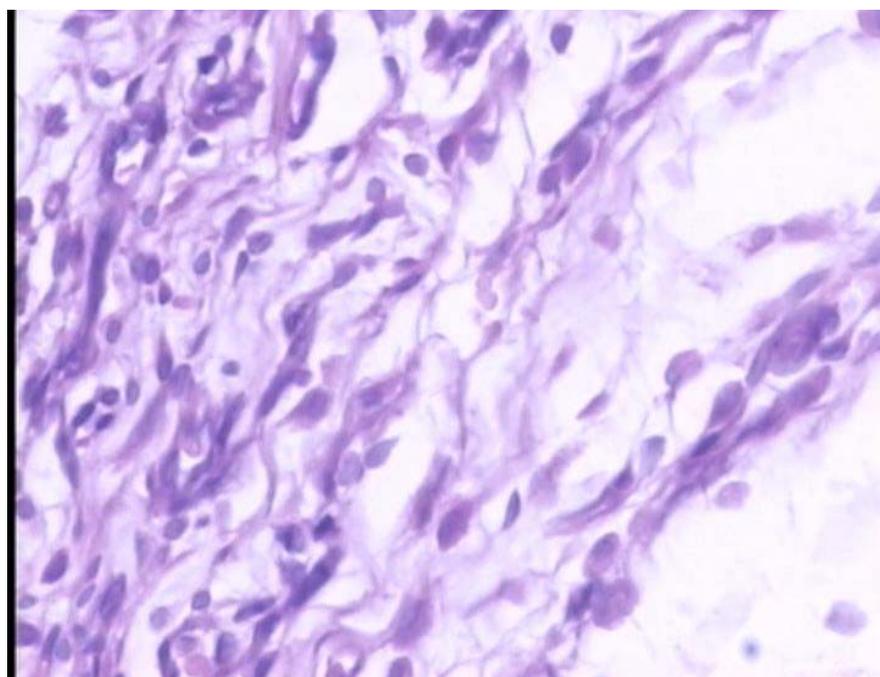
**Gráfico 1** – Eventos histopatológicos encontrados no período de 7 dias.

**Tabela 3** - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 7 dias.

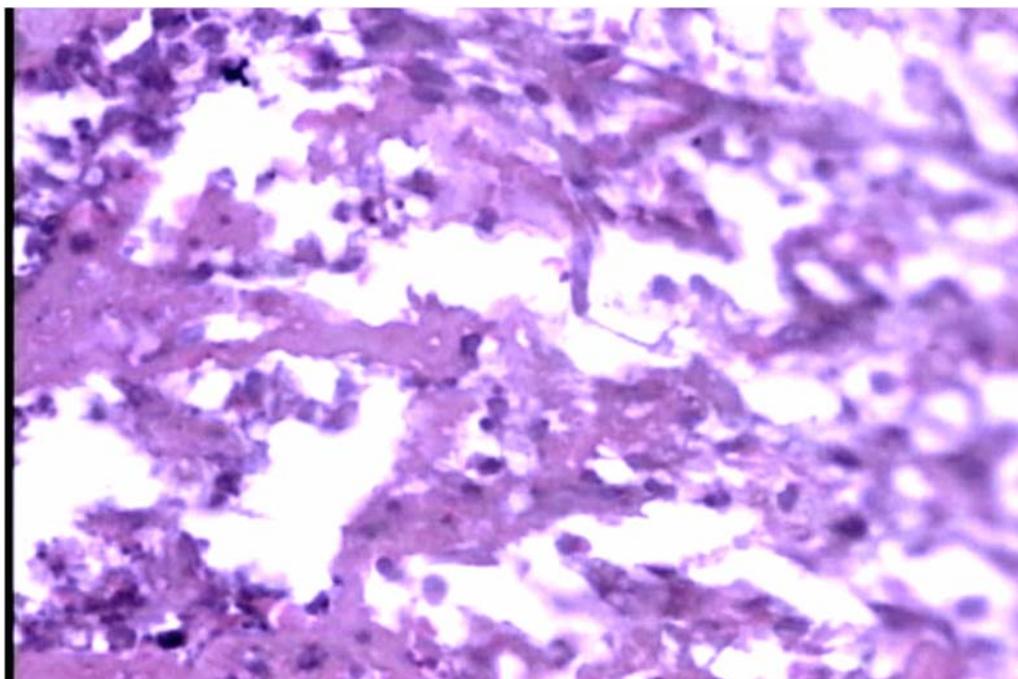
EVENTOS HISTOPATOLÓGICOS		GRUPOS EXPERIMENTAIS				
		1	2	3	4	Controle
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	Polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares	30,1	39,6	39,7	29,6	14,2
CELULARIDADE/VASCULARIZAÇÃO	Fibroblastos	23,6	35,8	36,4	23,6	13,1
	Vasos sanguíneos	1,6	2,3	2,0	1,8	0,8
ATIVIDADE MACROFÁGICA	Fagócito mononuclear (macrófago)	2,2	2,2	2,3	2,3	0,9
	Células Gigantes Inflatórias	1,1	1,2	1,2	1,0	0,7
	Índice Geral de Inflamação (IGI)	1,8	2,5	1,7	1,8	1,2
	Área da cápsula (mm <sup>2</sup> )	1,425	1,367	1,370	1,424	-



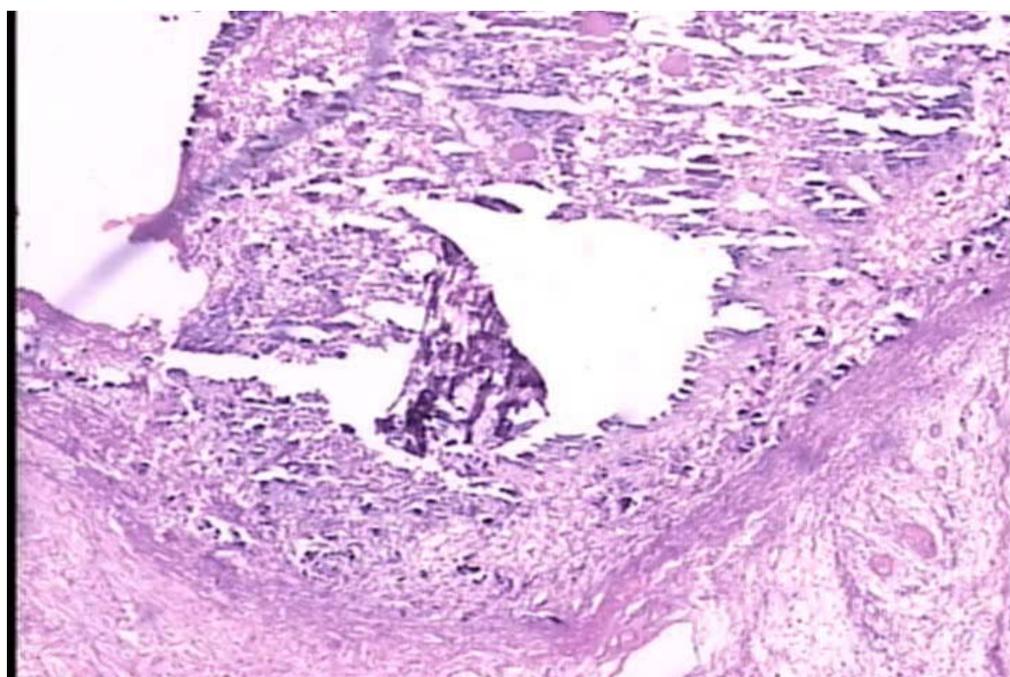
**Figura 10** - Grupo Controle - 7 dias - Reação verificada em área representativa da lateral do tubo de polietileno, com índice geral de inflamação considerado moderado. H.E. Nikon 120 X.



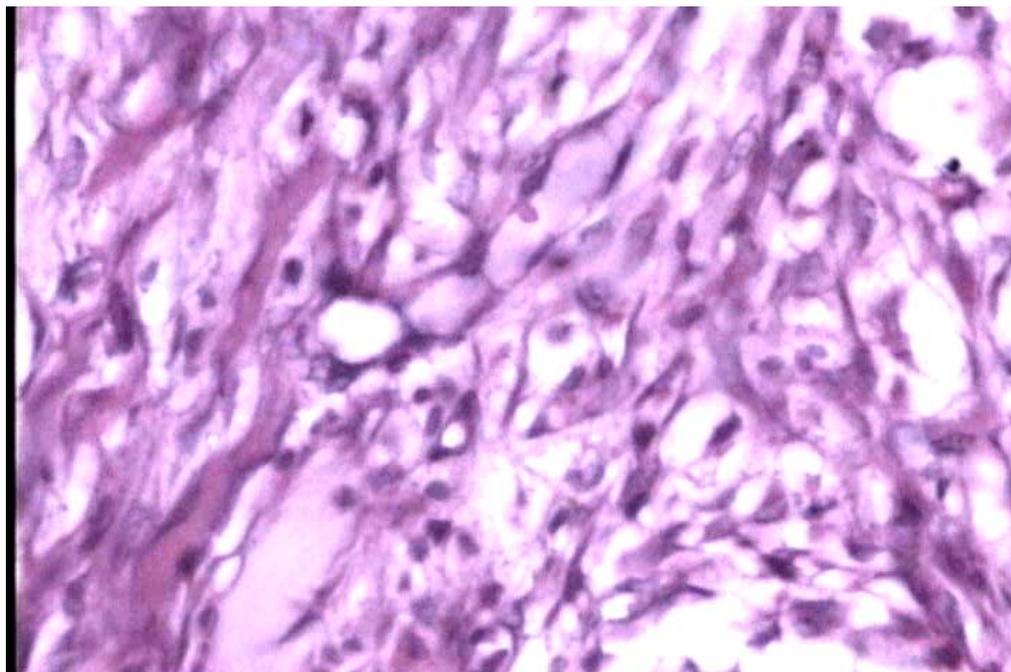
**Figura 11** - Grupo 1 - 7 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado intenso. H.E. Nikon 120 X.



**Figura 12** – Grupo 2 - 7 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado intenso. H.E. Nikon 120 X.



**Figura 13** - Grupo 3 - 7 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado intenso. H.E. Nikon 120 X.



**Figura 14** – Grupo 4 - 7 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado intenso. H.E. Nikon 120 X.

### **Período de 21 dias**

#### **Grupo 1**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 0,693 mm<sup>2</sup>, considerada moderada, com moderada população de fibroblastos (10,7) e vascularização (1,3) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se moderado (27,2), com predomínio de células mononucleares. Observou-se moderada atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (1,4) e por células gigantes inflamatórias (1,2), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se discreto (1,0).

## **Grupo 2**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 0,725 mm<sup>2</sup>, considerada moderada, com moderada população de fibroblastos (11,7) e vascularização (1,5) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se moderado (27,6), com predomínio de células mononucleares. Observou-se moderada atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (1,6) e por células gigantes inflamatórias (1,3), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se moderado (1,2).

## **Grupo 3**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 0,694 mm<sup>2</sup>, considerada moderada, com moderada população de fibroblastos (10,8) e vascularização (1,3) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se moderado (27,3), com predomínio de células mononucleares. Observou-se moderada atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (1,3) e por células gigantes inflamatórias (1,2), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se moderado (1,2).

#### **Grupo 4**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 0,719 mm<sup>2</sup>, considerada moderada, com moderada população de fibroblastos (11,7) e vascularização (1,5) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

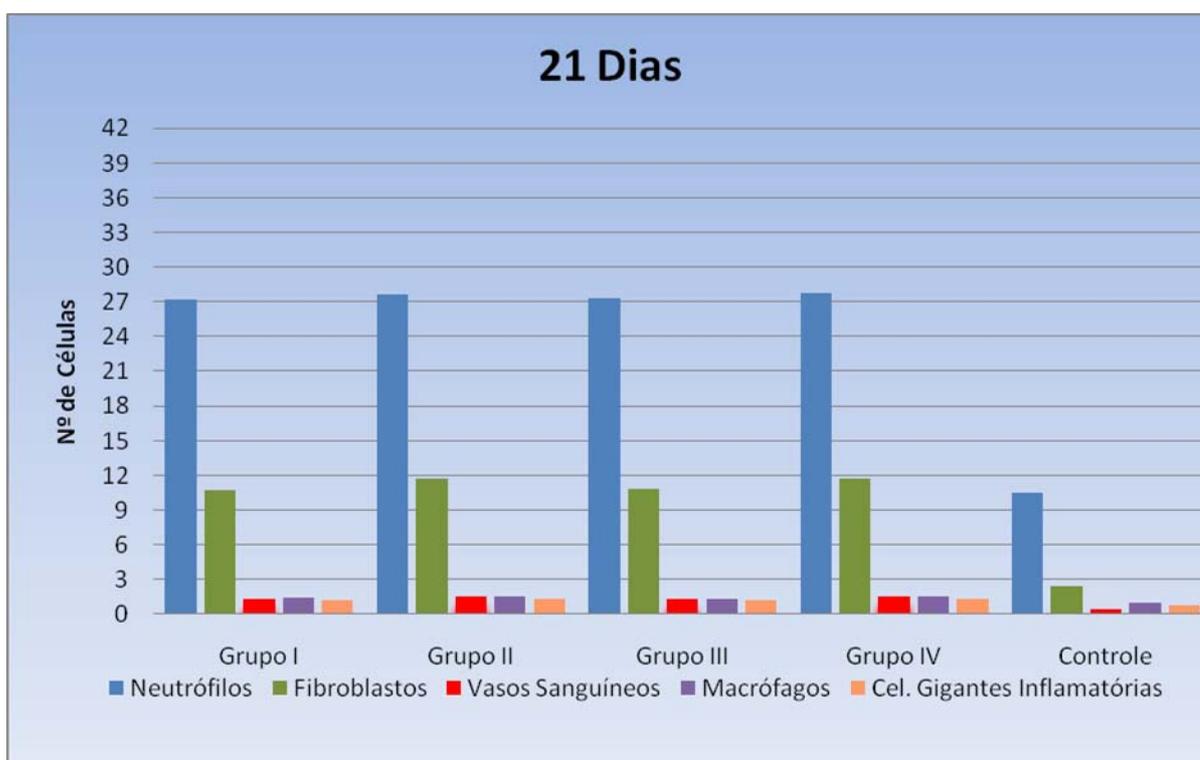
Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se moderado (27,8), com predomínio de células mononucleares. Observou-se moderada atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (1,5) e por células gigantes inflamatórias (1,3), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se discreto (1,0).

#### **Grupo Controle**

O grupo controle não apresentou cápsula reacional. A área principal da análise apresentou discreta população de fibroblastos (2,4) e vascularização (0,4) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se discreto (10,5), com predomínio de células mononucleares. Observou-se discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (1,0) e por células gigantes inflamatórias (0,8), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se discreto (0,6).

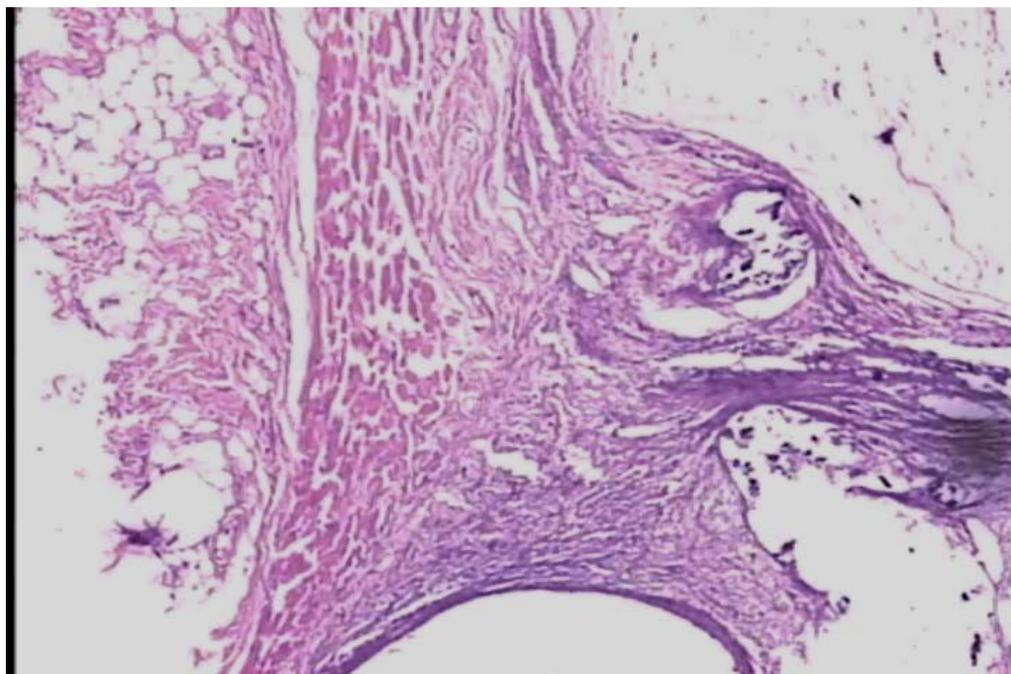
O gráfico 2 ilustra os eventos histopatológicos encontrados no período de 21 dias, os valores médios dos eventos encontrados neste período estão expressos na tabela 4.



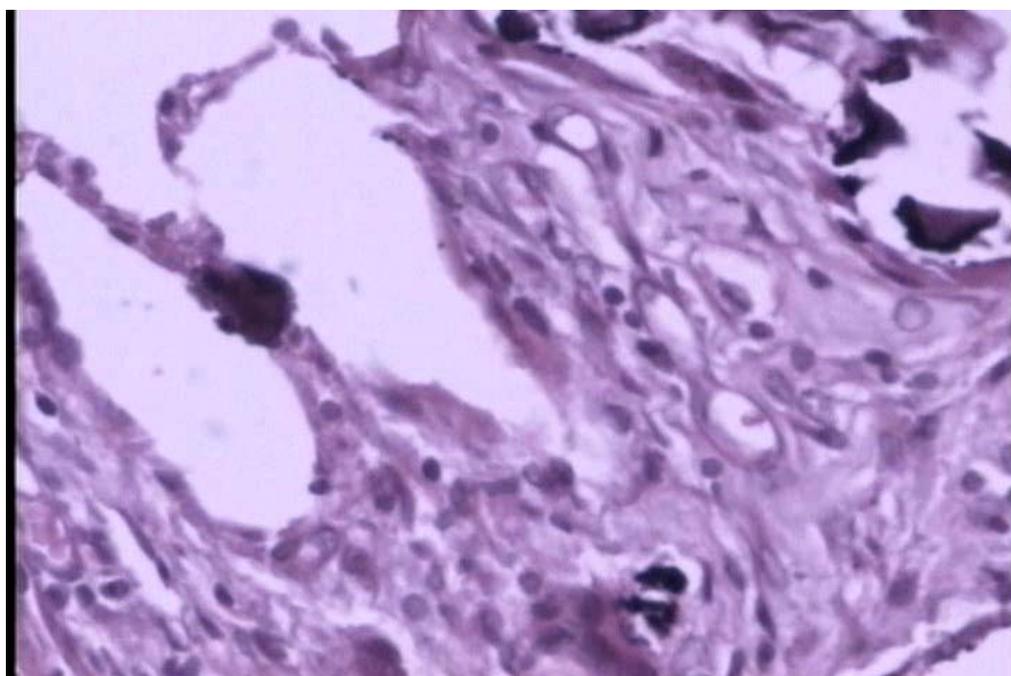
**Gráfico 2** – Eventos histopatológicos encontrados no período de 21 dias.

**Tabela 4** - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 21 dias.

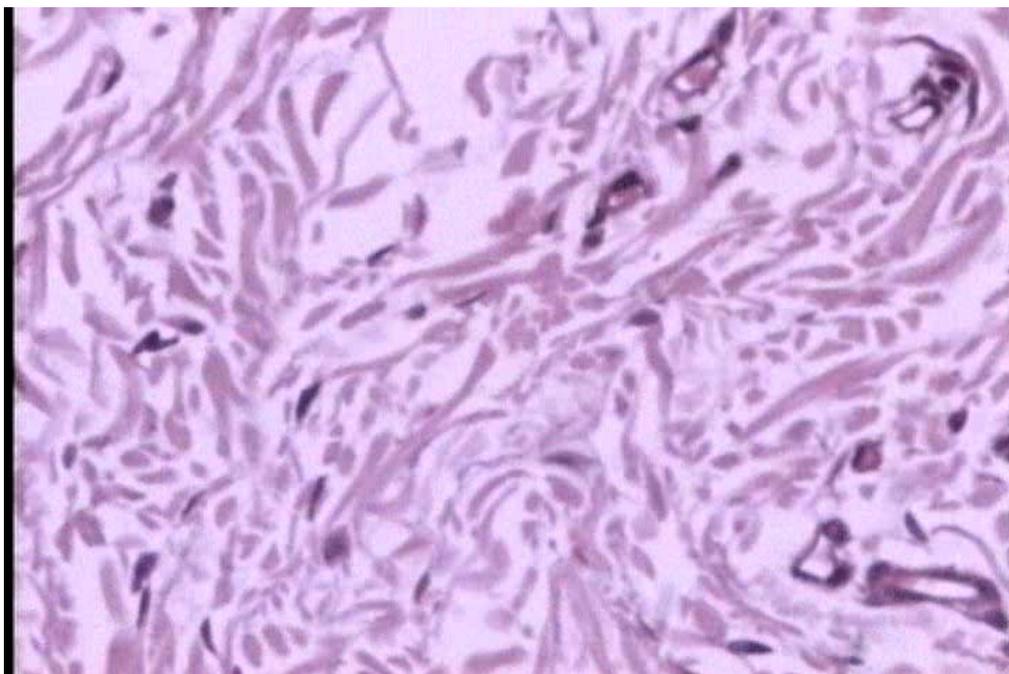
EVENTOS HISTOPATOLÓGICOS		GRUPOS EXPERIMENTAIS				
		1	2	3	4	Controle
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	Polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares	27,2	27,6	27,3	27,8	10,5
CELULARIDADE/ VASCULARIZAÇÃO	Fibroblastos	10,7	11,7	10,8	11,7	2,4
	Vasos sanguíneos	1,3	1,5	1,3	1,5	0,4
ATIVIDADE MACROFÁGICA	Fagócito mononuclear (macrófago)	1,4	1,6	1,3	1,5	1,0
	Células Gigantes Inflamatórias	1,2	1,3	1,2	1,3	0,8
	Índice Geral de Inflamação (IGI)	1,0	1,2	1,2	1,0	0,6
	Área da cápsula (mm <sup>2</sup> )	0,693	0,725	0,694	0,719	-



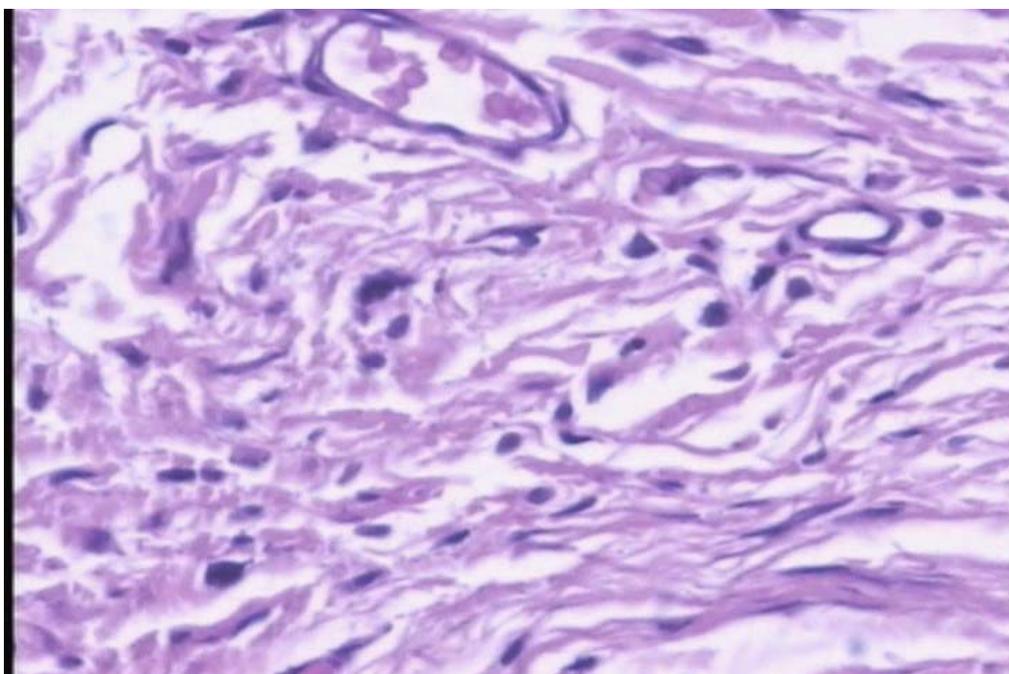
**Figura 15** - Grupo Controle - 21 dias - Reação verificada em área representativa da lateral do tubo de polietileno, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120 X.



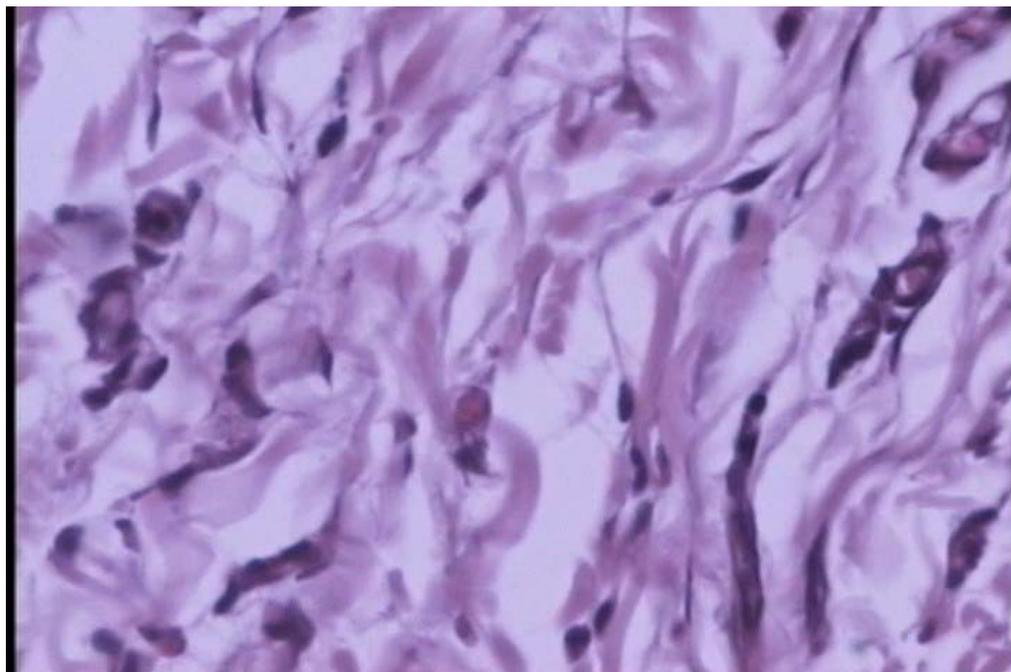
**Figura 16** - Grupo 1 - 21 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.



**Figura 17** - Grupo 1 - 21 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado moderado. H.E. Nikon 120X.



**Figura 18** - Grupo 3 - 21 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado moderado . H.E. Nikon 120X.



**Figura 19** – Grupo 4 - 21 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.

### **Período de 42 dias**

#### **Grupo 1**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 0,573 mm<sup>2</sup>, considerada discreta, com discreta população de fibroblastos (5,9) e vascularização (1,2) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se discreto (12,5), com predomínio de células mononucleares. Observou-se discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (0,8) e por células gigantes inflamatórias (0,4), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se discreto (0,5).

## **Grupo 2**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 0,569 mm<sup>2</sup>, considerada discreta, com discreta população de fibroblastos (6,4) e vascularização (1,3) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se discreto (13,0), com predomínio de células mononucleares. Observou-se discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (1,1) e por células gigantes inflamatórias (0,6), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se discreto (1,0).

## **Grupo 3**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 0,572 mm<sup>2</sup>, considerada discreta, com discreta população de fibroblastos (6,0) e vascularização (1,2) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se discreto (12,3), com predomínio de células mononucleares. Observou-se discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (0,9) e por células gigantes inflamatórias (0,4), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se discreto (0,5).

#### **Grupo 4**

A cápsula reacional junto à abertura tubular, área principal da análise apresentou, área de 0,570 mm<sup>2</sup>, considerada discreta, com discreta população de fibroblastos (6,2) e vascularização (1,3) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

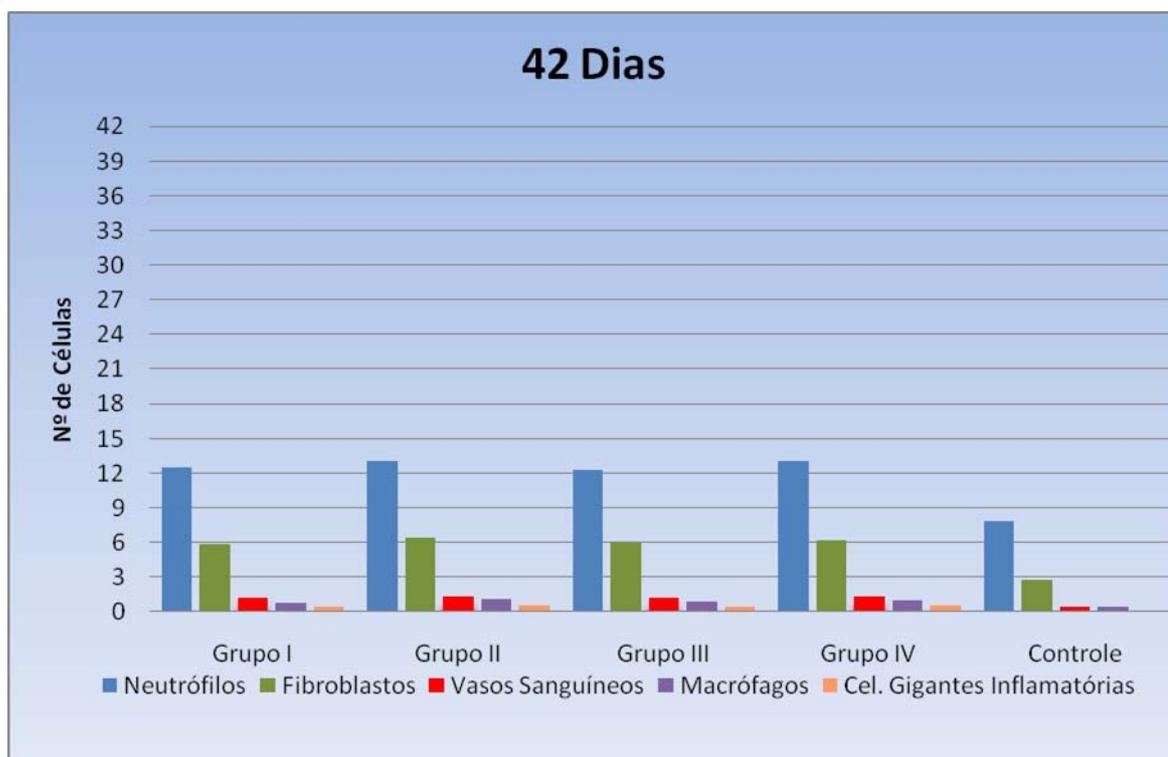
Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se discreto (13,1), com predomínio de células mononucleares. Observou-se discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (1,0) e por células gigantes inflamatórias (0,5), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se discreto (0,5).

#### **Grupo Controle**

O grupo controle não apresentou cápsula reacional. A área principal da análise apresentou discreta população de fibroblastos (2,8) e vascularização (0,4) para uma discreta colagenização, exibindo ainda, na interface do espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, mínimo resíduo necrótico.

Nesta região, o infiltrado inflamatório apresentou-se discreto (7,8), com predomínio de células mononucleares. Observou-se discreta atividade macrofágica, exercida preponderantemente por fagócitos mononucleares (0,4) e por células gigantes inflamatórias (0,1), sobre os resíduos de material dispersos, tanto no interior do cone capsular e superfície da interface com o tubo de polietileno, quanto, esporadicamente, nas adjacências. O índice geral de inflamação mostrou-se discreto (0,0).

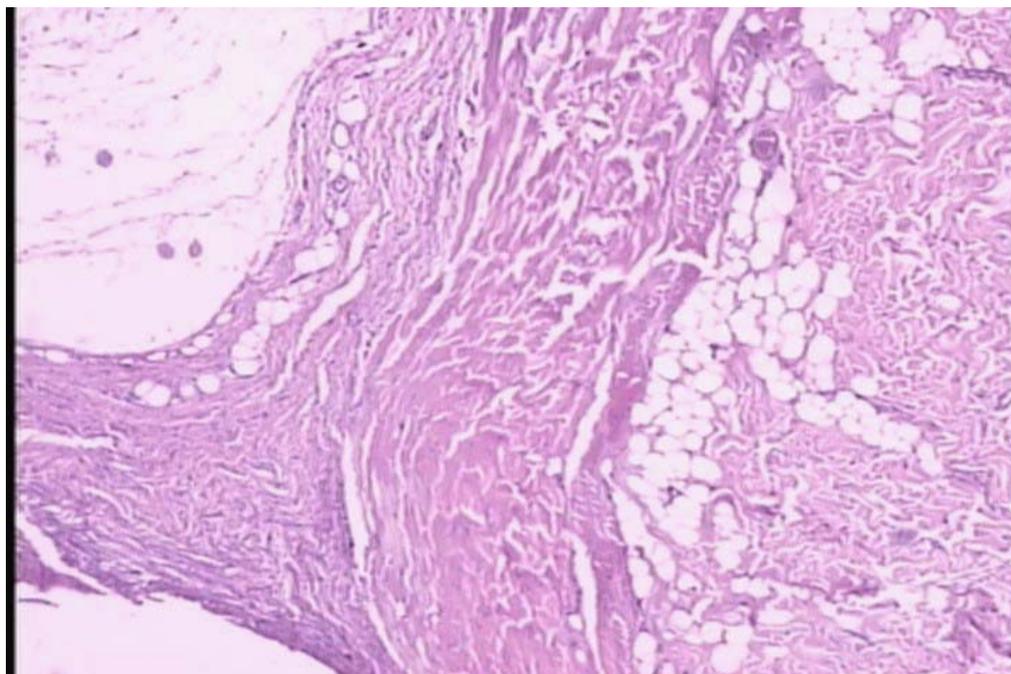
O gráfico 3 ilustra os eventos histopatológicos encontrados no período de 42 dias e na tabela 5, estão as médias dos eventos histopatológicos.



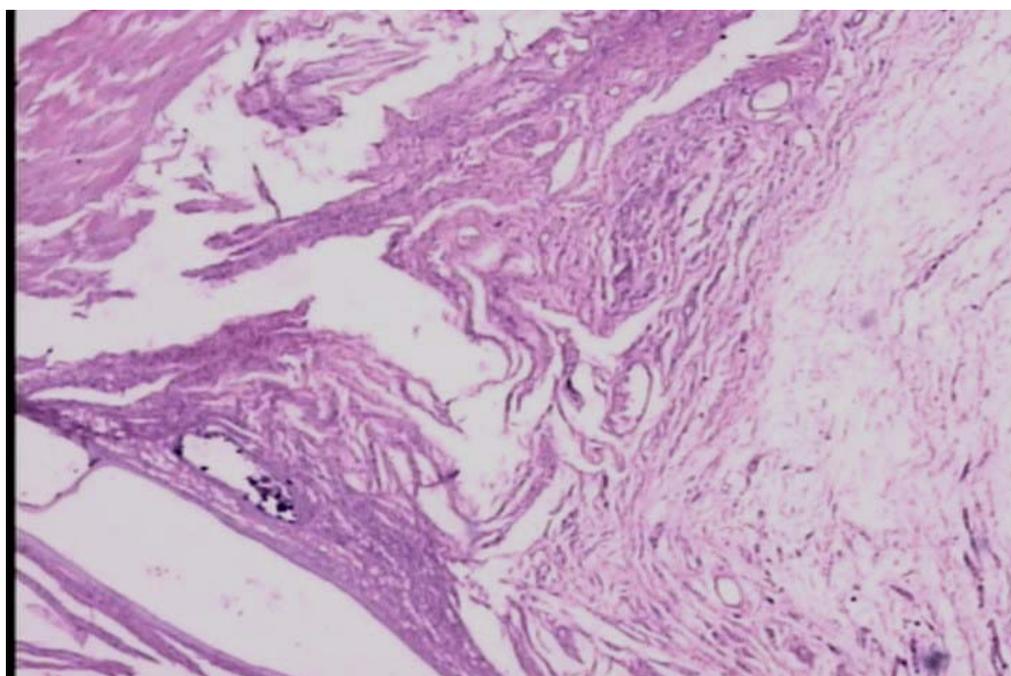
**Gráfico 3** – Eventos histopatológicos encontrados no período de 42 dias.

**Tabela 5** - Valores médios dos eventos histopatológicos observados em cada grupo no período de 42 dias.

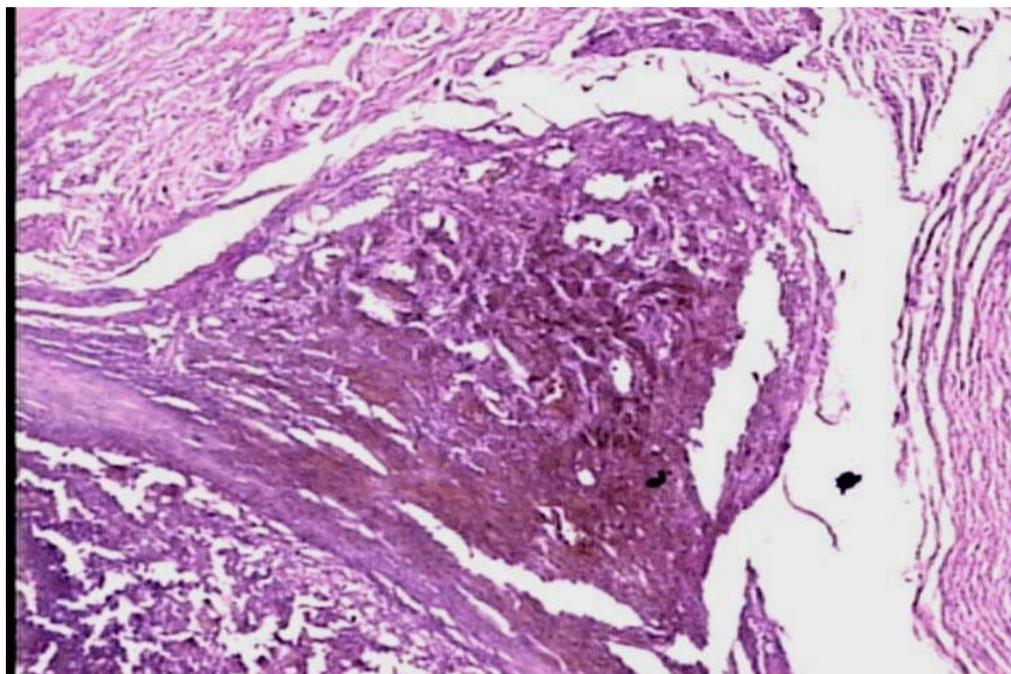
EVENTOS HISTOPATOLÓGICOS		GRUPOS				
		EXPERIMENTAIS				
		1	2	3	4	Controle
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	Polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares	12,5	13,0	12,3	13,1	7,8
CELULARIDADE/ VASCULARIZAÇÃO	Fibroblastos	5,9	6,4	6,0	6,2	2,8
	Vasos sanguíneos	1,2	1,3	1,2	1,3	0,4
ATIVIDADE MACROFÁGICA	Fagócito mononuclear (macrófago)	0,8	1,1	0,9	1,0	0,4
	Células Gigantes Inflamatórias	0,4	0,6	0,4	0,5	0,1
	Índice Geral de Inflamação (IGI)	0,5	1,0	0,5	0,5	0,0
	Área da cápsula (mm <sup>2</sup> )	0,573	0,569	0,572	0,570	-



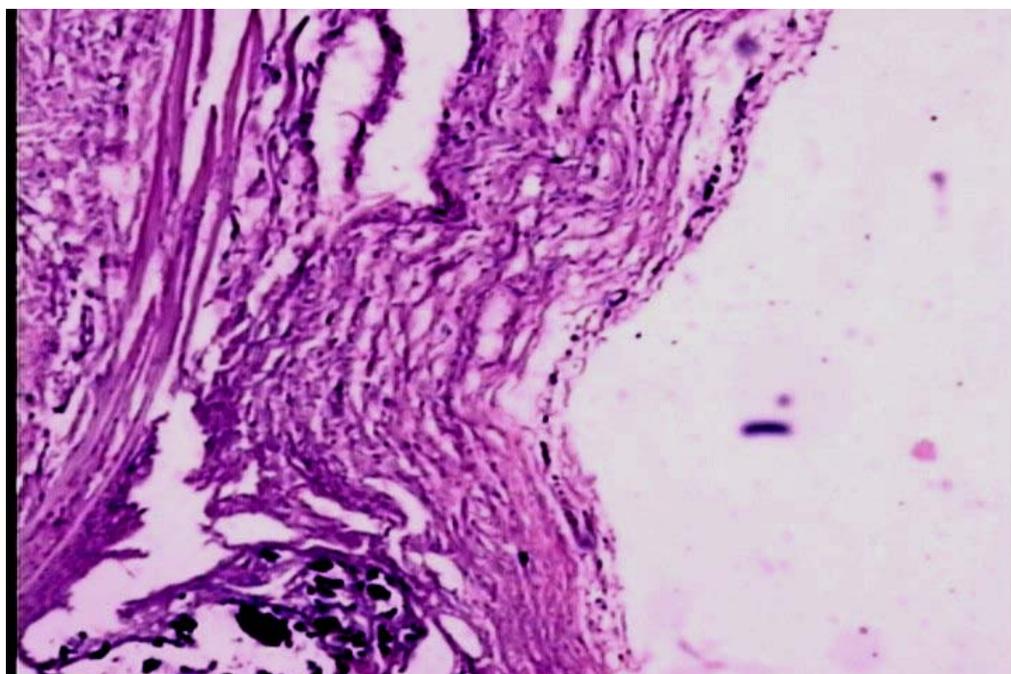
**Figura 20** - Grupo Controle - 42 dias - Reação verificada em área representativa da lateral do tubo de polietileno, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.



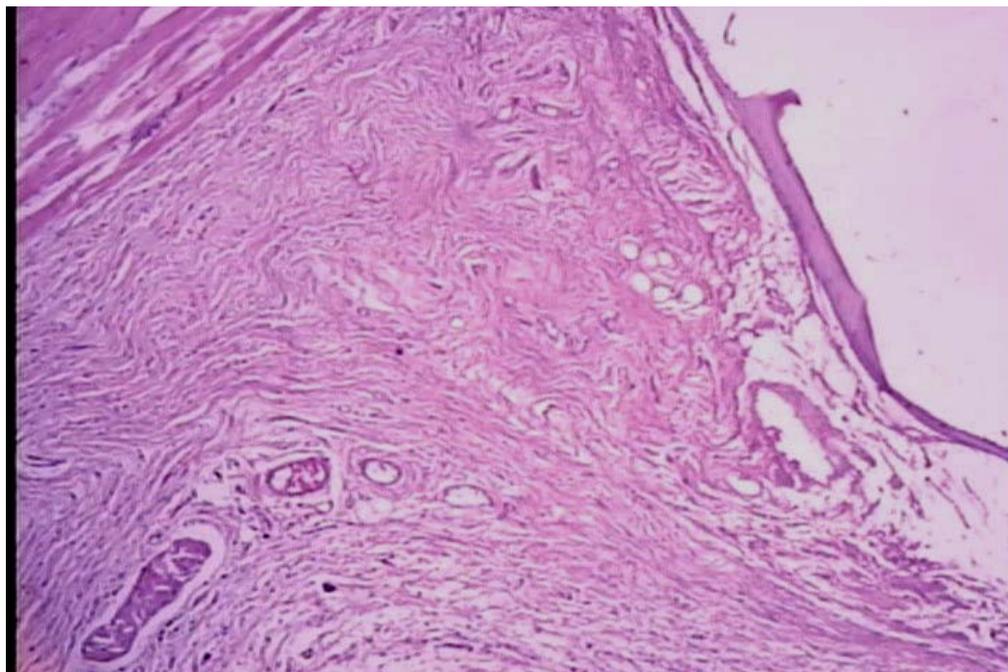
**Figura 21** - Grupo 1 - 42 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.



**Figura 22** - Grupo 2 - 42 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.



**Figura 23** – Grupo 3 - 42 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.



**Figura 24-** Grupo 4 - 42 dias - Reação verificada em área representativa da cápsula junto à abertura tubular, com índice geral de inflamação considerado discreto. H.E. Nikon 120X.

## 2 - Análise estatística dos dados obtidos na morfometria

Para melhor interpretação da análise morfométrica convencionou-se dividir os dados de acordo com os eventos aferidos, sendo eles: células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares, fibroblastos, vasos sanguíneos, fagócitos mononucleares (macrófagos), células gigantes e finalmente a área da cápsula inflamatória. Os dados utilizados para esta análise foram os valores correspondentes à média obtida na quantificação dos eventos encontrados nas áreas determinadas na cápsula reacional. O programa estatístico utilizado foi o *Graph Pad Instat*<sup>®</sup> para Windows.

Os grupos foram assim denominados:

- Grupo 1: Hidróxido de cálcio (P.A.) + propilenoglicol;
- Grupo 2: Fração acetato de etila de *P. umbellata* + propilenoglicol;
- Grupo 3 : Fração acetato de etila de *P. umbellata* + de hidróxido de cálcio;
- Grupo 4: 70  $\mu$ L da “pasta base” + 50 mg de hidróxido de cálcio +25 mg de óxido de zinco (P. A.);
- Grupo controle: Porção lateral do tubo de polietileno.

### 3 - Infiltrado Inflamatório

#### Mononucleares e polimorfonucleares (neutrófilos)

A Tabela 6 evidencia as médias encontradas nas amostras para a quantidade de mononucleares e polimorfonucleares para as diferentes pastas e períodos estudados.

**Tabela 6** - Médias da quantidade de células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares encontrados nos três períodos estudados.

PERÍODO		Grupo 1	Grupo2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
7 DIAS	Média amostra 1	32,6	41,8	40,8	31,8	15,2
	Média amostra 2	30,8	40,4	39,2	30,6	13,8
	Média amostra 3	28,4	36	36	27,6	14,4
	Média amostra 4	31,4	39,6	42,4	30,6	13
	Média amostra 5	37,4	40,4	40,4	27,6	14,8
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>32,1 ± 3,32</b>	<b>39,6 ± 2,18</b>	<b>39,7 ± 2,39</b>	<b>29,6 ± 1,92</b>	<b>14,2 ± 0,86</b>
21 DIAS	Média amostra 1	25,6	27,6	26	28,2	9,4
	Média amostra 2	28	27,4	28,4	27,8	10
	Média amostra 3	27	28,2	27,2	28	10,6
	Média amostra 4	28	27,2	27,6	26,6	12
	Média amostra 5	27,4	28	27,4	28,6	10,6
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>27,2 ± 0,98</b>	<b>27,6 ± 0,41</b>	<b>27,3 ± 0,86</b>	<b>27,8 ± 0,75</b>	<b>10,5 ± 0,96</b>
42 DIAS	Média amostra 1	12	12	12	12,4	7,6
	Média amostra 2	11,8	11,4	11,4	11,6	8,2
	Média amostra 3	13,4	15,2	13,6	15	7,6
	Média amostra 4	11,8	11,6	11,8	11,6	8,2
	Média amostra 5	13,6	15	13	15	7,6
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>12,5 ± 0,87</b>	<b>13 ± 1,89</b>	<b>12,3 ± 0,90</b>	<b>13,1 ± 1,74</b>	<b>7,8 ± 0,32</b>

Primeiramente, as médias da tabela 4 foram submetidas ao programa estatístico *Graphpad Instat*<sup>®</sup> para Windows, a fim de avaliar estatisticamente a diferença no número de polimorfonucleares encontrados nas diferentes pastas testadas em cada período de tempo separadamente (7, 21 e 42 dias)

Diante da normalidade dos valores das médias encontradas para o número de polimorfonucleares presentes no período de 21 dias, foi realizada a análise de variância que indicou diferença estatística significativa entre o número de polimorfonucleares presentes nas lâminas avaliadas, conforme a tabela 7.

**Tabela 7**– Valores da análise de variância para o número de polimorfonucleares presentes nas amostras no período de 21 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-0.4800	ns	P >0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-0.1200	ns	P >0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-0.6400	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	16.680	***	P >0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	0.3600	ns	P >0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	-0.1600	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	17.160	***	P >0.05
Grupo 3 vs. Grupo 4	-0.5200	ns	P >0.05
Grupo 3 vs. Controle	16.800	***	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	17.320	***	P < 0.05

No período de 21 dias, a análise de variância mostrou diferença estatística significativa na comparação de todas as pastas apenas com o grupo controle.

Para a avaliação do número de polimorfonucleares nos períodos de 7 e 42 dias, utilizou-se inicialmente o teste de Kruskal-Wallis, diante da não normalidade dos valores amostrais das médias desse grupo, cujo valor foi de KW = 42.111 ( 7 dias) e KW =11.853 (42 dias), demonstrando diferença estatística significativa. Para a avaliação dessa diferença foi usado o Teste de Múltiplas Comparações de Dunn, cujos resultados e valores estão expressos nas tabelas 8 e 9.

**Tabela 8**– Valores da análise de variância para o número de polimorfonucleares presentes nas amostras no período de 7 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-15.400	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-16.200	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	6.800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	18.800	*	P < 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	-0.8000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	22.200	**	P < 0.01
Grupo 2 vs. Controle	34.200	***	P < 0.001
Grupo 3 vs. Grupo 4	23.000	**	P < 0.01
Grupo 3 vs. Controle	35.000	***	P < 0.001
Grupo 4 vs. Controle	12.000	ns	P > 0.05

**Tabela 9**– Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de polimorfonucleares presentes nas amostras no período de 42 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	0.3000	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	1.600	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-0,3000	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	12.900	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	1.300	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	-0.6000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	12.600	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Grupo 4	-1.900	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	11.300	ns	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	13.200	*	P < 0.05

No período de 7 dias, diferença estatisticamente ocorreu ao comparar os grupos 1, 2 e 3 com o grupo controle e na comparação do grupos 2 e 3 com o grupo 4. No período de 21 dias, diferença estatística significativa foi observada apenas na comparação dos grupos testados com o grupo controle.

Decorridos 42 dias de experimento, diferença estatística significativa foi observada apenas quando comparados o número de polimorfonucleares do grupo 4 com o grupo controle.

A seguir novas análises estatísticas foram realizadas, para avaliar a interação entre grupos e períodos experimentais. As médias foram agrupadas e submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, diante da não normalidade dos valores amostrais desse grupo, cujo valor foi de  $KW = 230.183$ , indicando diferença estatística significativa em relação ao número de polimorfonucleares encontrados na interação entre os grupos e períodos de tempo.

Para identificar quais pastas medicamentosas eram diferentes entre si, aplicou-se o teste de Múltiplas Comparações de Dunn, conforme tabela 10.

**Tabela 10** - Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para polimorfonucleares.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-4.100	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 3	-2.500	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 4	-0,2333	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Controle	283.333	***	$P < 0.01$
Grupo 2 vs. Grupo 3	1.600	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 4	3.867	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Controle	32.433	***	$P < 0.001$
Grupo 3 vs. Grupo 4	2.267	ns	$P > 0.05$
Grupo 3 vs. Controle	30.833	***	$P > 0.05$
Grupo 4 vs. Controle	28.567	***	$P < 0.01$

O teste não paramétrico de Múltiplas Comparações de Dunn mostrou não haver diferença estatística significativa quando comparadas as diferentes pastas testadas em relação ao infiltrado inflamatório (polimorfos e mononucleares), porém, o teste constatou diferença estatística ( $p > 0,005$ ) entre os grupos testados quando comparados ao Grupo controle negativo (lateral do tubo).

Para avaliar a diferença do número de polimorfonucleares em relação aos tempos experimentais (7, 21 e 42 dias) foi realizado o teste de Múltiplas Comparações de Dunn (Tabela 11).

**Tabela 11** – Teste de Dunn para o número de polimorfonucleares nos diferentes tempos experimentais.

Comparação	Diferenças	P	Valor
7 dias vs. 21 dias	-18.100	**	P < 0.01
7 dias vs. 42 dias	39.920	***	P < 0.001
21 dias vs. 42 dias	21.820	**	P < 0.01

O Teste de Múltiplas comparações de Dunn indicou haver diferença ( $p < 0,01$ ) estatística significativa em relação ao número de polimorfonucleares nos diferentes tempos experimentais.

#### **4 - Celularidade**

##### **Fibroblastos**

A tabela 12 evidencia as médias encontradas nas para o número de fibroblastos nas diferentes pastas e períodos estudados.

**Tabela 12** - Médias da quantidade de fibroblastos encontrados nos três períodos estudados.

PERÍODO		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
7 DIAS	Média amostra 1	20,4	35	36	20,2	13,2
	Média amostra 2	23,8	36,2	36,2	23,8	13,6
	Média amostra 3	24,8	36,4	37	25,4	13
	Média amostra 4	23,8	35,6	36,2	23,2	12,8
	Média amostra 5	25,2	36,2	36,6	25,4	13
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>23,6 ± 1,89</b>	<b>35,8 ± 0,57</b>	<b>36,4 ± 0,4</b>	<b>23,6 ± 2,13</b>	<b>13,1 ± 0,30</b>
21 DIAS	Média amostra 1	11	12,2	11	12,2	3,4
	Média amostra 2	10,6	11,4	10,8	11,4	2,2
	Média amostra 3	10,8	12	10,8	11,8	2
	Média amostra 4	10,6	11,4	10,6	11,6	2,4
	Média amostra 5	10,6	11,8	10,8	11,8	2,2
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>10,7 ± 0,17</b>	<b>11,7 ± 0,35</b>	<b>10,8 ± 0,14</b>	<b>11,7 ± 0,29</b>	<b>2,4 ± 0,55</b>
42 DIAS	Média amostra 1	7	7,4	6,8	7,4	3
	Média amostra 2	5,2	6,2	5,2	6	2,4
	Média amostra 3	6	6,2	6,2	6	3
	Média amostra 4	5,4	6,2	5,6	6	2,6
	Média amostra 5	6,2	6	6,2	6	3
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>5,9 ± 0,71</b>	<b>6,4 ± 0,56</b>	<b>6 ± 0,61</b>	<b>6,2 ± 0,62</b>	<b>2,81 ± 0,28</b>

As médias da tabela 12 foram submetidas ao programa estatístico *Graphpad Instat*<sup>®</sup>, a fim de avaliar estatisticamente a diferença no número de fibroblastos encontrados nas diferentes pastas testadas em cada período de tempo (7, 21 e 42 dias)

Diante da normalidade da amostra, para os valores encontrados no período de 7 dias, foi realizada a análise de variância que indicou diferença estatística significativa entre o número de fibroblastos presentes nas lâminas avaliadas nesses intervalos de tempo, conforme a tabela 13.

**Tabela 13** - Valores da análise de variância para o número de fibroblastos presentes nas amostras no período de 7 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-12.800	***	P < 0.001
Grupo 1 vs. Grupo 3	-12.800	***	P < 0.001
Grupo 1 vs. Grupo 4	-1.735	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	10.480	***	P < 0.001
Grupo 2 vs. Grupo 3	-0.5200	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	12.280	***	P < 0.001
Grupo 2 vs. Controle	22.760	***	P < 0.001
Grupo 3 vs. Grupo 4	12.800	***	P < 0.001
Grupo 3 vs. Controle	23.280	***	P < 0.001
Grupo 4 vs. Controle	10.480	***	P < 0.001

A análise de variância apontou diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) em relação ao número de fibroblastos presentes no período de 7 dias em todos os grupos testados, com exceção do grupo 1 quando comparado ao grupo 4 e o grupo 2 ao ser comparado com o grupo 3.

Diante da não normalidade dos valores encontrados nos períodos de 21 e 42 dias, utilizou-se, inicialmente, o teste de Kruskal-Wallis, cujo valor foi de  $KW = 21.139$  para o período de 21 dias e  $KW = 13.118$ , para 42 dias. Para a avaliação da diferença estatística apontada pelo teste foi usado o Teste de Múltiplas Comparações de Dunn, cujos resultados e valores estão expressos nas tabelas 14 e 15.

**Tabela 14**– Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de fibroblastos presentes nas amostras no período de 21 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-10.800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	- 1.600	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-10.800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	6.700	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	9.200	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	0.000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	17.500	**	P < 0.01
Grupo 3 vs. Grupo 4	-9.200	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	8.300	ns	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	17.500	**	P < 0.01

**Tabela 15**– Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de fibroblastos presentes nas amostras no período de 42 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-4.800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-1.200	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-1.200	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	10.700	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	3.600	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	3.600	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	5.500	**	P < 0.01
Grupo 3 vs. Grupo 4	0.000	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	11.900	ns	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	11.900	ns	P > 0.05

Nos período de 21 e 42 dias, não foi detectada diferença estatística significativa na comparação dos grupos testados, tal diferença ( $P < 0.01$ ) foi apresentada apenas entre os grupos 2 e 4, quando comparados ao grupo controle em 21 dias e entre o grupo 2 e grupo controle em 42 dias ( $P < 0.001$ ).

A seguir novas análises estatísticas foram realizadas, para avaliar a interação entre grupos e períodos experimentais. As médias foram agrupadas e submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, diante da não normalidade dos valores amostrais desse grupo, cujo valor foi de  $KW = 12.056$ , indicando diferença estatística significativa em relação ao número de fibroblastos encontrados na interação entre os grupos e períodos de tempo.

Para identificar quais pastas medicamentosas eram diferentes entre si em relação ao número de fibroblastos encontrados na interação entre os grupos e os diferentes períodos de tempo, aplicou-se o teste de Múltiplas Comparações de Dunn, conforme tabela 16.

**Tabela 16** - Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para fibroblastos.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-8.200	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-4.667	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-4,067	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	16.600	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	3.533	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	4.133	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	24.800	*	P < 0.05
Grupo 3 vs. Grupo 4	0.6000	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	21.267	ns	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	20.667	ns	P > 0.05

O teste não paramétrico de Múltiplas Comparações de Dunn mostrou não haver diferença estatística significativa quando comparadas as diferentes pastas testadas em relação ao número de fibroblastos encontrados na interação grupos e tempos, porém, o teste constatou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo 2 quando comparado ao grupo controle negativo (lateral do tubo).

Para avaliar a diferença do número de fibroblastos em relação aos diferentes tempos experimentais (7, 21 e 42 dias) foi realizado o teste de Múltiplas Comparações de Dunn (tabela 17).

**Tabela 17** – Teste de Dunn para o número de fibroblastos nos diferentes tempos experimentais.

Comparação	Diferenças	P	Valor
7 dias vs. 21 dias	29.780	***	P < 0.001
7 dias vs. 42 dias	45.220	***	P < 0.001
21 dias vs. 42 dias	15.440	*	P < 0.05

O Teste de Múltiplas comparações de Dunn indicou haver diferença ( $p < 0,001$ ) estatística significativa em relação ao número de fibroblastos nos diferentes tempos experimentais.

## 5 - Vascularização

### Vasos sanguíneos

A Tabela 18 evidencia as médias encontradas nas amostras para a quantidade de vasos sanguíneos encontrados nas diferentes pastas e períodos estudados.

**Tabela 18** - Médias da quantidade de vasos sanguíneos encontrados nos três períodos estudados.

PERÍODO		Grupo 1	Grupo2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
7 DIAS	Média amostra 1	1,6	2,8	2,6	2,2	1
	Média amostra 2	1,8	2	1,8	2	1,2
	Média amostra 3	1,8	2,4	2,4	1,6	0,6
	Média amostra 4	1,8	2	1,6	1,8	1,2
	Média amostra 5	1,4	2,4	2	1,6	0,4
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>1,6 ± 0,17</b>	<b>2,3 ± 0,33</b>	<b>2,1 ± 0,41</b>	<b>1,9 ± 0,26</b>	<b>0,8 ± 0,36</b>
21 DIAS	Média amostra 1	1,6	1,4	1,6	1,4	0,4
	Média amostra 2	1,4	1,4	1,4	1,4	0,6
	Média amostra 3	1,2	1,6	1,4	1,6	0,4
	Média amostra 4	1,4	1,6	1,2	1,4	0,6
	Média amostra 5	1,2	1,6	1,2	1,8	0,4
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>1,3 ± 0,16</b>	<b>1,5 ± 0,10</b>	<b>1,3 ± 0,16</b>	<b>1,5 ± 0,17</b>	<b>0,4 ± 0,10</b>
42 DIAS	Média amostra 1	1,4	1,2	1,4	1,2	0,4
	Média amostra 2	1,4	1,2	1,4	1,2	0,4
	Média amostra 3	1,2	1,4	1,2	1,4	0,4
	Média amostra 4	1,2	1,4	1,2	1,2	0,6
	Média amostra 5	1,2	1,4	1,2	1,6	0,4
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>1,2 ± 0,10</b>	<b>1,3 ± 0,10</b>	<b>1,2 ± 0,10</b>	<b>1,3 ± 0,17</b>	<b>0,4 ± 0,08</b>

As médias da tabela 18 foram submetidas ao programa estatístico a fim de avaliar a diferença no número de vasos sanguíneos encontrados nas diferentes pastas testadas em cada período de tempo (7, 21 e 42 dias)

Diante da não normalidade dos valores amostrais dos períodos estudados, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, cujos valores foram KW = 17.132 (7 dias), KW = 15.048 (21 dias) e KW = 13.382 (42 dias).

Para a avaliação da diferença estatística apontada foi utilizado, novamente, o Teste de Múltiplas Comparações de Dunn, cujos resultados e valores estão expressos nas tabelas 19, 20 e 21.

**Tabela 19**– Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de vasos sanguíneos presentes nas amostras no período de 7 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-10.100	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-6.300	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-2.800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	7.700	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	3.800	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	7.300	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	17.800	**	P < 0.01
Grupo 3 vs. Grupo 4	3.500	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	14.000	*	P < 0.05
Grupo 4 vs. Controle	10.500	ns	P > 0.05

Ns = Não significante; \* = valores estatísticos semelhantes

**Tabela 20**– Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de vasos sanguíneos presentes nas amostras no período de 21 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-5.600	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	0.000	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-4.800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	9.900	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	5.600	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	0.8000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	15.500	**	P < 0.01
Grupo 3 vs. Grupo 4	-4.800	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	9.900	ns	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	14.700	*	P < 0.05

**Tabela 21**– Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de vasos sanguíneos presentes nas amostras no período de 42 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-1.900	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	0.000	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-0.9000	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	11.800	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	1.900	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	1.000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	13.700	*	P < 0.05
Grupo 3 vs. Grupo 4	-0.9000	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	11.800	ns	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	12.700	*	P < 0.05

No período de 7 dias, diferença estatística significativa ocorreu somente na comparação entre os grupos 2 e 3 comparados ao grupo controle ( $P < 0.01$ ). Nos períodos de 21 e 42 dias, diferença estatística significativa foi observada apenas na comparação dos grupos 2 e 4 com o grupo controle ( $P < 0.01$ ).

Para avaliar a interação entre grupos e períodos experimentais realizamos uma nova bateria de análises. As médias foram agrupadas e submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, diante da não normalidade dos valores amostrais desse grupo, cujo valor foi de  $KW = 36.157$ , indicando diferença estatística significativa em relação ao número de vasos sanguíneos encontrados na interação entre os grupos e períodos de tempo.

Para identificar quais pastas medicamentosas eram diferentes entre si, em relação ao número de vasos sanguíneos aplicou-se o teste de Múltiplas Comparações de Dunn, conforme tabela 22.

**Tabela 22** - Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para vasos sanguíneos.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-10.300	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-3.267	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-6.663	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	31.200	***	P < 0.001
Grupo 2 vs. Grupo 3	7.033	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	3.667	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	41.500	***	P < 0.001
Grupo 3 vs. Grupo 4	-3.667	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	34.467	***	P < 0.001
Grupo 4 vs. Controle	37.833	***	P < 0.001

O teste não paramétrico de Múltiplas Comparações de Dunn mostrou não haver diferença estatística significativa quando comparadas as diferentes pastas testadas em relação ao número de vasos sanguíneos, porém, o teste constatou diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos testados quando comparados ao Grupo controle negativo (lateral do tubo).

Para avaliar a diferença do número de vasos sanguíneos em relação aos tempos experimentais (7, 21 e 42 dias) foi realizado o teste de Múltiplas Comparações de Dunn (Tabela 23).

**Tabela 23** – Teste de Dunn para o número de vasos sanguíneos nos diferentes tempos experimentais.

Comparação	Diferenças	P	Valor
7 dias vs. 21 dias	19.290	**	P < 0.01
7 dias vs. 42 dias	28.180	***	P < 0.001
21 dias vs. 42 dias	8.960	ns	P > 0.05

O Teste de Múltiplas comparações de Dunn indicou haver diferença estatística significativa em relação ao número de vasos sanguíneos encontrados quando comparados os períodos de 7 e 21 dias ( $p < 0.01$ ) e nos períodos de 7 e 42 dias ( $p < 0.001$ ). O teste não

mostrou diferença estatística significativa nos períodos de 21 e 42 dias, em relação ao número de vasos sanguíneos presentes.

## 6 - Atividade macrofágica

### Fagócitos mononucleares (macrófagos)

A tabela 24 evidencia as médias encontradas nas amostras para a quantidade de fagócitos mononucleares (macrófagos) para as diferentes pastas e períodos estudados.

**Tabela 24** - Médias da quantidade de macrófagos encontrados nos três períodos estudados.

PERÍODO		Grupo 1	Grupo2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
7 DIAS	Média amostra 1	1	2	2	1,2	0,8
	Média amostra 2	2	2,2	2	2	0,8
	Média amostra 3	3	2,4	2,8	3	1,2
	Média amostra 4	2	2,2	2,2	2,4	1
	Média amostra 5	3	2,4	2,6	3	1
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>2,2 ± 0,83</b>	<b>2,2 ± 0,16</b>	<b>2,3 ± 0,36</b>	<b>2,3 ± 0,75</b>	<b>0,9 ± 0,16</b>
21 DIAS	Média amostra 1	1,6	1,4	1,4	1,4	0,8
	Média amostra 2	1,4	1,8	1,4	1,8	1
	Média amostra 3	1,2	1,6	1,2	1,4	1
	Média amostra 4	1,4	1,8	1,6	1,8	1,2
	Média amostra 5	1,4	1,4	1,2	1,4	1
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>1,4 ± 0,14</b>	<b>1,6 ± 0,2</b>	<b>1,3 ± 0,16</b>	<b>1,5 ± 0,21</b>	<b>1 ± 0,14</b>
42 DIAS	Média amostra 1	0,6	0,8	0,6	0,8	0,2
	Média amostra 2	1	1,2	1,2	1,2	0,6
	Média amostra 3	0,8	1,2	0,8	1	0,4
	Média amostra 4	1,2	1,2	1,2	1,2	0,4
	Média amostra 5	0,6	1,2	0,8	0,8	0,4
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>0,8 ± 0,26</b>	<b>0,1 ± 0,17</b>	<b>0,9 ± 0,26</b>	<b>1 ± 0,2</b>	<b>0,4 ± 0,14</b>

As médias da tabela 24 foram submetidas ao programa estatístico *Graphpad Instat*<sup>®</sup>, a fim de avaliar estatisticamente a diferença no número de polifornucleares encontrados nas diferentes pastas testadas em cada período de tempo (7, 21 e 42 dias)

Diante da normalidade da amostra, para as médias do período de 7 dias, foi realizada a análise de variância que indicou diferença estatística significativa entre o número de macrófagos presentes nas lâminas avaliadas, conforme tabela 25.

**Tabela 25** – Análise de variância para o número de macrófagos no período de 7 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-0.04000	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-0.1200	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-0.1200	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	1.240	*	P < 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	-0.08000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	-0.08000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	1.280	**	P < 0.01
Grupo 3 vs. Grupo 4	0.000	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	1.360	**	P < 0.001
Grupo 4 vs. Controle	1.360	**	P < 0.001

A análise de variância apontou diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) em relação ao número de macrófagos presentes no período de 7 dias na comparação entre os grupos testados quando comparados ao grupo controle.

Diante da não normalidade dos valores encontrados nos períodos de 21 e 42 dias, utilizou-se, inicialmente, o teste de Kruskal-Wallis, cujo valor foi de  $KW = 14.871$  para o período de 21 dias e  $KW = 14.147$ , para 42 dias. Para a avaliação da diferença estatística apontada pelo teste foi usado o Teste de Múltiplas Comparações de Dunn, cujos resultados e valores estão expressos nas tabelas 26 e 27.

**Tabela 26**– Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de macrófagos presentes nas amostras no período de 21 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-5.400	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-1.400	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-4.100	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	10.100	ns	P < 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	6.800	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	1.300	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	15.500	**	P < 0.01
Grupo 3 vs. Grupo 4	-5.500	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	8.700	ns	P < 0.001
Grupo 4 vs. Controle	14.200	*	P < 0.05

**Tabela 27**– Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de macrófagos presentes nas amostras no período de 42 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-6.900	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-2.100	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-3.900	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	8.900	ns	P < 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	4.800	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	3.000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	15.800	**	P < 0.01
Grupo 3 vs. Grupo 4	-1.800	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	11.000	ns	P < 0.001
Grupo 4 vs. Controle	12.800	*	P < 0.05

No período de 21 e 42 dias, diferenças estatísticas significantes foram observada apenas na comparação dos grupos 2 e 4 comparados ao grupo controle.

Realizaram-se novas análises estatísticas para avaliar a interação entre grupos e períodos experimentais. As médias foram agrupadas e submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, diante da não normalidade dos valores amostrais desse grupo, cujo valor foi de  $KW = 22.069$ , indicando diferença estatística significativa em relação ao número de polimorfonucleares encontrados na interação entre os grupos e períodos de tempo.

Para identificar quais pastas medicamentosas eram diferentes entre si, aplicou-se o teste de Múltiplas Comparações de Dunn, conforme tabela 28.

**Tabela 28** - Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para macrófagos.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-8.933	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-2.867	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	- 5.200	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	24.167	*	P < 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	6.067	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	3.733	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	33.100	***	P < 0.001
Grupo 3 vs. Grupo 4	-2.333	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	27.033	**	P < 0.01
Grupo 4 vs. Controle	29.367	**	P < 0.01

O teste não paramétrico de Múltiplas Comparações de Dunn mostrou não haver diferença estatística significativa quando comparadas as diferentes pastas testadas em relação ao número de macrófagos encontrados, porém, o teste constatou diferença estatística ( $p < 0,001$ ) entre os grupos testados quando comparados ao Grupo controle negativo.

Para avaliar a diferença do número de macrófagos em relação aos tempos experimentais (7, 21 e 42 dias) foi realizado o teste de Múltiplas Comparações de Dunn (Tabela 29).

**Tabela 29** – Teste de Dunn para o número de macrófagos nos diferentes tempos experimentais.

Comparação	Diferenças	P	Valor
7 dias vs. 21 dias	12.440	ns	P > 0.05
7 dias vs. 42 dias	35.980	***	P < 0.001
21 dias vs. 42 dias	23.540	***	P < 0.001

O Teste de Múltiplas comparações de Dunn indicou não haver diferença estatística significativa em relação ao número de macrófagos encontrados quando comparados os períodos de

7 e 21 dias ( $p > 0.05$ ), porém, ao comparar os períodos de 7 com 42 dias e 21 com 42 dias foi encontrada diferença estatística significante ( $p < 0.001$ ) entre esses períodos experimentais.

### Células gigantes inflamatórias

A Tabela 30 evidencia as médias encontradas nas amostras para a quantidade de fagócitos mononucleares (macrófagos) para as diferentes pastas e períodos estudados.

**Tabela 30** - Médias da quantidade de células gigantes inflamatórias encontrados nos três períodos estudados.

PERÍODO		Grupo 1	Grupo2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
7 DIAS	Média amostra 1	1,4	1,2	1,4	1,4	0,6
	Média amostra 2	1	1	0,8	1	0,8
	Média amostra 3	1	1,6	1,6	1	0,6
	Média amostra 4	1	1,4	1,2	1	1
	Média amostra 5	1	0,8	1	1	0,8
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>1,0 ± 0,17</b>	<b>1,2 ± 0,31</b>	<b>1,2 ± 0,31</b>	<b>1,0 ± 0,17</b>	<b>0,7 ± 0,16</b>
21 DIAS	Média amostra 1	1,2	1,4	1,2	1,4	0,8
	Média amostra 2	1,4	1,4	1,4	1,4	0,8
	Média amostra 3	1	1,2	1	1,2	1
	Média amostra 4	1,4	1,4	1,4	1,4	0,8
	Média amostra 5	1	1,2	1	1,2	1
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>1,2 ± 0,2</b>	<b>1,3 ± 0,10</b>	<b>1,2 ± 0,2</b>	<b>1,3 ± 0,10</b>	<b>0,8 ± 0,10</b>
42 DIAS	Média amostra 1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2
	Média amostra 2	0,4	0,8	0,6	0,8	0,4
	Média amostra 3	0,6	0,6	0,6	0,4	0
	Média amostra 4	0,6	0,6	0,4	0,8	0,2
	Média amostra 5	0,6	0,6	0,6	0,4	0
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>0,40 ± 0,17</b>	<b>0,6 ± 0,14</b>	<b>0,4 ± 0,17</b>	<b>0,5 ± 0,26</b>	<b>0,2 ± 0,16</b>

As médias da tabela 30 foram submetidas ao mesmo programa estatístico para avaliar a diferença no número de células gigantes inflamatórias encontradas nas diferentes pastas testadas em cada período de tempo (7, 21 e 42 dias)

Diante da não normalidade dos valores amostrais dos períodos estudados, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, cujos valores foram  $KW = 9,097$  (7 dias),  $KW = 12.321$  (21 dias) e  $KW = 9.505$  (42 dias)

Para apontar quais grupos são diferentes entre si em relação ao número de células gigantes inflamatórias presentes em cada um dos 3 períodos experimentais foi realizado o Teste de Múltiplas Comparações de Dunn, cujos resultados e valores estão expressos nas tabelas 31, 32 e 33.

**Tabela 31** – Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de células gigantes inflamatórias presentes nas amostras no período de 7 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-2.300	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 3	-2.300	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 4	0.000	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Controle	9.100	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 3	0.000	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 4	2.300	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Controle	11.400	ns	$P > 0.05$
Grupo 3 vs. Grupo 4	2.300	ns	$P > 0.05$
Grupo 3 vs. Controle	11.400	ns	$P > 0.05$
Grupo 4 vs. Controle	9.100	ns	$P > 0.05$

**Tabela 32** – Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de células gigantes inflamatórias presentes nas amostras no período de 21 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-4.000	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 3	0.000	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 4	-4.000	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Controle	9.500	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 3	4.000	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 4	0.000	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Controle	13.500	*	$P < 0.05$
Grupo 3 vs. Grupo 4	-4.000	ns	$P > 0.05$
Grupo 3 vs. Controle	9.500	ns	$P > 0.05$
Grupo 4 vs. Controle	13.500	*	$P < 0.05$

**Tabela 33** – Valores do Teste de Múltiplas Comparações de Dunn para o número de células gigantes inflamatórias presentes nas amostras no período de 42 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-3.800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	0.000	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	-0.9000	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	9.200	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	3.800	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	2.900	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	13.000	*	P < 0.05
Grupo 3 vs. Grupo 4	-0.9000	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	9.200	ns	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	10.100	ns	P < 0.05

No período de 7 dias, não foi apontada diferença estatística significativa em relação ao número de células gigantes inflamatórias presentes entre as diferentes pastas testadas. Diferença estatística significativa em relação ao número de células gigantes inflamatórias foi apresentada quando comparados os grupos 2 e 4 ao grupo controle (P < 0.05) no período de 21 dias. Já no período de 42 dias apenas a comparação entre o grupo 2 e o controle apresentou diferença estatística (P < 0.05).

Para avaliar a interação entre grupos e períodos experimentais realizou-se mais uma sequência de análises. As médias foram agrupadas e submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, diante da não normalidade dos valores amostrais desse grupo, cujo valor foi de KW = 10.315, indicando diferença estatística significativa em relação ao número de células gigantes inflamatórias encontradas na interação entre os grupos e períodos de tempo.

Para identificar quais pastas medicamentosas eram diferentes entre si, em relação ao número de células gigantes inflamatórias aplicou-se o teste de Múltiplas Comparações de Dunn, conforme tabela 34.

**Tabela 34** - Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para células gigantes inflamatórias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-6.067	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	-2.033	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	- 3.233	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Controle	16.500	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	4.033	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	2.833	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Controle	22.567	*	P < 0.05
Grupo 3 vs. Grupo 4	-1.200	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Controle	18.533	ns	P > 0.05
Grupo 4 vs. Controle	19.733	ns	P > 0.05

O teste não paramétrico de Múltiplas Comparações de Dunn mostrou não haver diferença estatística significativa quando comparadas as diferentes pastas testadas em relação ao número de células gigantes inflamatórias encontradas, porém, o teste constatou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o grupo 2 quando comparado ao grupo controle negativo.

Para avaliar a diferença do número de células gigantes inflamatórias em relação aos tempos experimentais (7, 21 e 42 dias) foi realizado o teste de Múltiplas Comparações de Dunn (Tabela 35).

**Tabela 35** – Teste de Dunn para o número de células gigantes inflamatórias nos diferentes tempos experimentais.

Comparação	Diferenças	P	Valor
7 dias vs. 21 dias	-7.580	ns	P > 0.05
7 dias vs. 42 dias	32.180	***	P < 0.001
21 dias vs. 42 dias	39.760	***	P < 0.001

O Teste de Múltiplas comparações de Dunn indicou não haver diferença estatística significativa em relação ao número de células gigantes inflamatórias quando comparados os

períodos de 7 e 21 dias ( $p > 0.05$ ), porém, ao comparar os períodos de 7 com 42 dias e 21 com 42 dias foi encontrada diferença estatística significativa ( $p < 0.001$ ) entre os grupos.

### Área da cápsula reacional

Para finalizar os testes estatísticos, as médias encontradas nas amostras para a medida da área da cápsula reacional ( $\text{mm}^2$ ), encontrada nos diferentes grupos testados, em cada período experimental estão expressas na tabela 36. Nota-se que o grupo controle não foi considerado pelo fato de não apresentar área de cápsula reacional expressiva.

**Tabela 36** - Médias da medida da área da cápsula reacional ( $\text{mm}^2$ ) gerada nos três períodos estudados.

PERÍODO		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
7 DIAS	Média amostra 1	1,416	1,498	1,493	1,411	0
	Média amostra 2	1,414	1,352	1,354	1,413	0
	Média amostra 3	1,441	1,329	1,329	1,441	0
	Média amostra 4	1,413	1,333	1,35	1,416	0
	Média amostra 5	1,441	1,323	1,327	1,442	0
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>1,4 ± 0,01</b>	<b>1,3 ± 0,07</b>	<b>1,3 ± 0,06</b>	<b>1,4 ± 0,01</b>	
21 DIAS	Média amostra 1	0,709	0,691	0,715	0,689	0
	Média amostra 2	0,718	0,736	0,718	0,736	0
	Média amostra 3	0,664	0,718	0,66	0,721	0
	Média amostra 4	0,718	0,736	0,718	0,737	0
	Média amostra 5	0,66	0,719	0,66	0,716	0
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>0,6 ± 0,02</b>	<b>0,7 ± 0,01</b>	<b>0,6 ± 0,03</b>	<b>0,7 ± 0,01</b>	
42 DIAS	Média amostra 1	0,546	0,571	0,548	0,566	0
	Média amostra 2	0,564	0,591	0,564	0,592	0
	Média amostra 3	0,593	0,55	0,596	0,548	0
	Média amostra 4	0,564	0,589	0,56	0,597	0
	Média amostra 5	0,598	0,545	0,593	0,549	0
	<b>Média e desvio padrão</b>	<b>0,5 ± 0,02</b>	<b>0,5 ± 0,02</b>	<b>0,5 ± 0,02</b>	<b>0,5 ± 0,02</b>	

As médias da tabela 36 foram submetidas ao programa estatístico a fim de avaliar a área da cápsula reacional ocasionada pelas pastas testadas em cada período de tempo (7, 21 e 42 dias)

Diante da não normalidade dos valores amostrais nos períodos de 7 e 21 dias foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, cujos valores foram  $KW = 5.184$  (7 dias) e  $KW = 5.983$  (21 dias).

Para a avaliação da diferença estatística apontada foi utilizado, novamente, o Teste de Múltiplas Comparações de Dunn, cujos resultados e valores estão expressos nas tabelas 37 e 38.

**Tabela 37-** Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para a área da cápsula reacional gerada pelos grupos testados n período de 7 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	6.300	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 3	5.900	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 4	0.2000	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 3	-0.4000	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 4	-6.100	ns	$P > 0.05$
Grupo 3 vs. Grupo 4	-5.700	ns	$P > 0.05$

**Tabela 38-** Teste de Múltiplas Comparações de Dunn. Valores originais para a área da cápsula reacional gerada pelos grupos testados n período de 21 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	-6.400	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 3	0.2000	ns	$P > 0.05$
Grupo 1 vs. Grupo 4	-6.200	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 3	6.600	ns	$P > 0.05$
Grupo 2 vs. Grupo 4	0.2000	ns	$P > 0.05$
Grupo 3 vs. Grupo 4	-6.400	ns	$P > 0.05$

Os resultados estatísticos não apontaram diferença estatística significativa em relação à área da cápsula reacional gerada pelas pastas testadas nos períodos de 7 e 21 dias.

Diante da normalidade das médias amostrais para a área da cápsula reacional ocorrida no período de 42 dias realizou-se a análise de variância a fim de se avaliar o comportamento estatístico dessas médias. O resultado da análise da variância está representado pela tabela 39.

**Tabela 39-** Valores da análise de variância para a área da cápsula reacional encontrada nas amostras no período de 42 dias.

Comparação	Diferenças	P	Valor
Grupo 1 vs. Grupo 2	0.003800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 3	0.000800	ns	P > 0.05
Grupo 1 vs. Grupo 4	0.002600	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 3	-0.003000	ns	P > 0.05
Grupo 2 vs. Grupo 4	-0.001200	ns	P > 0.05
Grupo 3 vs. Grupo 4	0.001800	ns	P > 0.05

A análise da variância indicou não haver diferença estatística em relação à área da cápsula reacional presente nos diferentes grupos estudados no período de 42 dias.

As médias foram agrupadas e submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, para avaliar a interação entre grupos e períodos experimentais pelo fato dos valores experimentais apresentarem-se com não normais. O valor do teste foi KW = 0.4057, sugerindo não haver diferença estatística significativa na interação entre os diferentes grupos e períodos experimentais.

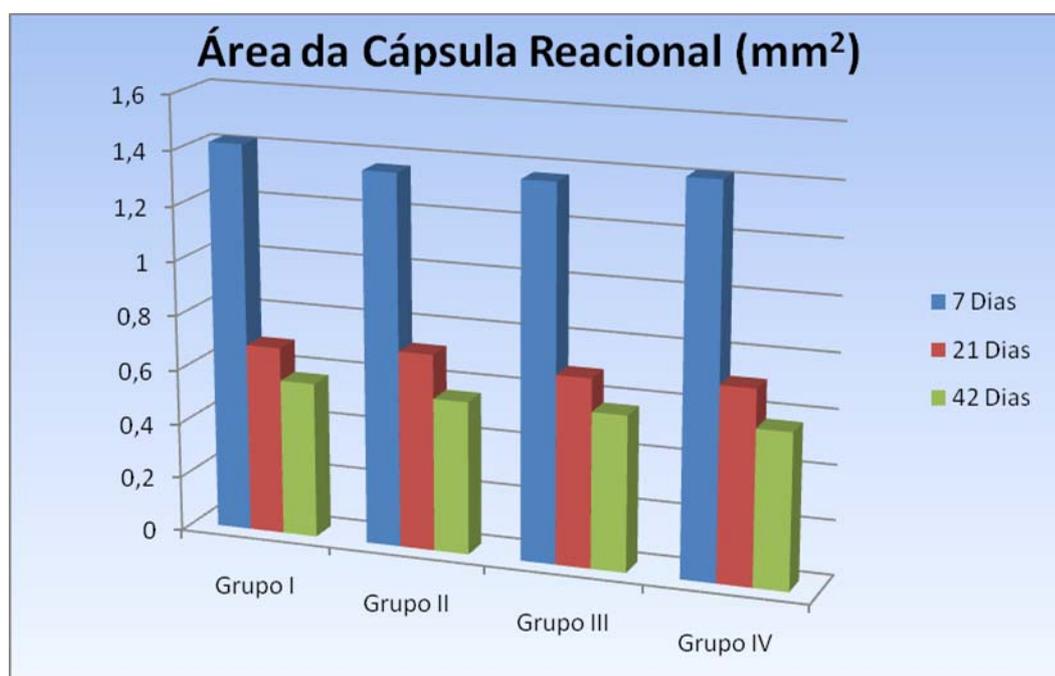
Para avaliar a diferença da área da cápsula reacional em relação aos tempos experimentais (7, 21 e 42 dias) foi realizado o teste de Múltiplas Comparações de Dunn (Tabela 40).

**Tabela 40** – Teste de Dunn para a área da cápsula reacional nos diferentes tempos experimentais.

Comparação	Diferenças	P	Valor
7 dias vs. 21 dias	20.000	***	P < 0.001
7 dias vs. 42 dias	40.000	***	P < 0.001
21 dias vs. 42 dias	20.000	***	P < 0.001

O Teste de Múltiplas comparações de Dunn mostrou haver diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ) em relação à área da cápsula reacional nos diferentes períodos de tempo avaliados.

O gráfico 4 ilustra a involução da cápsula reacional nos diferentes períodos experimentais



**Gráfico 4** – Involução da área da cápsula reacional nos diferentes períodos experimentais.



## *Discussão*

## DISCUSSÃO

São de fundamental importância na Endodontia a completa limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, eliminando os microrganismos, com o intuito de promover o reparo da região periapical.

Após a necrose da polpa dental, ocorre a proliferação de microrganismos, em sua maioria anaeróbia e facultativa, uma vez que o sistema de defesa do hospedeiro é prejudicado pela ausência de vascularização. Tais microrganismos presentes no canal necrosado difundem-se para o interior dos canalículos dentinários e demais ramificações do sistema de canais radiculares (SPONCHIADO JR, 2006; GARCEZ et al., 2007; FIGDOR; SANDQVIST, 2007; MARQUES et al., 2008).

A complexa anatomia do canal radicular torna esse meio propício ao crescimento e multiplicação de microrganismos causadores de infecções da polpa e da região do periápice dental. Diante desse quadro, a utilização de substâncias químicas auxiliares ao preparo biomecânico é um importante recurso auxiliar na desinfecção (MARCHESAN et al., 2003; HAAPASALO; ENDAL, 2006; TULUS; BONGERT, 2006; MARQUES et al., 2008; SBERNA et al., 2009).

Dentre as substâncias químicas utilizadas para esta finalidade encontra-se o hidróxido de cálcio, que ao ser associado a diferentes veículos e inserido no interior do sistema de canais radiculares, apresenta efetividade contra amplo espectro de bactérias, além de atuar em regiões onde não ocorre o contato dos instrumentos e das soluções irrigadoras, o que torna esse material a medicação de eleição contra infecções de origem endodôntica (HERMANN, 1920; HOLLAND et al., 1992; LEONARDO, 1994; ECONOMIDES et al., 2005; EVANS et al., 2003; ESTRELA et al., 2003; BRISO, 2006; LEONARDO et al., 2006).

Além do hidróxido de cálcio, encontramos outras substâncias químicas que são utilizadas como medicação na Endodontia, dentre eles estão o paramonoclorofenolcanforado, tricresol formalina, eugenol, iodofórmio, associações de antibióticos com corticóides além de diversas associações de antibióticos, cuja finalidade é de promover a desinfecção ou evitar a reinfecção do sistema de canais radiculares nos intervalos entre as sessões operatórias, além de eliminar microrganismos resistentes, presentes na infecção endodôntica (ESTRELA; PECORA, 2003; LYNNE et al., 2003).

O *E. faecalis* é um patógeno presente nas infecções endodônticas que sobrevive em meio com pH de até 11,5 sendo que os demais microrganismos resistem a um pH de aproximadamente 9,0 (EVANS et al., 2003). O hidróxido de cálcio é uma substância que tem a capacidade de alcalinizar o pH do meio em que foi aplicado em aproximadamente 12,8, causando efeito nocivo em praticamente todas as espécies bacterianas já isoladas de canais radiculares infectados. Outros estudos já foram realizados a fim de evidenciar a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio quando testado com o *E. faecalis*, onde é sugerido o uso de digluconato de clorexidina na pasta contendo hidróxido de cálcio para aumentar o espectro bacteriano e eliminar este microorganismo (FOREMAN et al., 1990; LYNNE et al., 2003; WALTON et al., 2003; BASRANI et al., 2004; SPONCHIADO JR, 2006).

A efetividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio quando utilizado no interior do sistema de canais radiculares está relacionada com a sua ação alcalinizante, decorrente da liberação de íons hidroxila. A medicação contendo hidróxido de cálcio deve se difundir pelo sistema de canais radiculares, penetrar nos canalículos dentinários, ramificações anatômicas e forame apical, visando atingir colônias bacterianas presentes nestes locais e tecidos vizinhos, eliminando ou diminuindo a população bacteriana presente nesses locais (FOREMAN; BARNES, 1990; SIQUEIRA JR, 1997; LOPES, 2004; WEISMAN, 2006).

Diversas pesquisas envolvendo fitoterápicos mostraram que alguns extratos de plantas possuem ação antibacteriana efetiva contra diversos microrganismos encontrados nas infecções endodônticas (PERIN et al., 2001; GARRIDO et al., 2004; PEREIRA, 2004; ABNADER, 2005; GENTIL et al., 2006; SPONCHIADO Jr, 2006), que podem ser introduzidas na Endodontia como medicação intracanal.

A seleção da fração acetato de etila do extrato de *Pothomorphe umbellata* baseou-se nos trabalhos de Sponchiado Jr (2006) que constatou efetividade contra cepas de *Enterococcus faecalis*, bactéria resistente ao hidróxido de cálcio e outros antibióticos, freqüentemente encontrada nos casos de insucesso da terapia endodôntica convencional e da persistência da lesão periapical, fato o qual indicou a necessidade da avaliação da compatibilidade biológica dessa fração (ESTRELA et al., 2003; EVANS et al., 2003; STUART et al., 2006; ZOLETTI et al., 2006; GOMES et al., 2006; SPONCHIADO JR, 2006; SIQUEIRA JR et al., 2008).

Para a realização deste estudo realizou-se a metodologia utilizando implantes em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, que possui qualidades desejáveis para a avaliação da compatibilidade biológica de diferentes materiais, possibilitando a avaliação dos eventos histopatológicos (PROVÊNCIO, 1982; BIRMAN, 1990; HOLLAND et al., 2001; NASSRI et al., 2003; GARRIDO, 2006; GARCIA, 2008).

No experimento, utilizou-se a implantação de tubos de polietileno para avaliar as pastas testadas devido ao fato de não favorecerem a irritação tecidual e possibilitarem a delimitação da área de estudada. A porção lateral do tubo de polietileno também pode ser utilizada como grupo controle (NASSRI et al., 2003; GARCIA et al., 2008).

Uma das desvantagens da utilização de tubos de polietileno é o escape do material para o tecido adjacente, produzindo diferentes graus de resposta para o mesmo período

experimental, tal fato pode ser evitado, realizando-se o selamento de uma das extremidades dos tubos (JACOBOVITZ, 1996, GARCIA et al., 2008).

O teste secundário em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos oferece uma série de vantagens como o uso de uma limitada área para manutenção dos animais e facilidade de limpeza e higienização da área reservada a manutenção dos animais no pós-operatório, simplicidade de execução metodológica, possibilitando o trabalho em vários animais em curto período de tempo, não há necessidade de descalcificação dos espécimes no preparo histopatológico, possibilidade de comparar a resposta tecidual num mesmo animal, para diversos materiais experimentais implantados, inclusive a lateral do tubo, utilizada como grupo controle e baixo custo para o desenvolvimento da metodologia.

Como desvantagem para a metodologia pode-se citar a necessidade de detalhada execução da metodologia, uma vez que um simples erro da técnica pode ocasionar a perda dos espécimes, reconhecimento de possíveis erros somente durante a avaliação dos cortes histopatológicos, como por exemplo a inclusão de corpos estranhos como pêlos do animal juntamente com o implante.

Baseado no que foi exposto em relação às vantagens e limitações dos testes de biocompatibilidade por meio da implantação de matérias para uso dentário em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, pode-se aferir que tal metodologia de pesquisa é plenamente recomendada.

O propilenoglicol foi utilizado no experimento, por ser um veículo rotineiramente associado ao hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Tal substância é classificada como viscosa e hidrossolúvel, possui um alto peso molecular dificultando a rápida dispersão das medicações a ele associadas mantendo-as por um maior período de tempo na área desejada (ESTRELA et al., 2003; GARRIDO, 2004; LEONARDO, 2005; SPONCHIADO Jr, 2006; RIBEIRO, 2008).

Os períodos de análises definidos (7, 21 e 42 dias) permitiram uma eficaz avaliação das etapas do processo reacional pela sequência inflamatória, evolução da cápsula reacional e as possibilidades de interposição na resposta orgânica (NASSRI et al., 2003; GARRIDO, 2004; GARCIA et al., 2008). Estrategicamente foram utilizados esses períodos experimentais para permitir o acompanhamento da evolução reacional no tecido subcutâneo do rato, dentro de fases de uma sequência da reação de reparação.

Extratos de *Pothomorphe umbellata* também já foram utilizados no tratamento de diversas enfermidades devido a suas propriedades coleréticas, colagogas, gástricas, antiepiléticas, antimaláricas e no tratamento de diabetes e doenças hepáticas e atividade antibacteriana (COIMBRA, 1958; AMORIM et al., 1986; FELZENSZWALB et al., 1987; MONGELLI, 1995; MONGELLI, 2002; SPONCHIADO Jr, 2006; ANDRADE-NETO et al., 2007).

Extratos de outros fitoterápicos também já foram testados em tecidos de animais para avaliar a sua compatibilidade biológica e seu possível uso em Odontologia. O óleo de copaíba foi utilizado em dentes molares de ratos como proteção pulpar direta (BANDEIRA et al. 1999) e em polpas dentais de cães (BANDEIRA et al., 2000). Atualmente, esse óleo foi utilizado para a confecção de um cimento endodôntico com propriedades biológicas satisfatórias (GARRIDO, 2004; GARRIDO et al., 2006).

Dentre os princípios ativos já conhecidos do extrato bruto da planta *Pothomorphe umbellata*, o 4-nerolidilcatecol tem demonstrado inúmeras atividades importantes, como inibidor de metaloproteínas presentes no câncer de pele e penetração cutânea satisfatória (ROPKE et al., 2002; ROPKE et al., 2006), ausência de propriedades tóxicas e mutagênicas quando administrado na cavidade oral de ratos (BARROS et al., 2005), protetor tecidual contra raios ultravioleta (ROPKE et al., 2005), efetividade contra larvas do mosquito *Aedes*

*aegypti* (MONGELLI et al., 2002), o qual pode ser sugerido como um princípio ativo importante e que deve ser amplamente estudado.

As pastas testadas foram preparadas até que fosse obtida uma consistência cremosa, similar a do creme dental, com características físico-químicas de uma medicação adequada para o preenchimento completo dos tubos de polietileno, com uma boa capacidade de escoamento, e inseridas no interior dos tubos com auxílio de uma broca lântulo, largamente empregada para inserção da medicação no interior do sistema de canais radiculares (DE DEUS, 1994; LOPES, 2004; LEONARDO, 2005).

A análise histológica evidenciou que todas as pastas testadas mostraram-se irritantes ao tecido conjuntivo subcutâneo do rato em maior ou menor intensidade, por isso, o extravasamento da medicação intracanal não é um procedimento biologicamente aceitável dentro da terapia endodôntica, devendo restringir-se somente ao interior do sistema de canais radiculares. Na realidade, não existe medicação "biocompatível", mas sim menos irritante, causando um quadro reacional menos intenso e favorecendo a eliminação de microrganismos resistentes (HIZATUGO et al., 2007).

Dentre os materiais testados, a menor média encontrada para o infiltrado inflamatório foi observada no grupo 1 (hidróxido de cálcio + propilenoglicol) e no grupo 4 (hidróxido de cálcio + propilenoglicol + fração acetato de etila de *P. umbellata* + óxido de zinco) em todos os períodos testados (7, 21 e 42 dias). Tal achado corrobora com os estudos de Holland et al (1992); Lee (2004), Leonardo et al. (2006), Garcia et al. (2008) que justifica uma melhor biocompatibilidade á pastas endodônticas contendo hidróxido de cálcio em sua formulação.

A análise estatística apontou diferença estatística significativa em relação ao infiltrado inflamatório, ocasionado pelas pastas testadas no período de 7 dias, entre o grupo 2 (fração acetato de etila de *P. umbellata* + propilenoglicol) e 3 (hidróxido de cálcio + propilenoglicol +

fração acetato de etila de *P. umbellata*) quando comparados ao grupo 4, diferença em todos os grupos testados quando comparados ao grupo controle (lateral do tubo).

Nos períodos evolutivos de 21 e 42 dias não foi apontada diferença estatística significativa em relação ao infiltrado inflamatório ocasionado pelas diferentes pastas testadas, exceto na comparação destas com o grupo controle.

Quanto à análise histológica da vascularização, as únicas diferenças apontadas foram em relação ao grupo 2 e 3 ao serem comparados ao controle no período de 7 dias. No período de 21 dias tal diferença deu-se na comparação entre o grupo 2 e 4 em relação ao grupo controle e em 42 dias, apenas o grupo 4 diferiu estatisticamente do grupo controle. Este fato comprova que com o decorrer dos períodos evolutivos, houve uma redução da vascularização e melhora do processo inflamatório, mostrando uma tendência à reparação tecidual.

Considerando a quantidade de fibroblastos, aos 7 dias as pastas testadas apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, com exceção do grupo 1 comparado ao grupo 4 e o grupo 2 com o grupo 3. Aos 21 dias tal diferença não foi mais detectada, aparecendo somente ao compararem-se os grupos 2 e 4 com o grupo controle. Ao final do experimento, no período de 42 dias, apenas o grupo 2 continuava diferindo-se do grupo controle. A manutenção de maior quantidade de fibroblastos, assim como os vasos sanguíneos, caracteriza persistência do processo reacional e conseqüente retardo à reparação tecidual.

Quanto à área da cápsula reacional, a comparação estatística entre os grupos apresentou-se semelhante em todos os períodos testados, considerada moderada nos períodos de 7 e 21 dias e discreta no intervalo de 42 dias. Desta forma, a medida da área da cápsula reacional definiu uma aceitável evolução reparativa para todas as medicações testadas.

Pelas características de formação de nódulos reacionais à distância, as pastas testadas mostraram, em maior ou menor grau, a ocorrência de deslocamento do material dos tubos para áreas justapostas, atingindo regiões adjacentes, determinando nódulos reacionais de

corpo estranho, que mantinham características semelhantes às aquelas presentes na cápsula. O uso de pastas menos fluidas e menos solubilizáveis são mais resistentes a esse tipo de deslocamento, todavia, ocorre constante carregamento de material contido no tubo de polietileno por fagócitos mononucleares assim como constatado nos trabalhos de Economides (1995) e Garcia (2008).

A intensidade da atividade macrofágica demonstrou frequente solubilização dos materiais testados, favorecendo sua difusão. Em relação à atividade macrofágica, diferença estatística significativa foi observada no período de 7 dias somente ao compararmos os grupos com o controle. Decorridos 21 dias tal diferença ocorreu somente na comparação dos grupos 2 e 4 com o controle, permanecendo o mesmo resultado para o tempo de 42 dias. Tal atividade mostrou-se moderada nos períodos iniciais (7 e 21 dias), tornando-se discreta aos 42 dias de avaliação. A persistência da atividade macrofágica aponta para a eminente reação de corpo estranho, indesejada em qualquer situação, com provável persistência na dependência do material ser, ou não digerível. Estes aspectos foram salientados por pesquisadores em trabalhos de vários níveis (MAURÍCIO et al., 1986; BIRMAN et al., 1990; FOREMAN; BARNES, 1990; ECONOMIDES et al., 1995, FAVA; SAUNDERS, 1999; EVANS, 2003).

A atividade exercida por células gigantes inflamatórias foi de moderada a discreta no decorrer dos tempos de avaliação, a presença dessas células se dá pelo tamanho das partículas da pasta a serem digeridas. Não ocorreu diferença estatística significativa em relação ao número de células gigantes inflamatórias no período de 7 dias. Em 21 dias diferença foi apontada na comparação dos grupos 2 e 4 com o controle e aos 42 dias de experimento tal diferença era apontada apenas na comparação do grupo 2 com o controle.

O maior grau de irritação tecidual envolvendo o grupo 2 pode ser explicado pela maior concentração da fração acetato de etila de *P. umbellata* contida nesse grupo, uma vez que para conseguir-se a consistência desejada para a pasta, foi necessário um maior volume de extrato

para se adicionado ao propilenoglicol. Ao diminuir a concentração da fração estudada e acrescentar o hidróxido de cálcio favoreceu a resposta tecidual.

Outro fator importante a ser observado em relação ao grau de inflamação provocado pelas diferentes pastas testadas foi o pH, que se mostrou muito reduzido no grupo 2.

Em todos os grupos testados, foi observada a formação de uma cápsula fibrosa envolvendo as paredes laterais do tubo, tal fato é favorável ao resultado de experimento uma vez que limita a movimentação do tubo no interior do tecido conjuntivo (MAURÍCIO et al. 1987).

Dentre todas as pastas testadas, registros de mineralização foram observados em maior ou menor intensidade. Nos elementos do grupo 2 foram observadas áreas de mineralização que podem estar relacionadas às pequenas áreas de necroses superficiais observadas junto á abertura tubular (ROBBINS; COTRAN, 1996). Indício de mineralização também foi detectado na pasta do grupo 1 e em todas que continham o hidróxido de cálcio em sua composição, sugerindo o sinergismo da fração acetato de etila da *P.umbellata* com o hidróxido de cálcio, porém, este assunto deve ser abordado com mais propriedade em outros trabalhos.

O óxido de zinco foi utilizado no experimento por possuir um importante papel na radiopacidade da pasta, ou seja, adicionando-se este material às pastas específicas, consegue-se obter uma imagem radiopaca, favorecendo a sua observação por meio de radiografia, quando inserido no interior do sistema de canais radiculares (CHONG et al., 1994; TORANBINEJAD et al., 1995; JOU;PERTL, 1997). Os resultados mostraram que com a adição do óxido com o intuito de dar radiopacidade à pasta, não ocorreu alteração inflamatória significativa. O óxido de zinco também é apontado como um material de aceitável digestão celular (BERBERT et al., 2002), além de possuir potencial antimicrobiano e apresentar efeito citoprotetor sobre as células teciduais (SUNZEL et al.,1997).

É importante ressaltar que os resultados obtidos neste trabalho não devem ser extrapolados para uso clínico em humanos, já que se trata de um teste de nível 2 de pesquisa, denominado de teste secundário, realizado em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, servindo como auxiliar para conclusões, inclusive comparativas, sobre o potencial irritativo dos materiais. Torna-se lícito afirmar que antes de utilizarmos a medicação intracanal à base da fração acetato de etila de *Pothomorphe umbellata* na prática endodôntica, precisamos desenvolver trabalhos seqüentes, sobretudo em outros níveis de pesquisa (“teste de aplicação”), para comparações dos acontecimentos reacionais encontrados.

O presente trabalho possibilita um raciocínio lógico sobre o comportamento, inclusive comparativo de materiais, em uma condição primária de avaliação sobre compatibilidade biológica.



*Conclusões*

## CONCLUSÕES

Baseado na metodologia empregada e resultados obtidos pode-se concluir que:

- As pastas medicamentosas avaliadas apresentaram-se irritantes ao tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, porém, não mantiveram reação de corpo estranho, atingindo, portanto, a evolução adequada observada junto ao espaço antes ocupado pelo tubo de polietileno, permitindo no decorrer dos períodos experimentais, colagenização progressiva da cápsula reacional junto à abertura tubular;
- A análise estatística mostrou diferença significativa em relação aos eventos histopatológicos nos diferentes períodos experimentais, indicando involução do processo inflamatório;
- Considerando-se a somatória dos eventos histopatológicos, através da análise comparativa tanto morfológica quanto morfométrica a associação da fração acetato de etila de *P. umbellata* às pastas contendo hidróxido de cálcio, mostrou aceitável potencial irritativo no decorrer dos períodos estudados, favorecendo a reparação tecidual.



## *Referências*

## REFERÊNCIAS

- ABNADER, CD **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio associada a diferentes veículos frente à *Candida albicans* e ao *Enterococcus faecalis***. Manaus, 2005, 141p. Dissertação (Mestrado) – Patologia Tropical, Universidade Federal do Amazonas.
- AMES, B. N.; Mc CANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with salmonella-mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347-364, 1975.
- AMORIM, C. Z.; FLORES, C. A.; GOMES, B. E.; MARQUES, A. D.; CORDEIRO, S. B. Screening for antimalarial activity in genus *Pothomorphe*. **J. ethnopharmacology**. v. 24, p. 101-106, 1988.
- AMORIM, C. Z.; GOMES, B. E.; FLORES, C. A.; CORDEIRO, R. S. B. Antimalarial activity screening from plants of the genus *Photomorphe*, **Braz. J. Med. Biol. Res.** V. 19, n. 4, p. 569, 1986.
- ANDRADE NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA, H. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 03, p. 359 – 65, 2007.
- BANDEIRA, M. F. C. L. **Análise comparativa sobre a compatibilidade biológica do óleo essencial e do óleo in natura da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao hidróxido de cálcio em capeamento pulpar em dentes de cães**. 2000. 205f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; PIZZOLITO, A. C., BENATTI-NETO, C.; JORGE-NETO, J. Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). **JBC**, v. 3, n. 16, p. 39-41, 1999a.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; OLIVEIRA, M.R.B.; BENATTI NETO, C.; LIA, R.C.C. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de rato do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao hidróxido de cálcio- parte II. **Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia**, v.3, n.16, p. 43-48, 1999b.
- BARROS, L. F. M.; BARROS, P. S. M.; ROPKE, C. D.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C. H., BARROS, S. B. M.; BELFORT JR, R. Dose-dependent *in vitro* inhibition of rabbit corneal matrix metalloproteinases by na extract of *Photomorphe umbellata* after alkali injury. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, n. 08, p.1129 – 32, 2007.

BARROS, S. B. M.; TEIXEIRA, D. S.; AZNAR, A. E.; MOREIRA, J. A. J.; ISHII, I.; FREITAS, P. C. D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. (Pariparoba). **Ciência e Cultura**, v. 48, n. 1-2, p. 114-116, 1996.

BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H., SILVA, V. V., PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. M. Assesment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata*. **Braz. J. Pharm. Sciences**, v. 41, n. 1, p. 53 – 61, 2005.

BASRANI, B.; GHANEM, A.; TJÄDERHANE, L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide – containing medications. **J. Endod.** v. 30, n. 6, 2004.

BERBERT, F. L.; LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A.; TANOMARU FILHO, M.; BRAMANTE, C. L. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 93, n.2, p. 184-9, 2002.

BERGAMO, D.C.B. **Avaliação química dos compostos não voláteis e voláteis e estudo biossintético do 4-nerolidilcotecol em *Pothomorphe umbellata***. Araraquara, 2003, 146p. Tese (Doutorado) – Instituto de química, Universidade Estadual Paulista.

BIRMAN, E. G.; SAMPAIO, J. M. P.; MAGALHÃES, SATO, E. Estudo de propriedades físicas e biológicas de um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio. **Rev. Odont. USP**, v. 4, n. 1, p. 25 – 30, 1990.

BRISO, A. L.; RAHAL, V.; MESTRENER, S. R.; DEZAN JR., E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. **Braz. Oral Res.**, v. 20, n.3, p.219-25, 2006.

CHARLES, P.; NATHALIE, S.; CARINE D.; ALEXANDRU, G. Calcium hydroxide and treatment of inflammatory inter-radicular bone resorption of non-vital deciduous molars. **Rev. Belge. Med. Dent.**, v. 59, n. 3, p. 163-9, 2004.

CHONG, B. S. Antibacterial ativity of potential retrograde filling material; **Endod. Dent. Traum.**; v. 10, n. 02, p. 66-70, 1994.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Silva Araújo, 1958. p. 292-293.

COSTA, O. A. O método bioquímico de Bourquelot e sua aplicação à pesquisa de heterosídeos em plantas brasileiras. **Revista de Química e Farmácia do Rio de Janeiro**, v. 7, n. 1, p. 103-114, 1937.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. T. Robbins: **Patologia estrutural e funcional**. 5ª Ed, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1996.

DE DEUS, Q. D. **Endodontia**, 5ª Ed., Medsi, Rio de Janeiro, 1994.

DE FEO, V. Uso de di piante ad azione antiinfiammatoria nell'Alto Ucayali, Perú Orientale. **Fitoterapia**, v. 62, p. 481-494, 1991.

DESMARCHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORRE, L. R.; KATO, M.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. Scavenges peroxy radicals and Inhibits Fe(II)-Dependent DNA Damage. **Planta Médica**, v. 63, p. 561-563, 1997.

DESMARCHELIER, C.; GURM, A.; CICCIA, G.; GIULIETTI, A. Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 45-51, 1996.

DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Investigación de la actividad antioxidante de plantas medicinales utilizadas como antiinflamatorias em Sudamérica. **Annaes da Real Academia de Farmacia**, v. 62, p. 357-373, 1996.

DESMARCHELIER, C.; SLOWING, K.; CICCIA, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract. **Fitoterapia**, v. 71, p. 556-558, 2000.

DI STASI, L.; HIRUMA, C.; GUIMARÃES, E.; SANTOS, C. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, p. 529-540, 1994.

ECONOMIDES, N.; KOTSAKI-KOTSAKI, V. P.; POULOPOULOS, A., KOLOKURIS, I.; ROZOS, G.; SHORE, R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content several tissues. **J. Endod.** v. 21, n. 3, p. 122 - 7, 1995.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; PÉCORA, J.D. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. **J. Appl. Oral Sci.**, v.11, n.2, p.133-137, 2003.

EVANS, M. D.; BAUMGARTNER, J. C.; KHEMALEELAKUL, S.; XIA, T. Efficacy of calcium hydroxide: Chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. **J. Endod.**, v. 29, n. 5, p. 238 - 9, 2003.

EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 35, p. 221-228, 2002.

FASCINELI, M. L.; GONZALEZ, F. G.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Estudo das atividades analgésica e antiulcerogênica de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq.. In: **Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, 4., 1999, Ribeirão Preto.

FELZENSZWALB, J. O.; VALSA, J. O.; ARAÚJO, A. C.; ALCÂNTARA-GOMES, R. Absence of mutagenicity of *Potomorphe umbeilata* and *Potomorphe peltata* in the Sa/monella/marrimalian-microsome mutagenicity assay. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 403-405, 1987.

FERNANDES, A. M.; SILVA, G. A.; LOPES, N.; NAPIMOGA, M. H.; BENATTI, B. B.; ALVES, J. B. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 105, n. 3, p.385-90, 2008.

FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; ADAMI, Y. L.; ESPINOLA-MENDES, E. C.; FIGUEIREDO, M. R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of Swiss Mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. **Experimental Parasitology**, v. 94, p. 243 -247, 2000.

FIGDOR, D.; SUNDQVIST, G. A. Big role for the very small-understanding the endodontic microbial flora. **Aust. Dent. J.**, v. 52, n.1, p. 38-51, 2007.

FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; SIMÕES, C.; ALBARELO, N. Estratégias utilizadas em suspensões celulares de *Roilinia mucosa* e *Pothomorphe umbellata* visando o aumento da produção de metabólitos secundários. In: **Jornada Paulista de plantas mediciniais**, 4., 1999, Ribeirão Preto. p. 47.

FOREMAN, P. C.; BARNES, I. E. A review of calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 23, n. 6, p. 283 - 97, 1990.

FOREMAN, P. C.; BARNES, I. E. A review of calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v. 23, n. 6, p. 283 - 97, 1990.

FREISE, F. W. Plantas medicinais brasileiras. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo. **Biologia Agrícola**, v. 34, p. 428-430, 1933.

GARCIA, L. F. R.; LIA, R. C.; LOPES, R. A.; OLIVEIRA, D. A.; PIRES DE SOUSA, F. C. P.; SANTOS, H. S. L. Análise morfológica e morfométrica do tecido subcutâneo de ratos submetidos à ação de pasta de hidróxido de cálcio e óleo de *Ricinus communis*. **Ciênc. Odontol. Bras.**, v. 3, n. 11, p. 47- 54, 2008.

GARRIDO, A. D. B.; BOMBANA, A. C.; MYIAGI, S.P.H.; LIA, R.C.C.; SOUSA NETO, M. D.; MARQUES, M. M. Cimento endodôntico à base de óleo-resina de copaíba. Análise comparativa de citotoxicidade. **Braz. Oral Res.**, v. 20, p. 278, 2006.

GARRIDO, A. D. B.; SOUSA NETO, M. D.; FRANÇA, S. C.; LIA, R.C.C.; SILVA, J.F.; BOMBANA, A. C.; ASTOLFI FILHO, S. Estudo de um novo cimento endodôntico à base de óleo-resina de copaíba. **Braz. Oral Res.**, v. 20, p. 276, 2006.

GARRIDO, A. D. B.; SOUSA NETO, M. D.; FRANÇA, S. C.; LIA, R.C.C.; SILVA, J.F.; BOMBANA, A. C.; ASTOLFI FILHO, S. Estudo de um novo cimento endodôntico à base de óleo-resina de copaíba. **Braz. Oral Res.**, v. 20, p. 276, 2006.

GARRIDO, A.D.B. **Estudo comparativo da biocompatibilidade e propriedades físicoquímicas de um novo cimento endodôntico**. Manaus, 2004a, 381p. Tese (Doutorado) Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas.

GARRIDO, A.D.B.; LIA, R.C.C.; TORRES, S.C.Z.; FONSECA, T.S.; PEREIRA, J.V.; SPONCHIADO-JR, E.C.; FRANÇA, S.C. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Amostras do Óleo-Resina da Copaíba em Microrganismos da Microbiota Endodôntica. **Brazilian Oral Research**, v.18, p. 210, 2004b.

GENTIL, M.; PEREIRA, J. V., SOUSA, Y.T., PIETRO, R.; SOUSA NETO, M. D.; VANSAN, L. P.,FRANÇA, C. R. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. **Phytother. Res.**, v. 20, n.3, p.184-6, 2006.

GOMES B.P; PINHEIRO E.T; SOUZA E.L; JACINTO R.C; ZAIA A.A; FERRAZ C.C; SOUZA FILHO F.J. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.102, n.2, p. 247-53, 2006.

GORDON, T.M.; RANLY, D.M.; BOYAN, B.D. The effects of calcium hydroxide on bovine pulp tissue: variations in pH and calcium concentration. **J. Endod.**, v.11, n.4, p.156-160, 1985.

GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA II, J. H.; McMAHON, J. B.; PANNELL, L. K.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. The peltatols, novel T-ITV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. **J. Organic Chem.**, v.57, p.2809-2811, 1992.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**. Basel, Birkhauser. Verlag, p. 3111- 324. 1969.

HERMANN, W. Calcium hydroxid als mittel zum Behalten und Fullen von wurzelkanalom. **Wurzbeng Diss.** 1920.

HIZATUGO, R.; KADO, E.; MENEGHINE, G. P.; MIYASAKI, E.; OKINO NETO, K.; OTANI, A.; NISHIOKA, M.; KOMATSU, S.; KIMURA, S. **Endodontia em sessão única**, 1ª Ed., editora Santos, 170 p, 2007.

HOLLAND, R.; OTOBONI FILHO, J. A.; SOUZA, V.; NERY, M. J.; BERNABÉ, P. F. E.; DEZAN JÚNIOR, E. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. **J. Endod.**, v. 8, n. 4, p. 281-4, 2001c.

HOLLAND, R.; SOUZA, V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. **J. Endod.**, v.11, n.2, p.535-543, 1985.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; HOLLAND JR, C.; NERY, M. J. Estudo histológico do comportamento do tecido subcutâneo do rato ao implante de alguns materiais obturadores de canal radicular. Influência da proporção pó-líquido. **Rev. Assoc. oral. Cirurg. Dent.** v. 25, n. 3, p. 101 – 11, 1971.

JACOBOVITZ, M. **Avaliação da reação do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio**. Araraquara, 1996. Dissertação de mestrado –Universidade Estadual Paulista – UNESP.

JOU, Y. T.; PERTL, C. Is there a best retrograde filling material? **Dent. Clin. North. Am.**, v. 41. n. 03, p.555-61, 1997.

KIJOA, A.; GFFISBRECHT, A. M.; AKISSUE, M. K.; GOTTLIEB, A. R.; GOTTLIEB, H. E. 4-Nerolydilcatechol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Médica**, v. 39, p. 85-87, 1980.

KOLOKOURIS, I.; ECONOMIDES, N.; BELTES, P.; VLEMAS, I. In vivo coparision of the compatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. **J. Endod.**, v. 24, n. 2, p. 82 – 5, 1998.

LEE, M. T.; Conservative endodontic management of teeth associated with extensive periapical pathology: report of two cases. **Aust. Endod. J.**, v. 30, n. 3, p. 103 - 9, 2004.

LEONARDO, M. R. **Endodontia: Tratamento de canais radiculares**. São Paulo, Artmed: 2005.

LEONARDO, M. R.; HERNANDEZ, M. E.; SILVA, L. A.; TANOMARU-FILHO, M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol Oral Radiol. Endod.**, V.102, n. 05, p.680-5, 2006.

LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B.; TANOMARU-FILHO, M.; BONIFÁCIO, K.C.; ITO, I. Y. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in Endodontics. **J. Endod.**, v. 26, n. 7, p. 391 - 4, 2000.

LEONARDO, M.R.; ALMEIDA, W.A.; ITO, I.Y.; SILVA, L.A.B. Radiography and microbiologic evaluation of post treatment apical and peripical repair of root canals of dogs' teeth with experimentally induced chronic lesion. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v.78, n.2, p.232-238. 1994.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. **Endodontia – Biologia e técnica**. 2ª Ed. Ed. Guanabara Koogan, 964 p., Rio de Janeiro, 2004.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F.J.; Plantas **Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**. Nova Odessa, Ed. Instituto Plantarum de Estudo da Flora LTDA, 2002.

LUZ, A. L. R. et ai. Volatile constituents of Brazilian Piperaceae. 5. The oils of *Pothomorphe umbellata* and *P. peltata*. **J. Essential Oil Res.**, v. 11, n. 4,p. 479-48 1, 1999.

LYNNE, R.E.; LIEWEHR, F.R.; WEST, L.A.; PATTON, W.R.; BUXTON, T.B.; McPHERSON, J.C. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on *Enterococcus faecalis* in root canal dentin. **J. Endod.**, v.29, n.3, p.187-190, 2003.

MARQUES, A. A. F. ; MARCHESAN, M. A. ; SOUZA FILHO, Celso Bernardo de ; SOUSA, Y. T. C. S. ; SOUSA NETO, Manoel D ; CRUZ FILHO, Antôni Miranda da . Smear layer removal and chelated calcium ion quantification of three irrigants solutions. **Braz. Dent. J.**, v. 17, p. 306-309, 2006.

MARQUES, A. A. F.; GARCIA, L. F. R.; FROTA, M. F.; SIMÕES, R. A.; CONSANI, S. Avaliação ultraestrutural da remoção da smear layer em canais radiculares utilizando EDTA 17% com ou sem agitação. **Rev. Clin. Pesq. Odontol.**,v. 4, n. 2, p. 71-5, 2008.

MARQUES, A. A. F.; GARCIA, L. F. R.; VERAS, A. M. C.; FROTA, M. F.; TAKANO, M. O. F. Análise in vitro da proporção de cimento e guta-percha no ápice dos canais de incisivos inferiores com raízes com achatamento mésio-distal, variando-se o diâmetro final do preparo **Rev. Clin. Pesq. Odontol.**, v. 4, n. 1, p. 11-17, 2008.

MAURÍCIO, C. V., LIA, R. C. C., LEONARDO, M. R. Estudo histomorfológico de tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de pastas à base de hidróxido de cálcio, contidas em tubos de dentina humana. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 15/16, p. 23-38, 1986/1987.

MELLO, M. A. M. **Atividade de Peroxidase no crescimento e diferenciação de calos de *Pothomorphe umbellata***. Araraquara, 2001, 119p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.

MITCHEL, D. F.; SHANKALKER, G. B. Osteogenic potential of calcium hydroxide and other materials in soft tissue and bone wounds. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 37, p. 1157 – 1163, 1958.

MITTAL, M.; CHANDRA, S.; CHANDRA, S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. **J. Endodod.**, v. 21, n. 12, p. 622 – 4, 1995.

MONGELLI, E. COUSSIO, J. CICCIA, G. Investigation of the larvacidal activity of *Pothomorphe peltata* and isolation of the active constituent. **Phytother. Res.** v.16 supl.1 s.71-72, 2002.

MONGELLI, E. et al. Inhibition of peroxidation and iron (II)-dependent DNA damages by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 85-91, 1997.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Actividad antimicrobiana e interacción com el ADN de plantas medicinales de la Amazonia peruana. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 27, p. 199-203, 1995.

MORAES, M. S. **Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq.** 1983. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORAES, M. S.; AKISSUE, M. K.; OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. Caracterização cromatográfica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. **Anais de Farm. Quím. de São Paulo**, v. 24, n. 1-2, p. 1-9. 1984.

MORAES, M. S.; OLIVEIRA, F.; MANCINI, B.; AKISSUE, M. K.; AKISSUE, G. Morfodiagnose das folhas e sumidades floridas da droga pariparoba — *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 8-9, p. 77-90, 1987.

MORAES, M. S.; OLIVEIRA, F.; MANCINI, B.; AKISSUE, M. K.; AKISSUE, G. Morfodiagnose da droga pariparoba — *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 7, p. 27-37, 1985.

MORI, G.G.; GARCIA, R. B.; MORAES, I. G.; BRAMANTE, C. M.; BERNARDINELLI, N. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of a solution of alendronate as an intracanal therapeutic agent in rat teeth submitted to late reimplantation. **Dent. Traumatol.**, v.23, n. 4, p.218-21, 2007.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite — the molecular approach. **Phytochemistry**, v.55, p.627-642, 2000.

MOUSAVINASAB, M.; NAMAZIKHAH, M. S.; SARABI, N.; JAJARM, H. H.; BIDAR, M.; GHAVAMNASIRI, M. Histopathology study on pulp response to glass ionomers in human teeth. **J. Calif. Dent. Assoc.**, v. 36, n.1, p.51-5, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NASSRI, M. R. G.; LIA, R. C. C.; BOMBANA, A. C. Analysis of the tissue answer regarding of two root canal sealers. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 11, n. 01, p. 9 -14, 2003.

NOLTE, W.A. **Oral microbiology**. 4 th ed., London: Mosby. 1982, p. 55-125

NORIEGA, P.; ROPKE, C. D.; CAMILO, C. M.; FREITAS, P. C. D.; BARROS, S. B. M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4- nerolidilcatecol de *Photomorphe umbellata*, Rev. Bras. Ciênc. Farmac., vol. 41, n. 02 p. 61-69, 2005.

NORIEGA, P.; ROPKE, C. D.; CONSIGLIERI, V.O.; TAQUEDA, M. E.; TAVARES, L. C.; WASICKY, A. ; BACCHI, E. M.; BARROS, S. B. Optimization of Pothomorphe umbellata (L.) Miquel topical formulations using experimental design. **Int. J. Pharm.**, v. 353, n. 1 -2, p. 149-59, 2008.

OTERO, R. et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: Tradicional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 493-504, 2000.

OTOBONI FILHO, J. A. **Processo de reparo de dentes de cães com lesão periapical após tratamento endodôntico em uma ou duas sessões: influencia do tempo de curativo de demora e do tipo de material obturador**. Araçatuba, 2000. 336p. tese (Livre Docência) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

PECKOLT, T. H.; PECKOLT, G. História das plantas medicinais e úteis do Brasil. **Typ Laemmert**, v. 6, p. 1888-1914, 1896.

PECKOLT, W. Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil: estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L) Kunth. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 15, p. 1-13, 1941.

PERAZZO, F. F.; SOUZA, G.H.; LOPES, W.; CARDOSO, L.G.; CARVALHO, J.C.; NANAYAKKARA, N. P.; BASTOS, JK. ANTI-INFLAMMATORY AND ANALGESIC PROPERTIES OF WATER-ETHANOLIC EXTRACT FROM POTHOMORPHE

UMBELLATA (PIPERACEAE) AERIAL PARTS. **J. ETHNOPHARMACOL.**, V. 02, N. 99, P. 215-20, 2005.

PEREIRA, A. M. S. et al. Micropropagation of *Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, n.1 p.47-53, 2000.

PEREIRA, J. V. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de constituintes e de medicação intracanal à base de *Arctium lappa***. Ribeirão Preto, 2004. Dissertação de mestrado – Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

PEREIRA, N. A.; JACCOUD, R. J. S.; MORS, W. B. Triaga Brasilica: Renewed interest in a seventeenth-century panacea. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 511-516, 1996.

PERIN, F.M.; França, S.; SAQUY, P.C.; SOUSA-NETO, M.D. Avaliação antimicrobiana in vitro de extratos aquosos fitoterápicos para uso endodôntico. **Pesq. Odontol. Bras.**, v,15, n.1, p.144, 2001.

PROVÊNCIO, A. S. F. **Estudo de pastas à base de hidróxido de cálcio, utilizadas para a obturação de canais radiculares. Avaliação histopatológica**. Araraquara, 1982. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual Paulista – UNESP.

RHONER, A. Calxyl als wurzelfüllungs material nach pulpaextripation. **Schweiz. Monatsschr. Zahnheilkd.**, Zurich, v. 50, p. 903 – 48, 1940.

RIBEIRO, D. A. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, V. 105, n. 02, p. 251-6, 2008.

ROPKE C.D, DA SILVA V.V, KERA C.Z, MIRANDA D.V, DE ALMEIDA R.L, SAWADA T.C, BARROS S.B. In vitro and in vivo inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. **Photochem Photobiol**, v.82, n.2, p.439-42, 2006.

ROPKE, C.D., KANEKO, T.M., RODRIGUES, R.M., SILVA, V.V., BARROS, S. SAWADA, T.C., KATA M.J., BARROS, S.B. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. **Int J Pharm**, v.5, n.249, p.109-116, 2002.

ROPKE, C.D.; KANEKO, T.M.; RODRIGUES, R.M.; SILVA, V.V.; BARROS, S. SAWADA, T.C.; KATA M.J.; BARROS, S.B. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. **Int. J. Pharm.** v.5, n.249, p.109-116, 2005.

ROPKE, C.D.; MEIRELLES, R.R.; SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.; BARROS, S.B. *Pothomorphe umbellata* extract prevents alpha-tocopherol depletion after UV-irradiation. **Photochem. Photobiol.** V.78, n.5, p.436-439, 2003.

RUTTER, R. **Catálogo de plantas útiles de la Amazonia peruana**. 2. ed. Lima: Instituto Lingüístico de Verano, 1990.

SBERNA, M. T.; RIZZO, G.; ZACCHI, E.; CAPPARE, P.; RUBINACCI, A. A preliminary study of the use of peripheral quantitative computed tomography for investigating root canal anatomy. **Int. Endod. J.**, v. 42, n.1, p. 66-75, 2009.

SILVA, G. A. A. B.; BAUER, L. Contribuição ao estudo do óleo essencial de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth.. **Rev. Bras. de Farmácia**, v.53, p.59-61, 1972.

SILVA, R. A. D. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Nacional, 1926. p. 649.

SIQUEIRA JR, J. F. **Tratamento das infecções endodônticas**, Medsi, 1ª Ed., Rio de Janeiro, 1997.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROCAS, I. N.; RICHE, F.N.; PROVENZANO, J.C. Clinical outcome of the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using an antimicrobial protocol. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v. 106, n. 5, p. 757-62, 2008.

SOUKUP, J. **Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros**. 2. ed. Lima: Salesiana, 1987.

SPONCHIADO JUNIOR, E. C. **Atividade antibacteriana contra o *enterococcus faecalis* de uma medicação intracanal contendo ativos fitoterápicos de *Pothomorphe umbellata***. Manaus, 2006. p. tese (Doutorado) Curso de biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas.

SPONCHIADO JUNIOR, E. C.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. *Pothomorphe umbellata* : estado da arte. **Revista Fitos**, v. 03, n. 01, p. 31 – 37, 2007.

SUNZEL, B.; SODEBERG, T. A.; JOHANSSON, A.; HALLMANS, G.; GREFF, R. The protective effect on rosin end resin acid toxicity in human polymorphonuclear leukocytes and human gingival fibroblasts in vitro. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 37, p. 20-8, 1997.

TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M. R.; SILVA, L. A. B. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. **J. Endod.**, Chicago, v. 28, n. 4, p. 295 – 9, 2002.

TORABINEJAD, M.; HONG, U. C.; FORD, T. R. P.; KETERING, J. D. Antibacterial effects of some root ending filling materials, **J. Endod.**, v. 21, n.08, p. 403-06, 1995.

TOURNON, J.; SERRANO, G.; REÁTEGUI, U.; ALBÁN, J. Plantas y árboles medicinales de los Conibo del Alto Ucayali: concepciones nativas y botánica. **Revista Florestal del Perú**, v. 13, p. 107-130, 1986.

TROPE, M.; DELANO, E. O.; ORSTAVIK, D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single versus multivisit treatment. **J. Endod.**, v. 25, n. 5, p. 345-50, 1999.

TULUS, G.; BONGERT, U. S. Condicionamento mecânico do canal radicular. **Roots**, v. 01, n. 01, p. 55 – 59, 2006.

WALTON, R. E.; HOLTON, I. F.; MICHELICH, R. Calcium hydroxide as an intracanal medication: effect on posttreatment pain. **J. Endod.**, v. 29, n. 10, p. 627 - 9, 2003.

WEISMAN, M. I. Calcium hydroxide and zinc oxide eugenol as root canal filling materials. **Aust. Endod. J.**, v. 32, n.1, p. 51-2, 2006.

YOSHIKI, S.; MORI, M. Enzyme histochemistry on the tissue reaction to calcium hydroxide. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, v. 2, n. 1, p. 32 – 43, 1961.

YUNKER, T. G. The piperaceae of Brazil. **Hohnea**, v. 3, p. 144-148, 1960.



*Apêndices*

## APÊNDICES

### 1 - Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados.

**Tabela I.** Valores encontrados para células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares em 7 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	43,0	39,0	39,0	41,0	13,0
	2	25,0	33,0	33,0	25,0	18,0
	3	32,0	44,0	41,0	32,0	12,0
	4	27,0	46,0	42,0	25,0	16,0
	5	36,0	47,0	49,0	36,0	17,0
<b>média</b>		<b>32,6</b>	<b>41,8</b>	<b>40,8</b>	<b>31,8</b>	<b>15,2</b>
	1	32,0	44,0	44,0	32,0	13,0
	2	25,0	42,0	42,0	25,0	11,0
	3	31,0	37,0	33,0	31,0	18,0
	4	41,0	38,0	36,0	40,0	12,0
	5	25,0	41,0	41,0	25,0	15,0
<b>média</b>		<b>30,8</b>	<b>40,4</b>	<b>39,2</b>	<b>30,6</b>	<b>13,8</b>
	1	26,0	32,0	32,0	26,0	12,0
	2	32,0	40,0	40,0	32,0	14,0
	3	31,0	31,0	31,0	31,0	16,0
	4	26,0	41,0	41,0	22,0	11,0
	5	27,0	36,0	36,0	27,0	19,0
<b>média</b>		<b>28,4</b>	<b>36,0</b>	<b>36,0</b>	<b>27,6</b>	<b>14,4</b>
	1	32,0	39,0	39,0	32,0	11,0
	2	25,0	33,0	33,0	25,0	11,0
	3	31,0	41,0	45,0	31,0	16,0
	4	40,0	46,0	46,0	40,0	12,0
	5	29,0	39,0	49,0	25,0	15,0
<b>média</b>		<b>31,4</b>	<b>39,6</b>	<b>42,4</b>	<b>30,6</b>	<b>13,0</b>
	1	26,0	44,0	44,0	26,0	12,0
	2	32,0	42,0	42,0	33,0	14,0
	3	30,0	37,0	37,0	31,0	16,0
	4	22,0	38,0	38,0	21,0	13,0
	5	27,0	41,0	41,0	27,0	19,0
<b>média</b>		<b>27,4</b>	<b>40,4</b>	<b>40,4</b>	<b>27,6</b>	<b>14,8</b>
<b>Média Final</b>		<b>30,1</b>	<b>39,6</b>	<b>39,7</b>	<b>29,6</b>	<b>14,2</b>

Tabela II. Valores encontrados para fibroblastos em 7 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	23,0	31,0	31,0	23,0	11,0
	2	21,0	36,0	36,0	22,0	15,0
	3	19,0	38,0	38,0	19,0	15,0
	4	16,0	37,0	42,0	16,0	13,0
	5	23,0	33,0	33,0	21,0	12,0
<b>média</b>		<b>20,4</b>	<b>35,0</b>	<b>36,0</b>	<b>20,2</b>	<b>13,2</b>
	1	22,0	33,0	33,0	22,0	12,0
	2	27,0	36,0	36,0	27,0	11,0
	3	24,0	39,0	39,0	23,0	16,0
	4	21,0	40,0	40,0	21,0	12,0
	5	25,0	33,0	33,0	25,0	14,0
<b>média</b>		<b>23,8</b>	<b>36,2</b>	<b>36,2</b>	<b>23,8</b>	<b>13,6</b>
	1	25,0	36,0	34,0	24,0	13,0
	2	21,0	32,0	34,0	21,0	16,0
	3	31,0	35,0	35,0	31,0	11,0
	4	25,0	40,0	43,0	26,0	14,0
	5	22,0	39,0	39,0	25,0	11,0
<b>média</b>		<b>24,8</b>	<b>36,4</b>	<b>37,0</b>	<b>25,4</b>	<b>13,0</b>
	1	22,0	31,0	34,0	19,0	11,0
	2	27,0	36,0	36,0	27,0	15,0
	3	24,0	38,0	38,0	24,0	15,0
	4	21,0	40,0	40,0	21,0	11,0
	5	25,0	33,0	33,0	25,0	12,0
<b>média</b>		<b>23,8</b>	<b>35,6</b>	<b>36,2</b>	<b>23,2</b>	<b>12,8</b>
	1	24,0	33,0	33,0	24,0	12,0
	2	24,0	36,0	36,0	21,0	11,0
	3	31,0	39,0	39,0	35,0	13,0
	4	25,0	40,0	42,0	25,0	15,0
	5	22,0	33,0	33,0	22,0	14,0
<b>média</b>		<b>25,2</b>	<b>36,2</b>	<b>36,6</b>	<b>25,4</b>	<b>13,0</b>
<b>Média Final</b>		<b>23,6</b>	<b>35,8</b>	<b>36,4</b>	<b>23,6</b>	<b>13,1</b>

Tabela III. Valores encontrados para vasos sanguíneos em 7 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	2,0	5,0	5,0	5,0	0,0
	2	2,0	3,0	3,0	2,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	4	0,0	2,0	2,0	0,0	2,0
	5	3,0	3,0	2,0	3,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,6</b>	<b>2,8</b>	<b>2,6</b>	<b>2,2</b>	<b>1,0</b>
	1	2,0	4,0	3,0	2,0	1,0
	2	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0
	3	3,0	1,0	1,0	3,0	0,0
	4	2,0	3,0	3,0	3,0	2,0
	5	1,0	0,0	0,0	1,0	2,0
<b>média</b>		<b>1,8</b>	<b>2,0</b>	<b>1,8</b>	<b>2,0</b>	<b>1,2</b>
	1	1,0	4,0	4,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	3	2,0	3,0	3,0	2,0	1,0
	4	3,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	5	2,0	2,0	2,0	2,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,8</b>	<b>2,4</b>	<b>2,4</b>	<b>1,6</b>	<b>0,6</b>
	1	2,0	4,0	3,0	2,0	1,0
	2	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0
	3	3,0	1,0	1,0	3,0	0,0
	4	2,0	3,0	2,0	2,0	2,0
	5	1,0	0,0	0,0	1,0	2,0
<b>média</b>		<b>1,8</b>	<b>2,0</b>	<b>1,6</b>	<b>1,8</b>	<b>1,2</b>
	1	1,0	4,0	2,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	3	2,0	3,0	3,0	2,0	1,0
	4	1,0	2,0	2,0	2,0	1,0
	5	2,0	2,0	2,0	2,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>2,4</b>	<b>2,0</b>	<b>1,6</b>	<b>0,4</b>
<b>Média Final</b>		<b>1,6</b>	<b>2,3</b>	<b>2,0</b>	<b>1,8</b>	<b>0,8</b>

Tabela IV. Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 7 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	1,0	3,0	3,0	2,0	0,0
	2	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	4	0,0	2,0	2,0	0,0	2,0
	5	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>1,2</b>	<b>0,8</b>
	1	1,0	4,0	3,0	1,0	1,0
	2	1,0	3,0	3,0	1,0	1,0
	3	3,0	1,0	1,0	3,0	0,0
	4	3,0	2,0	2,0	3,0	1,0
	5	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>2,0</b>	<b>2,2</b>	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>0,8</b>
	1	4,0	3,0	4,0	4,0	0,0
	2	3,0	1,0	1,0	3,0	1,0
	3	2,0	3,0	3,0	2,0	1,0
	4	3,0	3,0	3,0	3,0	2,0
	5	3,0	2,0	3,0	3,0	2,0
<b>média</b>		<b>3,0</b>	<b>2,4</b>	<b>2,8</b>	<b>3,0</b>	<b>1,2</b>
	1	1,0	4,0	4,0	3,0	1,0
	2	1,0	3,0	3,0	1,0	1,0
	3	3,0	1,0	1,0	3,0	0,0
	4	3,0	2,0	2,0	3,0	1,0
	5	2,0	1,0	1,0	2,0	2,0
<b>média</b>		<b>2,0</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,4</b>	<b>1,0</b>
	1	4,0	3,0	4,0	4,0	0,0
	2	3,0	1,0	1,0	3,0	1,0
	3	2,0	3,0	3,0	2,0	1,0
	4	3,0	3,0	3,0	3,0	1,0
	5	3,0	2,0	2,0	3,0	2,0
<b>média</b>		<b>3,0</b>	<b>2,4</b>	<b>2,6</b>	<b>3,0</b>	<b>1,0</b>
<b>Média Final</b>		<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>0,9</b>

Tabela V. Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 7 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	1,0	1,0	2,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	5	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>0,6</b>
	1	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0
	4	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0
	5	0,0	1,0	1,0	0,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>
	1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	2,0	2,0	1,0	0,0
	3	0,0	2,0	2,0	0,0	1,0
	4	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0
	5	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,0</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>1,0</b>	<b>0,6</b>
	1	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	4	2,0	1,0	1,0	2,0	2,0
	5	0,0	2,0	2,0	0,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,0</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>
	1	1,0	1,0	2,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	5	2,0	1,0	1,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>
<b>Média Final</b>		<b>1,1</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>0,7</b>

Tabela VI. Valores encontrados para área em mm<sup>2</sup> da cápsula reacional em 7 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	1,238	1,673	1,645	1,242	-
	2	1,549	1,385	1,385	1,512	-
	3	1,527	1,238	1,242	1,535	-
	4	1,332	1,583	1,583	1,332	-
	5	1,438	1,612	1,612	1,438	-
<b>média</b>		<b>1,416</b>	<b>1,498</b>	<b>1,493</b>	<b>1,411</b>	-
	1	1,555	1,324	1,337	1,548	-
	2	1,348	1,541	1,541	1,348	-
	3	1,612	0,718	0,718	1,612	-
	4	1,125	1,655	1,655	1,125	-
	5	1,433	1,523	1,523	1,433	-
<b>média</b>		<b>1,414</b>	<b>1,352</b>	<b>1,354</b>	<b>1,413</b>	-
	1	1,276	0,925	0,925	1,276	-
	2	1,339	1,239	1,239	1,339	-
	3	1,529	1,677	1,677	1,529	-
	4	1,612	1,429	1,429	1,612	-
	5	1,451	1,377	1,377	1,451	-
<b>média</b>		<b>1,441</b>	<b>1,329</b>	<b>1,329</b>	<b>1,441</b>	-
	1	1,548	1,324	1,317	1,552	-
	2	1,348	1,553	1,541	1,349	-
	3	1,612	0,718	0,718	1,612	-
	4	1,126	1,551	1,655	1,125	-
	5	1,433	1,523	1,523	1,444	-
<b>média</b>		<b>1,413</b>	<b>1,333</b>	<b>1,350</b>	<b>1,416</b>	-
	1	1,276	0,925	0,925	1,282	-
	2	1,339	1,239	1,226	1,339	-
	3	1,529	1,677	1,681	1,529	-
	4	1,612	1,432	1,429	1,612	-
	5	1,451	1,343	1,377	1,451	-
<b>média</b>		<b>1,441</b>	<b>1,323</b>	<b>1,327</b>	<b>1,442</b>	-
<b>Média Final</b>		<b>1,425</b>	<b>1,367</b>	<b>1,370</b>	<b>1,424</b>	-

## 2 - Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados.

Tabela I. Valores encontrados para células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares em 21 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	21,0	31,0	23,0	31,0	7,0
	2	31,0	32,0	31,0	32,0	11,0
	3	27,0	25,0	27,0	28,0	11,0
	4	22,0	28,0	22,0	28,0	9,0
	5	27,0	22,0	27,0	22,0	9,0
<b>média</b>		<b>25,6</b>	<b>27,6</b>	<b>26,0</b>	<b>28,2</b>	<b>9,4</b>
	1	26,0	37,0	26,0	38,0	12,0
	2	25,0	26,0	25,0	26,0	10,0
	3	32,0	21,0	31,0	21,0	8,0
	4	31,0	24,0	34,0	25,0	12,0
	5	26,0	29,0	26,0	29,0	10,0
<b>média</b>		<b>28,0</b>	<b>27,4</b>	<b>28,4</b>	<b>27,8</b>	<b>10,0</b>
	1	31,0	34,0	32,0	34,0	14,0
	2	31,0	32,0	31,0	32,0	11,0
	3	23,0	29,0	22,0	27,0	6,0
	4	24,0	26,0	25,0	26,0	11,0
	5	26,0	20,0	26,0	21,0	11,0
<b>média</b>		<b>27,0</b>	<b>28,2</b>	<b>27,2</b>	<b>28,0</b>	<b>10,6</b>
	1	26,0	35,0	26,0	37,0	12,0
	2	25,0	26,0	23,0	23,0	19,0
	3	32,0	21,0	32,0	21,0	8,0
	4	31,0	25,0	31,0	25,0	11,0
	5	26,0	29,0	26,0	27,0	10,0
<b>média</b>		<b>28,0</b>	<b>27,2</b>	<b>27,6</b>	<b>26,6</b>	<b>12,0</b>
	1	32,0	34,0	32,0	34,0	14,0
	2	31,0	32,0	31,0	32,0	11,0
	3	23,0	27,0	23,0	29,0	6,0
	4	25,0	26,0	25,0	27,0	11,0
	5	26,0	21,0	26,0	21,0	11,0
<b>média</b>		<b>27,4</b>	<b>28,0</b>	<b>27,4</b>	<b>28,6</b>	<b>10,6</b>
<b>Média Final</b>		<b>27,2</b>	<b>27,6</b>	<b>27,3</b>	<b>27,8</b>	<b>10,5</b>

Tabela II. Valores encontrados para fibroblastos em 21 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	13,0	14,0	13,0	12,0	4,0
	2	11,0	12,0	11,0	12,0	3,0
	3	9,0	12,0	9,0	12,0	5,0
	4	12,0	10,0	12,0	12,0	2,0
	5	10,0	13,0	10,0	13,0	3,0
<b>média</b>		<b>11,0</b>	<b>12,2</b>	<b>11,0</b>	<b>12,2</b>	<b>3,4</b>
	1	12,0	12,0	12,0	12,0	3,0
	2	12,0	14,0	12,0	14,0	3,0
	3	10,0	13,0	10,0	13,0	2,0
	4	11,0	9,0	12,0	9,0	2,0
	5	8,0	9,0	8,0	9,0	1,0
<b>média</b>		<b>10,6</b>	<b>11,4</b>	<b>10,8</b>	<b>11,4</b>	<b>2,2</b>
	1	14,0	12,0	14,0	12,0	4,0
	2	11,0	12,0	11,0	12,0	2,0
	3	12,0	13,0	12,0	13,0	2,0
	4	9,0	11,0	9,0	11,0	1,0
	5	8,0	12,0	8,0	11,0	1,0
<b>média</b>		<b>10,8</b>	<b>12,0</b>	<b>10,8</b>	<b>11,8</b>	<b>2,0</b>
	1	12,0	12,0	12,0	13,0	3,0
	2	12,0	14,0	12,0	14,0	3,0
	3	10,0	13,0	10,0	13,0	2,0
	4	11,0	9,0	11,0	9,0	3,0
	5	8,0	9,0	8,0	9,0	1,0
<b>média</b>		<b>10,6</b>	<b>11,4</b>	<b>10,6</b>	<b>11,6</b>	<b>2,4</b>
	1	14,0	13,0	14,0	12,0	4,0
	2	11,0	12,0	11,0	12,0	2,0
	3	11,0	12,0	12,0	13,0	2,0
	4	9,0	11,0	9,0	11,0	2,0
	5	8,0	11,0	8,0	11,0	1,0
<b>média</b>		<b>10,6</b>	<b>11,8</b>	<b>10,8</b>	<b>11,8</b>	<b>2,2</b>
<b>Média Final</b>		<b>10,7</b>	<b>11,7</b>	<b>10,8</b>	<b>11,7</b>	<b>2,4</b>

Tabela III. Valores encontrados para vasos sanguíneos em 21 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	3	2,0	1,0	2,0	1,0	0,0
	4	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	5	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,6</b>	<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,4</b>	<b>0,4</b>
	1	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	4	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	5	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>0,6</b>
	1	1,0	2,0	2,0	2,0	1,0
	2	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	3	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
	4	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	5	2,0	1,0	2,0	1,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,2</b>	<b>1,6</b>	<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>0,4</b>
	1	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	4	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	5	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>0,6</b>
	1	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	3	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
	4	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	5	2,0	1,0	2,0	2,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,2</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>	<b>1,8</b>	<b>0,4</b>
<b>Média Final</b>		<b>1,3</b>	<b>1,5</b>	<b>1,3</b>	<b>1,5</b>	<b>0,4</b>

Tabela IV. Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 21 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	2,0	1,0	2,0	1,0	0,0
	4	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	5	2,0	2,0	1,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,6</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>0,8</b>
	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	4	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	5	2,0	3,0	2,0	3,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,8</b>	<b>1,4</b>	<b>1,8</b>	<b>1,0</b>
	1	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	4	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0
	5	2,0	1,0	2,0	1,0	01,
<b>média</b>		<b>1,2</b>	<b>1,6</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,0</b>
	1	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	2,0
	4	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	5	2,0	3,0	2,0	3,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,8</b>	<b>1,6</b>	<b>1,8</b>	<b>1,2</b>
	1	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	2,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	5	2,0	1,0	2,0	1,0	01,
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,0</b>
<b>Média Final</b>		<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,3</b>	<b>1,5</b>	<b>1,0</b>

Tabela V. Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 21 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	4	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>0,8</b>
	1	2,0	1,0	2,0	1,0	0,0
	2	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	5	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>0,8</b>
	1	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0
	2	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	3	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	4	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	5	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>
	1	2,0	1,0	2,0	1,0	0,0
	2	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	5	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>0,8</b>
	1	1,0	0,0	1,0	0,0	1,0
	2	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
	3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	5	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>
<b>Média Final</b>		<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>0,8</b>

Tabela VI. Valores encontrados para área em mm<sup>2</sup> da cápsula reacional em 21 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	0,732	0,761	0,732	0,761	-
	2	0,739	0,752	0,740	0,743	-
	3	0,533	0,591	0,533	0,591	-
	4	0,673	0,587	0,699	0,586	-
	5	0,872	0,768	0,872	0,768	-
<b>média</b>		<b>0,709</b>	<b>0,691</b>	<b>0,715</b>	<b>0,689</b>	-
	1	0,712	0,721	0,712	0,721	-
	2	0,650	0,734	0,650	0,734	-
	3	0,854	0,638	0,854	0,638	-
	4	0,649	0,855	0,649	0,855	-
	5	0,728	0,732	0,728	0,732	-
<b>média</b>		<b>0,718</b>	<b>0,736</b>	<b>0,718</b>	<b>0,736</b>	-
	1	0,658	0,623	0,658	0,639	-
	2	0,713	0,814	0,713	0,814	-
	3	0,526	0,786	0,526	0,787	-
	4	0,632	0,812	0,615	0,812	-
	5	0,791	0,557	0,791	0,557	-
<b>média</b>		<b>0,664</b>	<b>0,718</b>	<b>0,660</b>	<b>0,721</b>	-
	1	0,712	0,721	0,712	0,721	-
	2	0,650	0,734	0,650	0,737	-
	3	0,854	0,638	0,854	0,638	-
	4	0,649	0,855	0,649	0,855	-
	5	0,728	0,732	0,728	0,735	-
<b>média</b>		<b>0,718</b>	<b>0,736</b>	<b>0,718</b>	<b>0,737</b>	-
	1	0,658	0,627	0,658	0,618	-
	2	0,713	0,814	0,713	0,814	-
	3	0,526	0,787	0,526	0,781	-
	4	0,612	0,812	0,614	0,812	-
	5	0,791	0,557	0,791	0,557	-
<b>média</b>		<b>0,660</b>	<b>0,719</b>	<b>0,660</b>	<b>0,716</b>	-
<b>Média Final</b>		<b>0,693</b>	<b>0,725</b>	<b>0,694</b>	<b>0,719</b>	-

### 3 - Determinação das médias dos valores para os eventos histopatológicos encontrados.

Tabela I. Valores encontrados para células polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares em 42 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	13,0	11,0	13,0	12,0	7,0
	2	12,0	14,0	12,0	14,0	9,0
	3	12,0	11,0	11,0	11,0	10,0
	4	11,0	12,0	11,0	13,0	5,0
	5	13,0	12,0	13,0	12,0	7,0
<b>média</b>		<b>12,2</b>	<b>12,0</b>	<b>12,0</b>	<b>12,4</b>	<b>7,6</b>
	1	11,0	10,0	11,0	10,0	10,0
	2	10,0	14,0	10,0	14,0	8,0
	3	13,0	12,0	13,0	13,0	6,0
	4	14,0	11,0	12,0	11,0	7,0
	5	11,0	10,0	11,0	10,0	10,0
<b>média</b>		<b>11,8</b>	<b>11,4</b>	<b>11,4</b>	<b>11,6</b>	<b>8,2</b>
	1	15,0	18,0	15,0	18,0	6,0
	2	12,0	17,0	12,0	17,0	6,0
	3	16,0	14,0	17,0	13,0	9,0
	4	13,0	15,0	13,0	15,0	11,0
	5	11,0	12,0	11,0	12,0	6,0
<b>média</b>		<b>13,4</b>	<b>15,2</b>	<b>13,6</b>	<b>15,0</b>	<b>7,6</b>
	1	11,0	10,0	11,0	10,0	10,0
	2	10,0	14,0	10,0	14,0	8,0
	3	13,0	12,0	13,0	13,0	6,0
	4	14,0	11,0	14,0	11,0	7,0
	5	11,0	11,0	11,0	10,0	10,0
<b>média</b>		<b>11,8</b>	<b>11,6</b>	<b>11,8</b>	<b>11,6</b>	<b>8,2</b>
	1	15,0	17,0	15,0	18,0	6,0
	2	12,0	17,0	12,0	17,0	7,0
	3	16,0	14,0	14,0	14,0	9,0
	4	13,0	15,0	13,0	15,0	10,0
	5	12,0	12,0	11,0	12,0	6,0
<b>média</b>		<b>13,6</b>	<b>15,0</b>	<b>13,0</b>	<b>15,0</b>	<b>7,6</b>
<b>Média Final</b>		<b>12,5</b>	<b>13,0</b>	<b>12,3</b>	<b>13,1</b>	<b>7,8</b>

Tabela II. Valores encontrados para fibroblastos em 42 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	7,0	7,0	7,0	7,0	2,0
	2	8,0	9,0	8,0	8,0	4,0
	3	7,0	7,0	7,0	7,0	3,0
	4	6,0	7,0	5,0	7,0	2,0
	5	7,0	7,0	7,0	8,0	4,0
<b>média</b>		<b>7,0</b>	<b>7,4</b>	<b>6,8</b>	<b>7,4</b>	<b>3,0</b>
	1	5,0	7,0	5,0	7,0	4,0
	2	5,0	7,0	5,0	6,0	3,0
	3	4,0	6,0	4,0	6,0	2,0
	4	7,0	5,0	6,0	5,0	1,0
	5	5,0	6,0	6,0	6,0	2,0
<b>média</b>		<b>5,2</b>	<b>6,2</b>	<b>5,2</b>	<b>6,0</b>	<b>2,4</b>
	1	7,0	6,0	7,0	5,0	3,0
	2	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0
	3	7,0	7,0	7,0	7,0	2,0
	4	5,0	8,0	6,0	8,0	4,0
	5	6,0	5,0	6,0	5,0	3,0
<b>média</b>		<b>6,0</b>	<b>6,2</b>	<b>6,2</b>	<b>6,0</b>	<b>3,0</b>
	1	5,0	7,0	5,0	7,0	4,0
	2	5,0	6,0	5,0	6,0	3,0
	3	4,0	6,0	5,0	6,0	3,0
	4	7,0	5,0	7,0	5,0	1,0
	5	6,0	7,0	6,0	6,0	2,0
<b>média</b>		<b>5,4</b>	<b>6,2</b>	<b>5,6</b>	<b>6,0</b>	<b>2,6</b>
	1	7,0	6,0	7,0	6,0	3,0
	2	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0
	3	7,0	6,0	7,0	7,0	2,0
	4	6,0	8,0	6,0	7,0	4,0
	5	6,0	5,0	6,0	5,0	3,0
<b>média</b>		<b>6,2</b>	<b>6,0</b>	<b>6,2</b>	<b>6,0</b>	<b>3,0</b>
<b>Média Final</b>		<b>5,9</b>	<b>6,4</b>	<b>6,0</b>	<b>6,2</b>	<b>2,8</b>

Tabela III. Valores encontrados para vasos sanguíneos em 42 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	3	2,0	1,0	2,0	1,0	0,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	5	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>0,4</b>
	1	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	3	1,0	2,0	2,0	2,0	0,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	5	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>0,4</b>
	1	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	3	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	5	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>0,4</b>
	1	2,0	1,0	2,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	5	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>0,6</b>
	1	1,0	2,0	1,0	2,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	3	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	5	2,0	1,0	2,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,6</b>	<b>0,4</b>
<b>Média Final</b>		<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>1,2</b>	<b>1,3</b>	<b>0,4</b>

Tabela IV. Valores encontrados para fagócitos mononucleares (macrófagos) em 42 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	4	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	5	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
<b>média</b>		<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>
	1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0
	4	1,0	2,0	2,0	2,0	0,0
	5	2,0	1,0	2,0	1,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>0,6</b>
	1	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	1,0	2,0	1,0	1,0	0,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	5	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
<b>média</b>		<b>0,8</b>	<b>1,2</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>0,4</b>
	1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	4	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
	5	2,0	1,0	2,0	1,0	0,0
<b>média</b>		<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>1,2</b>	<b>0,4</b>
	1	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0
	2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	3	0,0	2,0	1,0	1,0	0,0
	4	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	5	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0
<b>média</b>		<b>0,6</b>	<b>1,2</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>
<b>Média Final</b>		<b>0,8</b>	<b>1,1</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,4</b>

Tabela V. Valores encontrados para células gigantes inflamatórias em 42 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	2	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
	3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0
	5	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
<b>média</b>		<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
	1	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0
	3	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	4	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	5	1,0	2,0	1,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>
	1	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	2	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	4	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>média</b>		<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,0</b>
	1	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	2	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	4	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	5	1,0	1,0	0,0	2,0	1,0
<b>média</b>		<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>
	1	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	2	0,0	2,0	0,0	1,0	0,0
	3	1,0	1,0	1,0	1,0	0,0
	4	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>média</b>		<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,0</b>
<b>Média Final</b>		<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>	<b>0,1</b>

Tabela VI. Valores encontrados para área em mm<sup>2</sup> da cápsula reacional em 42 dias.

Rato	Lâmina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Controle
	1	0,441	0,650	0,446	0,637	-
	2	0,681	0,447	0,686	0,439	-
	3	0,577	0,551	0,577	0,551	-
	4	0,463	0,595	0,461	0,595	-
	5	0,569	0,612	0,570	0,612	-
<b>média</b>		<b>0,546</b>	<b>0,571</b>	<b>0,548</b>	<b>0,566</b>	-
	1	0,791	0,777	0,791	0,782	-
	2	0,553	0,572	0,553	0,572	-
	3	0,437	0,549	0,437	0,549	-
	4	0,412	0,622	0,412	0,619	-
	5	0,627	0,439	0,627	0,440	-
<b>média</b>		<b>0,564</b>	<b>0,591</b>	<b>0,564</b>	<b>0,592</b>	-
	1	0,592	0,592	0,592	0,592	-
	2	0,547	0,414	0,547	0,414	-
	3	0,417	0,726	0,416	0,712	-
	4	0,695	0,537	0,695	0,537	-
	5	0,718	0,485	0,732	0,485	-
<b>média</b>		<b>0,593</b>	<b>0,550</b>	<b>0,596</b>	<b>0,548</b>	-
	1	0,791	0,769	0,765	0,782	-
	2	0,553	0,572	0,553	0,572	-
	3	0,437	0,532	0,444	0,577	-
	4	0,412	0,619	0,412	0,619	-
	5	0,627	0,457	0,627	0,439	-
<b>média</b>		<b>0,564</b>	<b>0,589</b>	<b>0,560</b>	<b>0,597</b>	-
	1	0,592	0,592	0,592	0,592	-
	2	0,547	0,414	0,547	0,414	-
	3	0,438	0,712	0,416	0,712	-
	4	0,695	0,537	0,695	0,542	-
	5	0,720	0,470	0,718	0,485	-
<b>média</b>		<b>0,598</b>	<b>0,545</b>	<b>0,593</b>	<b>0,549</b>	-
<b>Média Final</b>		<b>0,573</b>	<b>0,569</b>	<b>0,572</b>	<b>0,570</b>	-

**4 - Determinação dos escores empregados para os eventos histopatológicos encontrados.**

**a) Infiltrado inflamatório**

0 a 15 – Discreto

15 a 29 - Moderado

30 ou mais - Intenso

**b) Fibroblastos**

0 a 9 - Discreto

10 a 24 - Moderado

25 a 35 – Intenso

**c) Vasos Sanguíneos**

0 a 0,5 – Discreto

06 a 1,0 – Moderado

**d) Área da cápsula reacional (mm<sup>2</sup>)**

0 a 0,6 – Discreta

0,61 a 1,5 – Moderada

1,5 a mais – Intensa

**e) Macrófagos**

0 a 1 – Discreto

1,1 a 1,5 – Moderado

1,5 a mais – Intenso

**f) Células gigantes inflamatórias**

0 a 1 – Discreto

1,1 a 2 – Moderado

2,1 a 3 - Intenso