

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

PATRÍCIA VIDA CASSI BETTEGA, DDS

**Confirmação experimental da utilidade do *Nasturtium
officinale* R. Br. usado empiricamente como promotor de
reparo de lesões bucais**

**CURITIBA
2011**

PATRÍCIA VIDA CASSI BETTEGA, DDS

Confirmação experimental da utilidade do *Nasturtium officinale* R. Br. usado empiricamente como promotor de reparo de lesões bucais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração Biociências.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Ana Maria Trindade Grégio.

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann

CURITIBA

2011

Agradecimentos

Agradeço,

A Deus, força Divina, pela luz e caminho trilhado no desenvolvimento deste trabalho, assim como as dificuldades surgidas e as vitórias conquistadas que tanto contribuíram para um maior e melhor crescimento intelectual e espiritual.

À minha mãe, Aorea Vida Cassi, pelo apoio incondicional e a toda minha família pelo exemplo e força, especialmente à minha irmã, Solange Cassi Bobato, pela enorme ajuda e incentivo dispensado ao longo da realização desta pesquisa.

Ao meu esposo, Joel Antonio Bettega Junior, pela ajuda, dedicação e incentivo, nos momentos difíceis, que não foram poucos, estando sempre ao meu lado, colaborando para o bom desenvolvimento deste trabalho e mostrando-me que, quando há amor e cumplicidade, não existem dificuldades que não possam ser solucionadas e vencidas.

Ao meu querido e amado filho, Henrique Vida Cassi Bettega, pela paciência e entendimento nos momentos em que precisei ser “menos mãe e mais profissional”.

A todos os funcionários e professores que de alguma maneira tornaram este trabalho possível.

Em especial à professora Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann e ao professor Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa pela valiosa contribuição no processo de qualificação do trabalho.

À professora Dra. Ana Maria Trindade Grégio, não apenas pela orientação, mas pelo carinho, dedicação e sabedoria com que conduziu esta pesquisa, enaltecendo as vitórias conquistadas e transpondo os obstáculos surgidos em nosso caminho com grande maestria.

Resumo

Relevância etnofarmacológica - O *Nasturtium officinale* R. Br. (Brassicaceae), conhecido como “agrião d’água”, é uma planta herbácea amplamente consumida como alimento por diversas culturas. Além disso, é usada na medicina popular para tratar asma, bronquite e hipertensão, dentre outras doenças. Comunidades rurais italianas têm usado o *N. officinale* como adjuvante na cura de estomatite bovina, sem qualquer comprovação científica que suporte seu uso para tal finalidade.

Objetivo do estudo - Este estudo avaliou a eficácia do *N. officinale* como adjuvante na cicatrização de úlceras traumáticas em dorsos de línguas de ratos.

Material e Métodos - Em quatro pares de grupos controle-experimental (oito animais por grupo), foram induzidas lesões com *punch* de 0,5mm nas línguas, mimetizando úlceras traumáticas. Os ratos dos grupos controle receberam diariamente solução salina sobre as lesões. Os animais dos grupos experimentais receberam solução oral (15% de extrato de *N. officinale*) sobre as úlceras. Os animais foram mortos com 2, 7, 14 e 21 dias após a indução das lesões, as quais foram avaliadas qualitativamente pela coloração de Hematoxilina-Eosina e quantitativamente pela coloração de Picrosírius sob luz polarizada.

Resultados - Foi verificada maior deposição de colágeno total, imaturo e maduro nos grupos experimentais que nos controles após 14 e 21 dias, com significância estatística de $p < 0,05$.

Conclusão - Os resultados mostraram que uma solução contendo 15% de extrato de *N. officinale* acelera a cicatrização de úlceras traumáticas em dorso de língua de ratos com maior deposição de colágeno.

Palavras-chave: *Nasturtium officinale*; Úlcera; Cicatrização de feridas; Colágeno.

Abstract

Ethnopharmacological relevance - *Nasturtium officinale* R.Br. (Brassicaceae), known as “watercress”, is an herbal plant widely consumed as food by many cultures. Along with this, it is used in folk medicine to treat asthma, bronchitis and hypertension, among others. Rural Italian communities have been used *N. officinale* as adjuvant to cure bovine stomatitis without any scientific comprobatation that supports its use for such end.

Aim of the study - This study evaluated the efficacy of *N. officinale* as adjuvant on the healing of traumatic ulcers on rat tongue dorsum.

Materials and Methods - In four control-experiment group-pairs (eight animals per group) there were punch induced 0.5 mm lesions on tongue dorsum, to mimic traumatic ulcers. Rats from control groups received saline solution onto lesions daily. Animals from experimental groups received oral solution containing 15% *N. officinale* extract onto lesions. Animals were killed at 2, 7, 14, and 21 days after lesion induction. Lesions were qualitatively evaluated by hematoxilin-eosine stain, and quantitatively, by picrosirius red stain under polarized light.

Results - There were observed higher deposits of total, immature and mature collagen in experimental groups than respective controls after 14 and 21 days.

Conclusion - Results revealed that a solution containing 15% *N. officinale* extract anticipate wound healing on rats tongue dorsum with higher collagen deposits.

Keywords: *Nasturtium officinale*; Ulcer; Wound healing; Collagen

Sumário

1. Artigo em Português	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
RESULTADOS	12
DISCUSSÃO	17
REFERÊNCIAS	21
 2. Artigo em Inglês	 24
INTRODUCTION	25
MATERIAL AND METHODS	26
RESULTS	29
DISCUSSION	33
REFERENCES	37
 3. Anexos	 40
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	41
ANEXO B – ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
ANEXO C – NORMAS DA REVISTA	46

1. Artigo em Português

1. Introdução

As lesões mais comuns da cavidade bucal são as úlceras traumáticas. A perda do epitélio e a exposição do tecido conjuntivo subjacente caracterizam essas lesões, causando dor e desconforto (Martinez et al., 2002; Rioboo et al., 2005). Empiricamente, diferentes grupos populacionais utilizam extratos de plantas como auxiliares do processo de cicatrização de úlceras traumáticas (Fonseca et al., 2011; Kosger et al., 2009; Vilela et al., 2008).

Na busca por fitoterápicos de baixo custo e de fácil acesso, que possam induzir ou melhorar o processo de reparo, nosso grupo verificou que o *Nasturtium officinale* (nom. comum. “agrião d’água”) vem sendo empregado há muito por comunidades rurais italianas com finalidades veterinárias no tratamento de estomatites (Bullita et al., 2007; Viegi et al., 2003). Além disso, o *N. officinale* mostrou potencial terapêutico no reparo de úlceras em pele de coelhos induzidas quimicamente ou por calor (Abu-Zinadah, 2008).

O *N. officinale* é uma planta medicinal herbácea e perene, pertencente à família das Crucíferas (Brassicaceae), encontrada em diversos países e comercializada na forma de planta fresca. É consumido cru em saladas, e cozido, em sopas. Além de seu uso como alimento, também é empregado na medicina popular de diversos países como expectorante, hipoglicemiante, estimulante estomacal e anti-hipertensivo (Bahamikia e Yazdanparast, 2008; Halberstein, 2005). É indicado, ainda, para tratamento de diabetes, bronquite, tuberculose, asma e escorbuto (Özen, 2009).

A despeito de sua importância etnobotânica, etnoveterinária e da facilidade de obtenção do *N. officinale*, inexistem estudos publicados que comprovem sua eficácia no tratamento de úlceras traumáticas, tão comuns em Odontologia.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do *N. officinale* como adjuvante no processo de reparo em língua de ratos.

2. Material e métodos

2.1 Extrato de *N. officinale* e solução oral

O material vegetal foi coletado em dezembro de 2005, identificado pelo Dr. Gert Hatschbach e registrado no Museu Botânico de Curitiba (Brasil), sob o número 248503. Esse material vegetal foi pré-estabilizado em condições ambientes e estabilizado com ventilação forçada a 45 °C. A padronização granulométrica foi realizada em um moinho de facas, com tamis de 8 mm.

Foi adaptada uma manta de algodão de 3 cm de espessura sobre placa porosa de teflon, no fundo de extrator de Soxhlet (Carvalho et al., 2009). Foram adicionados 500 g de material vegetal no extrator, 1500 mL de etanol 85% sobre o material vegetal, para umectação, por 30 min. Em balão de 3000 mL acoplado ao extrator foram adicionados 1500 mL de etanol 85%. Após conexão de condensador, iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua. Transcorridas 5 h de extração, concentrou-se o extrato do balão para aproximadamente 800 mL. O extrato foi transferido para balão volumétrico e completado o volume com etanol 85%.

Cada mililitro da solução oral a ser utilizada no estudo continha 0,15 mL de extrato de *N. officinale* e 0,85 mL de excipientes (benzoato de sódio, ácido cítrico, sacarina sódica, sorbitol 70%, carboximetilcelulose e água purificada), 1,080 mg de feniletilglucosinolato (PEITC), 0,846 mg de flavonóides (em rutina) e 0,256 mg de fenilpropanóides (em ácido clorogênico). O extrato de *N.officinale* foi padronizado dentro desses três elementos que são os marcadores da solução oral.

2.2 Animais

Para realização desse estudo o projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-PUCPR – 445/2009). Para tanto, foram utilizados 64 ratos machos da linhagem Wistar com idade de 45-50 dias e massa corporal de ca. 200 g. Os animais foram alimentados com ração peletizada Nuvilab® CR-1 (Nuvital Nutrientes S.A.) e água *ad libitum*, com ciclos claro-escuro de 12 h e temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

2.3 Indução de úlceras

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (30 mg/kg) via intraperitoneal antes da indução mecânica de úlceras na região central do dorso da língua, por meio de um *punch* de 0,5 mm. A técnica consiste em fazer movimentos de rotação e pressão com o instrumento sobre a área a ser removida, aprofundando-o até se notar certa resistência (Alonso et al., 2008). Durante os três dias que se seguiram à indução das úlceras, os animais foram medicados com mepiridina (2 mg/kg; via intraperitoneal) para diminuição da dor, facilitando a alimentação.

2.4 Tratamento experimental

Imediatamente após a indução mecânica de úlceras, os animais foram aleatoriamente alocados em oito grupos de oito espécimes. Quatro grupos serviram como controles (G_{ctrl2} , G_{ctrl7} , G_{ctrl14} , G_{ctrl21}) e somente receberam aplicação tópica de solução salina esterilizada, uma vez ao dia, no mesmo horário. Outros quatro grupos experimentais (G_{exp2} , G_{exp7} , G_{exp14} e G_{exp21}) receberam alíquotas diárias de 50 µL de solução oral de *N. officinale* sobre as úlceras por 2, 7, 14 e 21 dias, respectivamente. Os animais de cada par de grupos controle-experimental foram mortos por overdose

de tiopental sódico (120 mg/kg) via intraperitoneal e intracardíaca, após os períodos citados acima.

2.5 Processamento e análise histológica

Após a morte dos animais de cada par de grupos controle-experimental, as línguas foram removidas com uso de lâmina de bisturi n° 12 e acondicionadas em coletores universais com formalina tamponada 10%. As línguas fixadas em formalina foram emblocadas em parafina e as regiões de úlceras foram seccionadas até espessura de 5 µm, conforme técnica-padrão. Os cortes foram diafanizados e corados por hematoxilina-eosina (HE) e *picrosirius red* (SR)(Alonso et al., 2008).

Os cortes corados por HE foram avaliados qualitativamente em microscópio óptico Olympus® Medusa BX-40 com magnificação de 400×, por dois observadores independentes. Foram avaliadas as variáveis intensidade da inflamação, conteúdo de colágeno e angioneogênese.

Os cortes corados por SR foram analisados em microscópio Olympus® BX-50 munido de lente polarizadora Olympus® U-Pot e microcâmera Dinolite® em magnificação de 400×, por um único observador, para determinar a presença de colágeno maduro e imaturo na região da lesão. O colágeno maduro apresenta coloração vermelho-alaranjada, enquanto o imaturo é verde-amarelado (Montes, 1996). Para fins analíticos e estatísticos, as imagens de quatro campos foram aleatoriamente obtidas. As imagens foram analisadas no programa de morfometria Image Proplus™ 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), que forneceu as áreas de colágeno maduro e imaturo, expressas em micrômetros quadrados. Os valores finais foram determinados a partir das médias dos quatro campos.

2.6 Análise estatística

Foi empregado o pacote estatístico SPSS® 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.), sendo que o nível de significância adotado foi 5% ($p < 0,05$). Foi realizado o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov na qual se observou que apenas dois dos oito tratamentos não apresentaram distribuição normal, optando por ANOVA a dois critérios modelo fatorial completo. O teste de homogeneidade de variâncias de Levene revelou que a variância era heterogênea, optando-se pelo teste de comparações múltiplas paramétricas de Games-Howell.

3. Resultados

3.1 Análise qualitativa

Decorridos dois dias da ulceração mecânica, tanto o grupo controle, quanto o experimental, apresentaram as mesmas características de infiltrado inflamatório polimorfonuclear intenso, semelhante quantidade de fibras colágenas e poucos vasos sanguíneos neoformados (Fig. 1A e 1B).

O infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear se apresentou invariável no par controle-experimental, decorridos sete dias após a indução das úlceras. Em ambos grupos o infiltrado foi moderado ou intenso. Entretanto, no G_{exp7} foi observado um maior número de fibroblastos e maior depósito de fibras colágenas. (Fig. 1C e 1D). Por outro lado, G_{ctrl7} apresentou maior angioneogênese.

Com o decorrer do tempo, o infiltrado inflamatório mononuclear mostrou uma tendência a redução, variando de intenso a discreto, com semelhante proporção de vasos sanguíneos, tanto em G_{ctrl14} , quanto em G_{exp14} . De forma semelhante à anterior, foi observada maior quantidade de fibroblastos e de fibras colágenas em G_{exp14} que em G_{ctrl14} (Fig. 1E e 1F).

O processo de reparo evoluiu para consolidação e ao término do período de 21 dias pós-ulceração, os infiltrados inflamatórios se apresentavam discretos ou inexistentes com semelhante proporção de vasos sanguíneos em G_{ctrl21} e G_{exp21} . Como poderia ser esperado, um visível aumento de fibroblastos e deposição de fibras colágenas mais organizadas e remodelação do tecido foi observado no G_{exp21} (Fig. 1G e 1H).

3.1.2 - Figura 1: Avaliação qualitativa da lesão

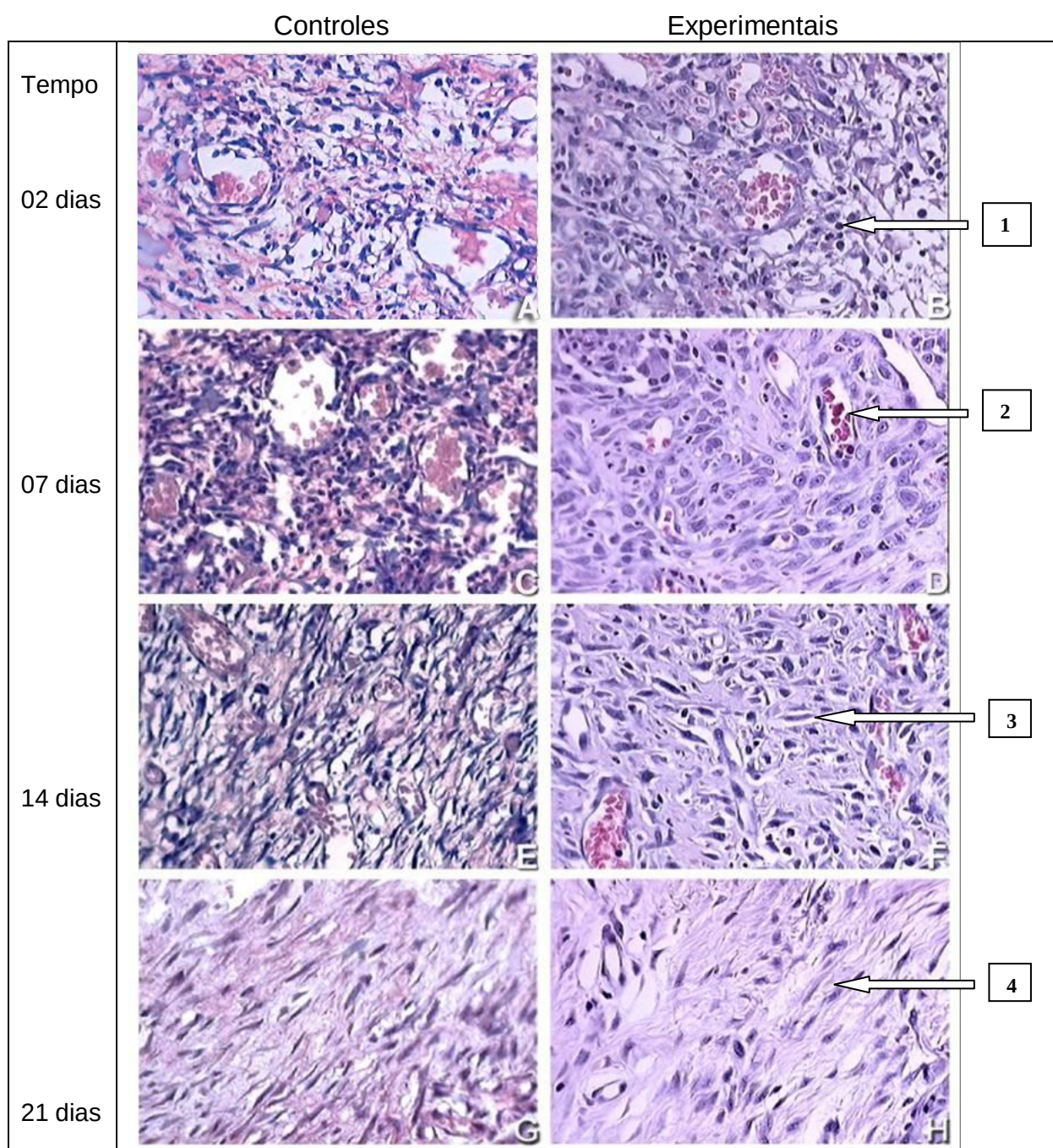


Figura 1: Fotomicrografia da área lesionada dos grupos experimental e controle nos períodos de 2, 7, 14 e 21 dias (magnificação 400×, HE), demonstrando evolução do processo ao longo do tempo.

Legenda:

- 1 – Células inflamatórias
- 2 – Vasos sanguíneos
- 3 – Fibroblastos
- 4 – Fibras colágenas

3.2 Análise quantitativa do conteúdo de colágeno

O teste de comparações múltiplas paramétricas de Games-Howell revelou uma maior quantidade de colágeno total no grupo experimental que no controle, tanto aos 14 dias ($1220,66 \pm 413,05 \mu\text{m}^2$ *versus* $218,83 \pm 77,25 \mu\text{m}^2$, $p=0,00296$), quanto aos 21 dias ($979,79 \pm 411,22 \mu\text{m}^2$ *versus* $143,41 \pm 26,58 \mu\text{m}^2$, $p=0,01835$) (Fig. 2).

Uma maior quantidade de colágeno imaturo foi verificada comparando G_{exp14} com G_{ctrl14} ($304,36 \pm 110,87 \mu\text{m}^2$ *versus* $72,88 \pm 23,03 \mu\text{m}^2$, $p = 0,00534$). Semelhança de comportamento também foi observada aos 21 dias pós-ulceração ($205,07 \pm 59,54 \mu\text{m}^2$ *versus* $59,53 \pm 14,86 \mu\text{m}^2$, $p = 0,09321$).

Maiores quantidades de colágeno maduro foram mensuradas nos grupos experimentais G_{exp14} ($916,30 \pm 308,35 \mu\text{m}^2$ *versus* $145,95 \pm 55,04 \mu\text{m}^2$, $p = 0,0343$) e G_{exp21} ($774,72 \pm 354,40 \mu\text{m}^2$ *versus* $83,88 \pm 14,30 \mu\text{m}^2$, $p = 0,01298$) em relação aos seus respectivos grupos-pares controles.

3.2.1 – Figura 2 – Avaliação quantitativa do conteúdo de colágeno pela técnica de Picrosírius Red

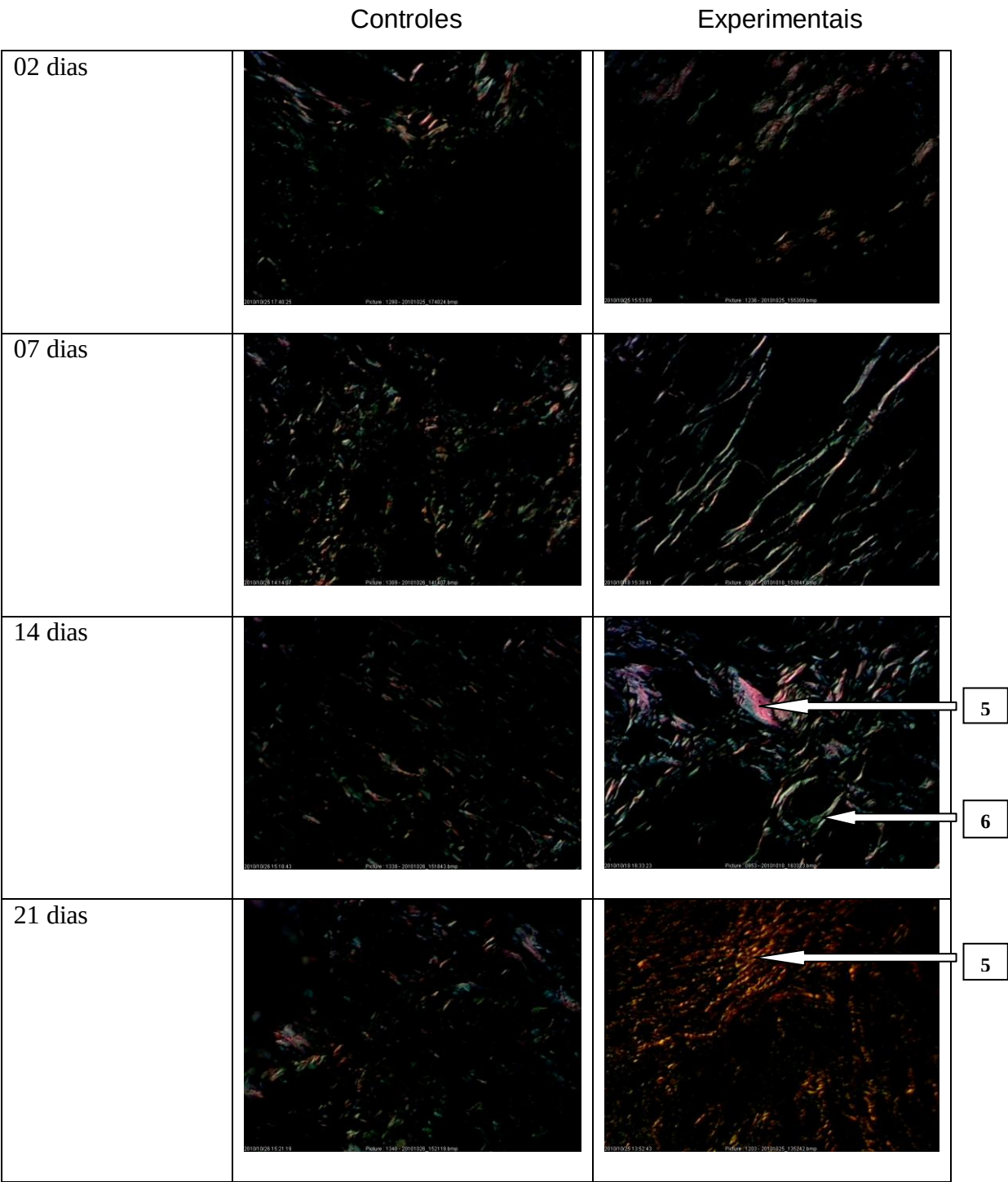


Figura 2: Fotomicrografia de lesão da língua de ratos dos grupos controle e experimental nos períodos de 2, 7, 14 e 21 dias (magnificação 400×, SR)

Legenda:
 5 – Colágeno maduro
 6 – Colágeno imaturo

4. Discussão

O *N. officinale* tem sido empregado com diferentes finalidades terapêuticas e dietéticas por vários grupos étnicos. Contudo, de nosso conhecimento, somente algumas comunidades rurais italianas têm o empregado empiricamente como promotor de reparo em estomatites, que apresentam características tipo-úlceras (Bullita et al., 2007). Como o *N. officinale* é uma planta de fácil aclimação, manejo agrícola e aceitação culinária, portanto de fácil acesso, mas com um potencial reparador latente, era imperioso que tal aplicabilidade fosse avaliada de maneira mais pormenorizada.

O processo de cicatrização de úlceras traumáticas bucais é bastante complexo, caracterizando-se pela remoção do tecido lesado com substituição do mesmo por tecido conjuntivo. O processo normal de reparo pode ser dividido em (1) fase inflamatória; (2) fase proliferativa de fibroblastos e vasos sanguíneos; e (3) fase de maturação e remodelação de colágeno (Mackay et al., 2003; Nayak et al., 2006; Jettanacheawchankit et al., 2009). Qualquer estratégia medicamentosa que antecipe ou que promova uma remodelação mais próxima da fisiológica certamente é desejável, pois colaboraria na redução do desconforto e dos riscos de infecção subsequentes.

Foi observado que a solução de *N. officinale* promoveu um aumento na população de fibroblastos com consequente elevação de deposição de colágeno antes dos sete dias pós-ulceração, e que se manteve constante ao longo do intervalo experimental. Ainda, o fitofármaco promoveu uma antecipação na taxa de substituição de colágeno imaturo (rico em fibras tipo III finas) por colágeno maduro (rico em fibras tipo I espessas) (Haukipuro et al., 1991; Kadler et al., 1996).

A maior deposição e a antecipação na transição dos tipos de colágeno

aceleram o processo de contração da ferida da úlcera (Irvin, 1985). Nesse contexto, os resultados aqui obtidos mostram que o *N. officinale* pode servir como um adjuvante terapêutico eficaz em termos de formação de tecido conjuntivo que suporte o reparo da injúria.

O mecanismo de ação da solução de *N. officinale*, aqui utilizada, que se aplica ao fenômeno de secreção e maturação de colágeno ainda está por ser determinado. Com base no proposto por Lim e Kim (2007) e por Fonseca et al. (2011), nosso grupo teoriza que flavonóides (expresso em rutina) devem inibir a atividade de metaloproteinase de matriz-1 (MMP-1) e/ou reduzir a expressão do gene *MMP-1*, o que incorreria em aumentos na taxa de colágeno total na região da úlcera.

Outra possível explicação deriva da proposição de Abu-Zinadah (2008) acerca da possibilidade de que o PEITC presente no *N. officinale* apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante, que levaria a uma ferida mais limpa, favorecendo o processo de reparo. Contudo, acreditamos que tal hipótese não deva ser a mais apropriada para explicar o fenômeno, visto que a retenção da solução no sítio ulcerado e a posologia empregada não favoreceram a permanência do PEITC no ponto de aplicação por intervalos de tempo suficientes para obtenção de efeito *time-kill*, contra uma população microbiana luxuriante.

Um ponto digno de destaque é o fato de que a solução de *N. officinale* não propriamente minimizou o evento inflamatório, pois os pares controle-experimental apresentaram mesmos graus de intensidade inflamatória ao longo do experimento. Tal achado mostra que o *N. officinale* não deve apresentar atividade antiinflamatória intrínseca, sendo desconsiderável seu emprego para esse fim. O emprego concomitante de outras plantas e/ou medicamentos alopáticos podem ser

considerados.

A angioneogênese, um fenômeno comum durante eventos inflamatórios, foi menos pronunciada no G_{exp7} . É possível que componentes do *N. officinale* tenham promovido uma precoce sobresecreção de colágeno de tal ordem que comprometeu o aparecimento de novos vasos. Essa dinâmica de eventos, em condições normais (i.e. nos controles), era esperada ocorrer acerca do 14º dia (Tonnesen et al., 2000). Contudo, o *N. officinale* deve ter antecipado a redução de vasos para o 7º dia. Uma vez mais, parece que os flavonóides (expresso em rutina) sejam os responsáveis pelo incremento relativo de colágeno, com consequente redução na densidade de vasos sanguíneos.

Embora observada uma membrana fibrinopurulenta em igual densidade nos controles e tratamentos (dado não-mostrado), não foi detectada a presença de células necróticas ou com qualquer outro indício deletério. Isso indica que a formulação empregada era segura e não implicava em efeitos locais indesejáveis.

Neste estudo, a posologia terapêutica experimental compreendeu somente uma administração diária da solução de *N. officinale*. É possível que um esquema posológico que envolva um maior número de aplicações ao dia possa interferir no tempo de cicatrização, com consequente encurtamento temporal. Ainda, a forma farmacêutica empregada (solução oral) talvez não tenha maximizado o efeito analisado, pois confere uma retenção no sítio ulcerado muito breve. A prática etnoveterinária de comunidades rurais italianas, no entanto, preconiza o uso de folhas cruas de *N. officinale* como coadjuvante no tratamento de afecções ulcerativas em bovinos com êxito (Bullita et al., 2007). Em se partindo da premissa de que a disponibilidade dos princípios ativos nas folhas *in natura* certamente seja menor que a do extrato aqui empregado para a formulação da solução oral, é

razoável supor que a maior concentração desses princípios na formulação leve a uma maior disponibilidade pontual.

Talvez uma formulação em orabase incremente a substantividade do fitofármaco com retenção mais prolongada do mesmo e consequente aumento de atividade reparadora. Por restringir a área de ação do fármaco e dificultar sua dispersão, uma apresentação em orabase, além de elevar o potencial reparador pontual, ainda poderia minimizar efeitos indesejados em outros tecidos e órgãos, bem como suplantir contra-indicações terapêuticas como úlceras estomacais e intestinais (Oliveira et al., 2010) e gestação (Canistro *et al.*, 2004). Estes pressupostos devem ser avaliados em estudos subsequentes que envolvam variações farmacotécnicas e posológicas.

Em suma, este estudo confirmou que a eficiência de se empregar o *N. officinale* como adjuvante no processo de reparação de úlceras bucais, há muito difundida entre comunidades rurais italianas, pôde ser comprovada por experimentação sob condições controladas. Como este estudo foi conduzido em ratos é imperativo que, para se verificar sua aplicabilidade em humanos ou em outros animais, investigações mais aprofundadas sejam levadas a termo.

Referências

- Abu-Zinadah AO. Effects of watercress oil on the thermal and chemical burn injuries in rabbits. *Journal of King Abdulaziz University Medical Sciences* 2008;15:3-17.
- Alonso FC, Jornet PL, Torres MJJ, Domingo AO. Analysis of the histopathological artifacts in punch biopsies of the normal oral mucosa. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirurgia Bucal* 2008;13:636-639.
- Bahramikia S, Yazdanparast R. Effect of hydroalcoholic extracts of *Nasturtium officinale* leaves on lipid profile in high-fat diet rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;115:116-121.
- Bullita S, Pilluza G, Viegi L. Plant resources used for traditional ethnoveterinary phytotherapy in Sardinia (Italy). *Genetic Resources and Crop Evolution* 2007; 54:1447-1464.
- Canistro D, Croce CD, Iori R, Barillari J, Bronzetti G, Poi G. Genetic and metabolic effects of gluconasturtiin, a glucosinolate derived from cruciferae. *Mutation Research* 2004;545:23-35.
- Carvalho JLS, Cunico MM, Dias JFG, Miguel MD, Miguel OG. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema soxhlet modificado. *Química Nova* 2009;32:1031-1035.
- Fonseca CME, Quirino MRS, Patrocínio MC, Anbinder AL. Effects of chamomilla recutita (L.) on oral wound healing in rats. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirurgia Bucal* –Ahead of print- Epub 2011.
- Halberstein RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology* 2005;15:686-699.
- Haukipuro K, Melkko J, Risteli L, Kairaluoma MI, Risteli J. Synthesis of type I collagen in healing wounds in humans. *Annals of Surgery* 1991;213:75-80.

Irvin TT. Wound healing. Archives of Emergency Medicine 1985;2:3-10.

Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. Journal of Pharmacological Sciences 2009;109:525-531.

Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. Biochemical Journal 1996;316:1-11.

Kosger HH, Ozturk M, Sokmen A, Bulut E, Ay S. Wound healing effects of Arnebia Densiflora root extracts on rat palatal mucosa. European Journal of Dentistry 2009; 3:96-99.

Lim H, Kim HP. Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids. Planta Médica 2007;73:1267-1274.

Mackay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. Alternative Medicine Review 2003;8:359-372.

Martinez Diaz- Canel AI, Garcia- Pola Vallejo MJ. Epidemiological study of oral mucosa pathology in patients of the Oviedo School of Stomatology. Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirurgia Bucal 2002;7:4-9,10-16.

Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. Cell Biology International 1996;20:15-27.

Nayak BS, Pereira LMP. *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. BMC Complementary and Alternative Medicine 2006; 6:41.

Oliveira CH, Mendes GD, Moreno RA, Abib EJr, De Nucci G. Clinical toxicology study of a herbal medicinal extract of *Aconitum napellus*, *Nasturtium officinale*, *Myroxylon*

balsamum, *Mikania glomerata*, *Cephaelis ipecacuanha* and *Polygala senega* (Melagrião®) in healthy volunteers. Annals of the National Medical Journal of India 2010;180:37-51.

Özen T. Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (watercress) leaf extracts. Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research 2009;66:187-193.

Rioobo- Crespo Mdel R, Planells-del Pozo P, Rioobo- Garcia R. Epidemiology of the most common oral mucosal diseases in children. Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirurgia Bucal 2005;10:376-387.

Tonnensen MG, Feng X, Clark AF. Angiogenesis in wound healing. JID Symposium Proceedings 2000;5:40-46.

Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelist R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. Journal of Ethnopharmacology 2003;89:221-244.

Vilela D, Mendes AM, Machado MAN, Okuyama SS, Lima AAS , Azevedo LR, Grégio AMT. Therapeutic effect of arnica ointment on cicatrization process of aphthas and lesions in human oral mucosa. Pharmacologyonline 2008;3:273-280.

2. Artigo em Inglês

1. Introduction

The most common mouth cavity lesions are the traumatic ulcers. The loss of the epithelium and the exposition of the subjacent conjunctive tissue characterizes the lesions, causing injury and discomfort (Martinez et al., 2002; Rioboo et al., 2005). Empirically, different population groups use plant extracts as auxiliaries on the traumatic ulcers healing process (Fonseca et al., 2011; Kosger et al., 2009; Vilela et al., 2008).

Searching for low cost and easy access herbal, which might induce or improve the repairing process, our group realized that *Nasturtium officinale* (common name “water cress”) has been applied for long by Italian rural communities for veterinarian purpose in stomatitis treatment (Bullita et al., 2007; Viegi et al., 2003). Besides that, *N. officinale* showed therapeutic potential to heal ulcer on chemical or heated induced rabbit skin (Abu-Zinadah, 2008).

N. officinale is a perennial herbal medicinal plant, and belong to the family of Cruciferae (Brassicaceae), it can be found in many countries and be traded as a fresh plant. It is eaten raw in salads, or can be cooked in soups. Moreover, it is also used in popular medicine in several countries as expectorant, hypoglycemic, stomach stimulating, and anti-hypertension (Bahamikia and Yazdanparast, 2008; Halberstein, 2005). It is also indicated to diabetes treatment, bronchitis, tuberculosis, asthma and scurvy (Özen, 2009).

In despite of its ethno botany and ethno veterinary importance, and how easy it is to obtain *N. officinale*, there are not any published studies that proof its efficiency to treat traumatic ulcer, which is very common in dentistry.

The object of this study was to evaluate the efficiency of *N. officinale* as adjuvant in the healing process on rat tongues.

2. Material and methods

2.1 Extract of *N. officinale* and oral solution

The vegetable material was collected in December, 2005, identified by Dr. Gert Hatschbach and registered at the Curitiba Botanical Museum (Brazil), under the number 248503. The material was pre-established in environmental conditions and established with forced ventilation to 45°C. The granulometric regulation was made in a knife grinder, with a sieve of 8mm.

A cotton blanket of 3cm tick was adapted over a porous Teflon plate, inside the Soxhlet extractor (Carvalho et al., 2009). 500 grams of vegetal material was added in the extractor, 1500 ml of 85% ethanol over the vegetal material, to wetting, for 30 minutes. It was added 1500 ml of 85% ethanol in a 3000 ml balloon attached to the extractor. After having connected the condenser on the extractor, it started the heating process to continuing extraction. After 5 hours of extraction, the balloon extract was concentrated to approximately 800 ml. The extract was transferred to the volumetric balloon and the volume was completed with 85% ethanol.

Each milliliter of the oral solution to be used in the study had 0,15 ml of extract of *N. officinale* and 0,85 ml of excipients (sodium benzoate, citric acid, sodium saccharin, sorbitol 70%, carboxymethylcellulose and purified water), 1,080 mg of feniletilglucosinolato (PEITC), 0,846 mg de flavonoids (in rutin) e 0,256 mg of phenylpropanoid (in chlorogenic acid). The extract of *N. officinale* was regulated within these three elements which are the oral solution markers.

2.2 Animals

To accomplish this study, the project was evaluated and approved by the Animal Use Ethnical Committee (CEUA-PUCPR – 445/2009). For that end, it was

used 64 male rats Wistar with age of 45-50 days and corporal mass of ca.200g. They were fed with pelletized ration Nuvilab[®] CR-1 (Nuvital Nutrientes Inc.) and water *ad libitum*, with clear-dark cycles of 12 hours and environmental temperature (25±1 °C).

2.3 Inducing the ulcers

The rats were anesthetized with sodium thiopental (30 mg/kg) via intraperitoneal before the mechanical inducing in the very middle of the top of the tongue, through a punch of 0,5 mm. The technique consists in rotating and pressing movements with the tool over the area to be removed, it has to be deepen until one realizes some resistance (Alonso et al., 2008). During the following three days of the act of inducing ulcers, the animals were treated with mepiridina (2 mg/kg; via intraperitoneal) to reduce pain in order to facilitate feeding.

2.4 Experimental treatment

Soon after the ulcer mechanical inducing, the rats were organized in eight groups of eight species. Four groups acted like controls (G_{ctrl2} , G_{ctrl7} , G_{ctrl14} , G_{ctrl21}) and received topical application of sterilized saline solution only once a day, always at the same time. The other four groups (G_{exp2} , G_{exp7} , G_{exp14} e G_{exp21}) received daily aliquot of oral solution (50 μ L) of *N. officinale* on the ulcers for 2, 7, 14, and 21 days, respectively. The animals in each pair of experimental-control-groups died by overdose of sodium thiopental (120 mg/kg) via intraperitoneal and intracardiac, after the mentioned periods.

2.5 Processing and Histological analysis

After the death of each pair of experimental-control-groups, the tongues were removed with a blade of scalpel 12 and conditioned in universal collectors with

buffered formalin 10%. The tongues placed on formalin were organized in blocks with paraffin and the areas with ulcers were divided up to 5 µm thick, according to standard technique.

The cuts were diaphanized and by hematoxilina-eosina (HE) and *picrosirius red* (SR)(Alonso et al., 2008).

The cuts by HE were evaluated qualitatively in optical microscope Olympus® Medusa BX-40 with magnification of 400x, by two independent observers. The variable intensity of inflammation, content of collagen and angioneogênese were all evaluated.

The cuts colored by SR were evaluated in microscope Olympus® BX-50 with polarized lens Olympus® U-Pot and micro camera Dinolite® with magnification of 400x, by only one observer, to determine the presence of mature and immature collagen on the area of lesion. The mature lesion presents an orange-red color, while the immature is yellow-green (Montes, 1996). To aim analysis and statistics, the images of four areas were randomly btained. The images were analyzed in the program of morphometry Image Proplus™ 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD), which supplied the mature and immature collagen area, expressed in squared micrometers. The final values were determined from the average of the four areas.

2.6 Statistical analysis

It was used the statistical package SPSS® 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.), the significant level adopted was 5% ($p < 0,05$). The normality Kolmogorov-Smirnov test was done, in which it was realized that only two of the eight treatments did not show normal distribution, we opted for ANOVA- two way. The variance homogeneity test of Levene revealed that the variance was heterogeneous, being opted by the

parametrical multiple comparison test of Games-Howell.

3. Results

3.1 Qualitative analysis

Two days after the mechanical ulcer, the control group as well as the experimental group, showed the same characteristics of intense polymorphonuclear inflamed filtered, similar amount of collagens fibers and few neo formed blood vases (fig. 1A and 1B).

Seven days have passed after the induction of ulcers and the inflamed filtered polymorph nuclear and mononuclear showed itself invariable in the experimental-control pair. The filtered was moderate or intense in both groups. However, in G_{exp7} it was observed a bigger number of fibroblasts and bigger concentration of collagen fibers (fig. 1C and 1D). On the other hand, G_{ctrl7} showed bigger angiogenesis.

As time went by, the mononuclear inflamed filtered showed tendency of reduction, varying from intense to discreet, with similar proportion of blood vases, in both G_{ctrl14} and G_{exp14} . Similarly to the previous one, it was realized a bigger amount of fibroblasts and of collagen fibers in G_{exp14} than G_{ctrl14} (fig. 1E and 1F).

The healing process evolved to consolidation and, at the end of period of 21 days post ulceration, the inflamed infiltrated showed themselves discreet or inexistent with similar proportion of blood vases in G_{ctrl21} and G_{exp21} . As expected, it was realized a visible increasing of fibroblasts and deposition of better organized collagen fibers and remodeling of the tissue in G_{exp21} (fig. 1G and 1H).

3.1.2 – Figure 1 - Lesion qualitative valuation

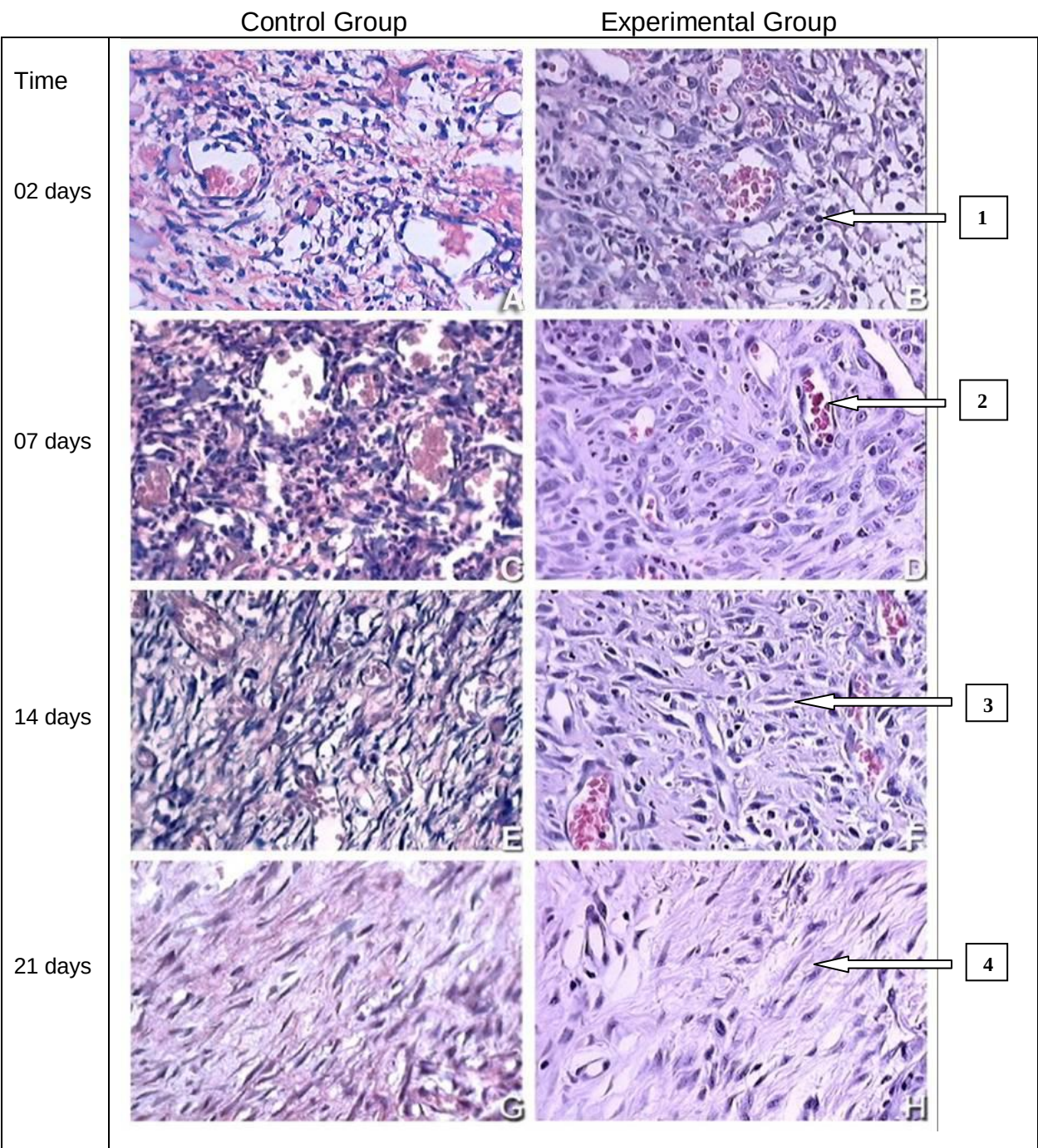


Figure 1: Photomicrography of the injured area of experimental groups and control in the periods of 2, 7, 14 and 21 days (magnification 400×, HE), showing evolution of the process along the period.

Label:

- 1- Inflammatory cells
- 2- Blood vase
- 3- Fibroblasts
- 4- Collagen fibers

3.2 Quantitative analysis of the collagen content

The parametrical multiple comparison test of Games-Howell revealed a bigger

amount of total collagen in the experimental group than in the control group, in the 14 days ($1220,66 \pm 413,05 \mu\text{m}^2$ *versus* $218,83 \pm 77,25 \mu\text{m}^2$, $p=0,00296$), as well as the 21 days ($979,79 \pm 411,22 \mu\text{m}^2$ *versus* $143,41 \pm 26,58 \mu\text{m}^2$, $p=0,01835$) (fig. 2).

A greater amount of immature collagen was verified comparing G_{exp14} with G_{ctrl14} ($304,36 \pm 110,87 \mu\text{m}^2$ *versus* $72,88 \pm 23,03 \mu\text{m}^2$, $p = 0,00534$). It was also observed similarity of behavior after 21 days post ulceration ($205,07 \pm 59,54 \mu\text{m}^2$ *versus* $59,53 \pm 14,86 \mu\text{m}^2$, $p = 0,09321$).

Bigger amount of mature collagens were measured in the experimental groups G_{exp14} ($916,30 \pm 308,35 \mu\text{m}^2$ *versus* $145,95 \pm 55,04 \mu\text{m}^2$, $p = 0,0343$) and G_{exp21} ($774,72 \pm 354,40 \mu\text{m}^2$ *versus* $83,88 \pm 14,30 \mu\text{m}^2$, $p = 0,01298$) in relation to their respective pair-group controls.

3.2.1 – Figure 2 – Collagen quantitative valuation by *Picrosirius Red* Technique

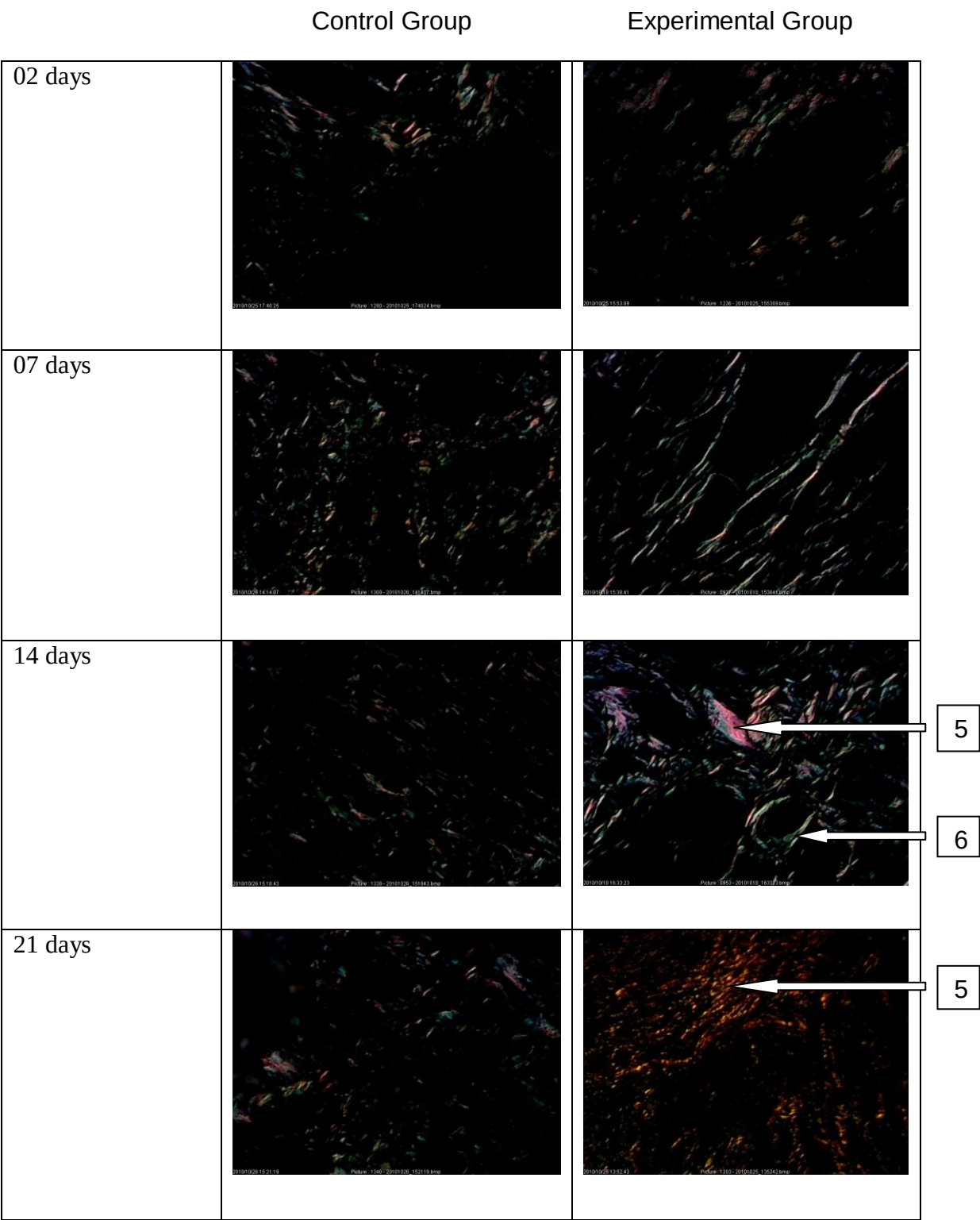


Figure 2: Photomicrography of injury on rat tongues from groups control and experimental in the periods of 2, 7, 14 and 21 days (magnification 400×, SR).
Label:
5-Mature collagen
6-Immature collagen

4. Discussion

N. officinale has been applied to different therapeutic and diet ends by several ethnical groups. However, to our knowledge, only some Italian rural communities has been applied it empirically as a repairing promoter in stomatitis, which shows ulcer type characteristics (Bullita et al., 2007). As *N. officinale* is a plant easily adapted to different climates, easy to be looked after and to be handled in cookery, therefore accessible, but with a latent potential healing, it was imperative that such applicability were evaluated in a detailed way.

The mouth traumatic ulcer healing process is very complex, being characterized by taking out the conned tissue, being the same replaced by a **conjunctive** tissue. The standard healing process can be divided in (1) inflamed stage; (2) proliferative stage of fibroblasts and blood vase; and (3) maturing stage and collagen remodeling (Mackay et al., 2003; Nayak et al., 2006; Jettanacheawchankit et al., 2009). Any medicinal strategy which anticipate or promote a closer remodeling to the physiological one is certainly desirable, because it would collaborate to reduce the discomfort and risk of later infection.

It was observed that the solution of *N. officinale* promoted an increase of fibroblasts with a consequent lift of deposition of collagen before the seven day of post ulceration, and it remained constant throughout the experimental interval. Still, the phytochemical promoted an anticipation on the substitution rate of immature collagen (rich in fibers, type III thin) for mature collagen (rich in fiber, type I thick) (Haukipuro et al., 1991; Kadler et al., 1996).

The greater deposition and anticipation in the transition of types of collagen accelerate the healing process of the ulcer (Irvin, 1985). In the context, the results obtained show that the *N. officinale* can be useful as an efficient therapeutic adjuvant

in terms of formation of conjunctive tissue which sustains the repair of injury.

The action mechanism of *N. officinale* solution used, which is applied to the secretion and collagen maturation phenomenon is to be determined. Based on the proposal made by Lim and Kim (2007) and by Fonseca et al., (2011), our group hold the theory that flavonoids (expressed in rutin) should inhibit the activities of metalloproteinase of matrix-1 (MMP-1) and/or reduce the expression of gene MMP-1, that would involve in increasing of total collagen rate on the ulcer area.

Another possible explanation stems from Abu-Zinadah's proposition (2008) about the possibility that the PEITC found in *N. officinale* presents antimicrobial and antioxidant activities, that would lead to a cleaner wound, favoring the healing process. Although we believe that such hypothesis may not be the most appropriate to explain the phenomenon, seen that the retention of solution on the ulcer area and posology applied do not favor the permanency of PEITC on the point of application, for enough time intervals to obtain the time-kill effect, against a full microbial population.

A worthy point is the fact that the solution of *N. officinale* does not properly minimize the inflamed event, because the experimental- control pair showed the same degrees of inflaming intensity along the experience. Such finding shows that *N. officinale* should not present intrinsic anti-inflammatory activity, being its use inconsiderable for such an end. The concomitant use of other allopathic plants and/or medicines can be considered.

The angiogenesis, an ordinary phenomenon during inflammatory events, was less pronounced in G_{exp7}. It is possible that components of *N. officinale* had promoted a precocious secretion of collagen in such way that it implicated the rising of new vessels. That dynamic of events, in normal conditions (i.e. in the

controls), was expected to occur about the 14th day (Tonnesen et al., 2000). Still, *N. officinale*, might have anticipate the reduction of vases to the 7th day. Once more, it seems that flavonoids (expressed in rutin) might be the responsible for relative collagen increment, with a consequently reduction in the blood vase density.

Although a fibrinopurulent membrane was noticed in equal density in the controls and treatments (data not showed), it was not detected the presence of necrotic cells or with any other poisonous evidence. It shows that the formulation applied was safe and did not implied on undesirable local effects.

This study, the experimental therapeutic posology comprised only a daily ministração of *N. officinale* solution. It is possible that a dosage scheme which involves a greater number of daily applications might interfere on the healing time, with a consequent temporal shortening. Moreover, the pharmaceutical way used (oral solution) might have not maximized the effect analyzed, for it confers a very brief retention on the ulcerate area. The ethno veterinary practice of Italian rural communities, however, press for the use of raw leaves of *N. officinale* as co-adjuvant in ulcerative affections treatment on cattle successfully (Bullita et al., 2007). From the premise that the availability of the active principles in the leaves *in natura* might certainly be smaller than the one in the extract applied here to formulation of oral solution, it is reasonable to assume that the biggest concentration of these principles in the formulation leads to a greater punctual availability.

Maybe a formulation in orabase increment the substantivity of phytochemical with a longer retention of the same and consequent increase of repairing activity. By narrowing the action area of the phytochemical and hamper its dispersion, an orabase presentation, besides raising the punctual repairing potential, it could also minimize undesirable effects on other tissues and organs, as well as supplant

therapeutic contraindications as stomachic and intestinal ulcers (Oliveira et al., 2010) and pregnancy (Canistro *et al.*, 2004). Such assumptions should be evaluated in following studies which cover dosage pharmacotechnic variations.

To sum up, this study confirmed that the efficiency of using the *N. officinale* as adjuvant in mouth ulcer repairing process, for long disseminated among Italian rural communities, could be proved by experimentation under controlled conditions. As the study was conducted on rats, it is imperative that, to verify its applicability in humans or in other animals, deeper researches should be taken.

References

Abu-Zinadah AO. Effects of watercress oil on the thermal and chemical burn injuries in rabbits. *Journal of King Abdulaziz University Medical Sciences* 2008; 15:3-17.

Alonso FC, Jornet PL, Torres MJJ, Domingo AO. Analysis of the histopathological artifacts in punch biopsies of the normal oral mucosa. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirurgia Bucal* 2008;13:636-639.

Bahramikia S, Yazdanparast R. Effect of hydroalcoholic extracts of *Nasturtium officinale* leaves on lipid profile in high-fat diet rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;115:116-121.

Bullita S, Pilluza G, Viegi L. Plant resources used for traditional ethnoveterinary phytotherapy in Sardinia (Italy). *Genetic Resources and Crop Evolution* 2007; 54:1447-1464.

Canistro D, Croce CD, Iori R, Barillari J, Bronzetti G, Poi G. Genetic and metabolic effects of gluconasturtiin, a glucosinolate derived from cruciferae. *Mutation Research* 2004;545:23-35.

Carvalho JLS, Cunico MM, Dias JFG, Miguel MD, Miguel OG. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema soxhlet modificado. *Química Nova* 2009;32:1031-1035.

Fonseca CME, Quirino MRS, Patrocínio MC, Anbinder AL. Effects of chamomilla recutita (L.) on oral wound healing in rats. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirurgia Bucal –Ahead of print- Epub* 2011.

Halberstein RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology* 2005;15:686-699.

Haukipuro K, Melkko J, Risteli L, Kairaluoma MI, Risteli J. Synthesis of type I collagen in healing wounds in humans. *Annals of Surgery* 1991;213:75-80.

Irvin TT. Wound healing. *Archives of Emergency Medicine* 1985;2:3-10.

Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *Journal of Pharmacological Sciences* 2009;109:525-531.

Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochemical Journal* 1996;316:1-11.

Kosger HH, Ozturk M, Sokmen A, Bulut E, Ay S. Wound healing effects of *Arnebia Densiflora* root extracts on rat palatal mucosa. *European Journal of Dentistry* 2009; 3:96-99.

Lim H, Kim HP. Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids. *Planta Médica* 2007;73:1267-1274.

Mackay D, Miller AL. Nutritional support for wound healing. *Alternative Medicine Review* 2003;8:359-372.

Martinez Diaz- Canel AI, Garcia- Pola Vallejo MJ. Epidemiological study of oral mucosa pathology in patients of the Oviedo School of Stomatology. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal* 2002;7:4-9,10-16.

Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International* 1996;20:15-27.

Nayak BS, Pereira LMP. *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6:41.

Oliveira CH, Mendes GD, Moreno RA, Abib EJr, De Nucci G. Clinical toxicology study of a herbal medicinal extract of *Aconitum napellus*, *Nasturtium officinale*, *Myroxylon balsamum*, *Mikania glomerata*, *Cephaelis ipecacuanha* and *Polygala senega*

(Melagrião[®]) in healthy volunteers. Annals of the National Medical Journal of India 2010;180:37-51.

Özen T. Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (watercress) leaf extracts. Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research 2009;66:187-193.

Rioobo- Crespo Mdel R, Planells-del Pozo P, Rioobo- Garcia R. Epidemiology of the most common oral mucosal diseases in children. Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirurgia Bucal 2005;10:376-387.

Tonnensen MG, Feng X, Clark AF. Angiogenesis in wound healing. JID Symposium Proceedings 2000;5:40-46.

Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelist R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. Journal of Ethnopharmacology 2003;89:221-244.

Vilela D, Mendes AM, Machado MAN, Okuyama SS, Lima AAS, Azevedo LR, Grégio AMT. Therapeutic effect of arnica ointment on cicatrization process of aphthas and lesions in human oral mucosa. Pharmacologyonline 2008;3:273-280.

3. Anexos

Anexo A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro do projeto no CEUA: 445

Data do parecer: 22/06/2009

Título do Projeto:

Efeito do extrato de agrião (*Nasturtium Officinale*) sobre lesões ulceradas da mucosa oral de ratos. Análise imunohistoquímica e histopatológica

Pesquisador responsável:

Ana Maria Trindade Gregio

Equipe da pesquisa:

Patrícia Vida Cassi Bettega

Instituição:

PUCPR

Categoria do Experimento – C

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Rattus norvegicus albinus</i>	Machos	Após o desmame, 200g	64

O colegiado do CEUA em reunião no dia 18/06/2009, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao senhor pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

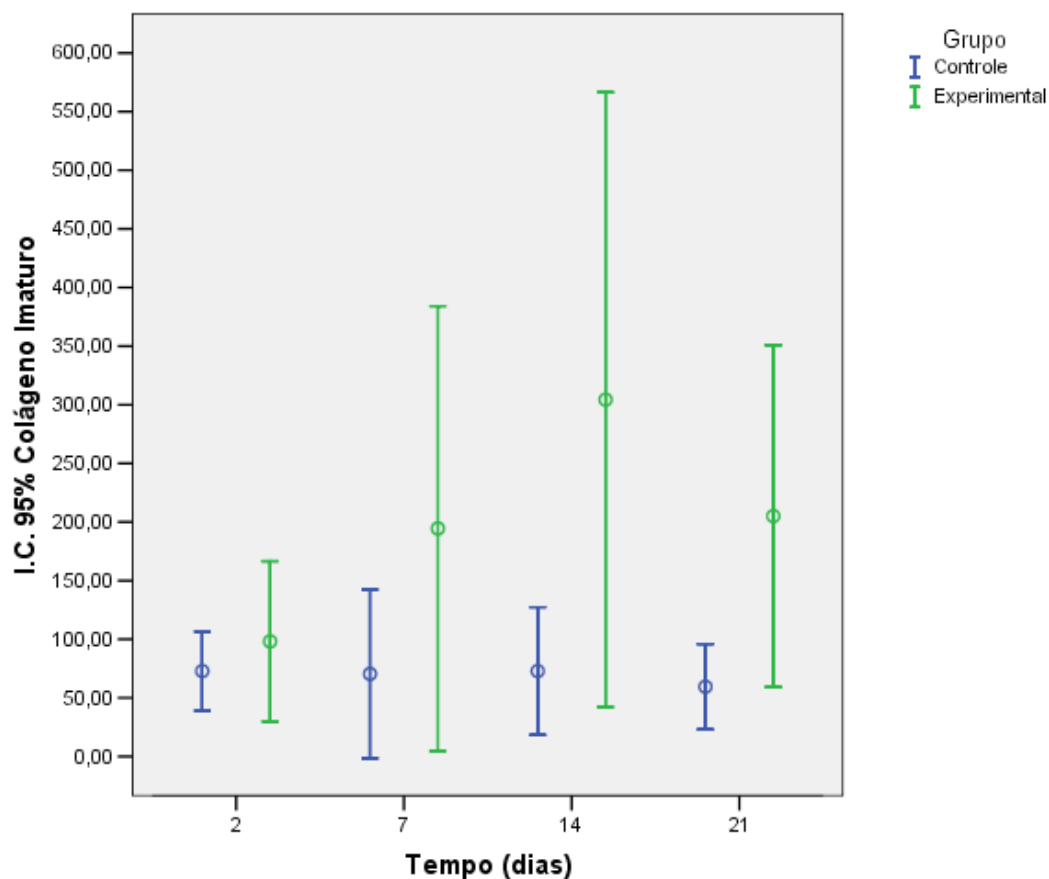
Curitiba, 22 de junho de 2009.

Atenciosamente

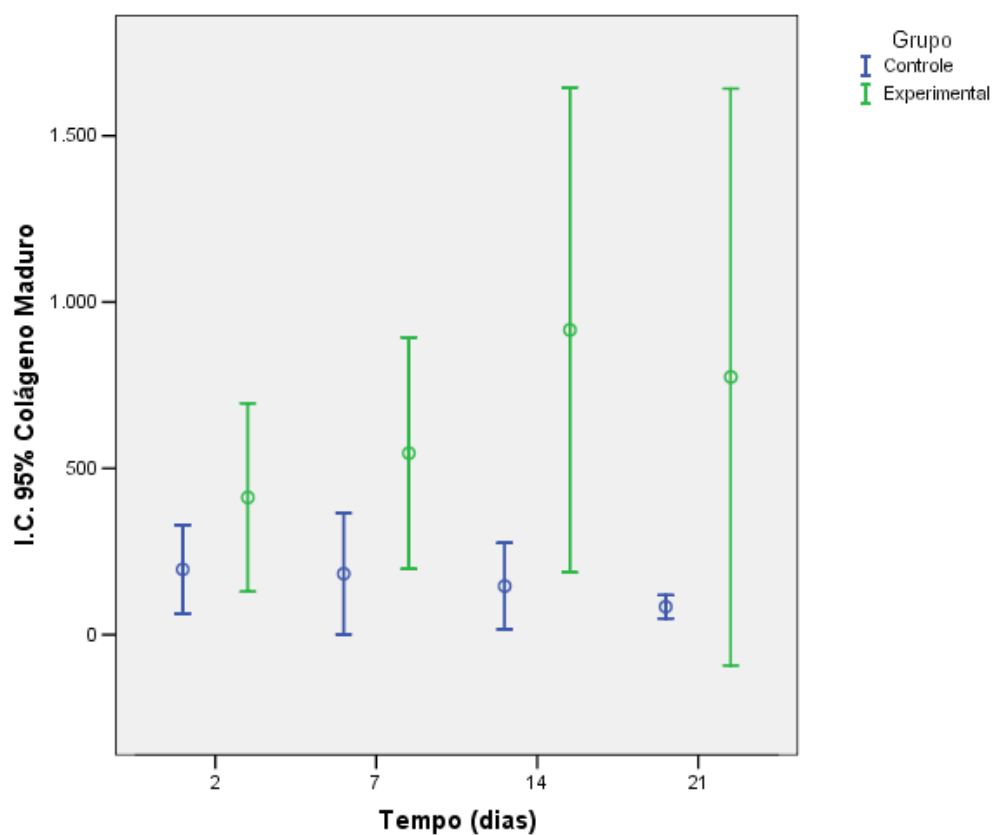

Profa. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Coordenadora do CEUA
PUC PR



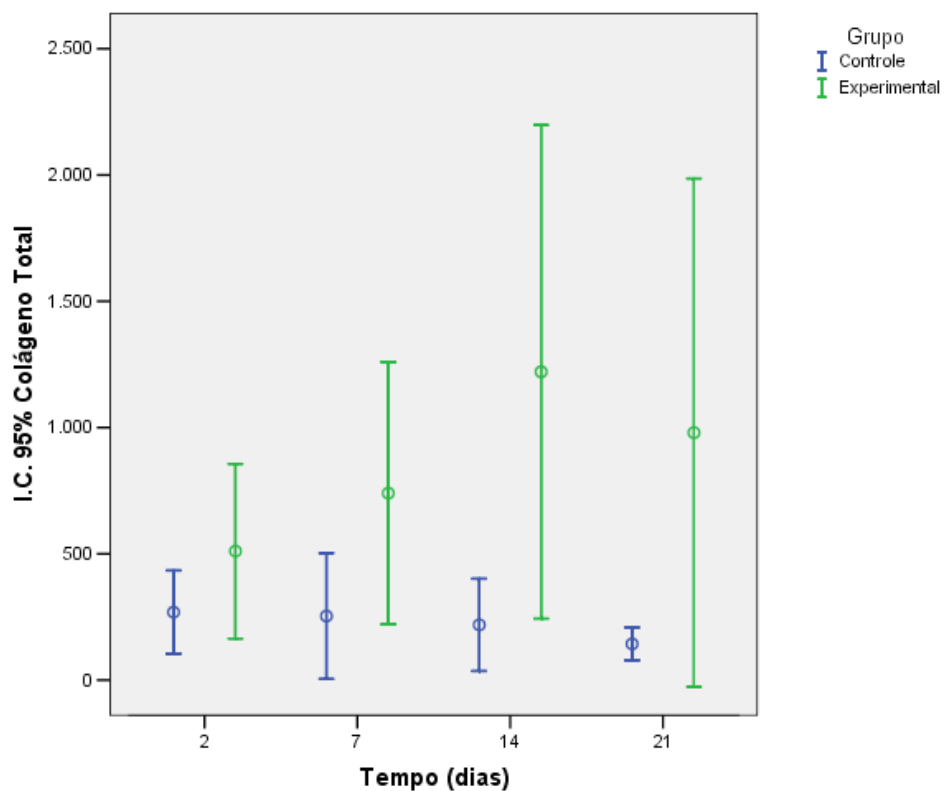
Anexo B - Análise estatística – Gráficos



Graf. 1 – Mostra média e desvio padrão dos valores quantitativos de colágeno imaturo (em micrômetros quadrados) relacionados ao tempo de tratamento (2, 7, 14 e 21 dias), nos grupos controles e experimentais.



Graf. 2 – Mostra média e desvio padrão dos valores quantitativos de colágeno maduro (em micrômetros quadrados) relacionados ao tempo de tratamento (2, 7, 14 e 21 dias), nos grupos controles e experimentais.



Graf. 3 – Mostra média e desvio padrão dos valores quantitativos de colágeno total (em micrômetros quadrados) relacionados ao tempo de tratamento (2, 7, 14 e 21 dias), nos grupos controles e experimentais.

ANEXO C – NORMAS DA REVISTA (Journal of Ethnopharmacology)

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

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

Theory/calculation

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

AUTHOR INFORMATION PACK 31 Jan 2011 www.elsevier.com/locate/jethpharm 8

Glossary

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

Appendices

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

Essential title page information

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

Abstract

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

The author should divide the abstract with the headings *Ethnopharmacological relevance*, *Materials and Methods*, *Results*, and *Conclusions*.

Graphical abstract

Authors must supply a graphical abstract for all types of articles at the time the paper is first submitted.

The graphic should summarize the contents of the paper in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership and for compilation of databases. Carefully drawn figures that serve to illustrate the theme of the paper are desired. The dimensions of the graphical abstract are: 5 cm by 17 cm and 200 x 500 pixels. Authors must supply the graphic separately as an electronic file. For an example of a graphical abstract please [click here](#).

Keywords

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

Acknowledgements

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

Math formulae

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

AUTHOR INFORMATION PACK 31 Jan 2011 www.elsevier.com/locate/jethpharm 9

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

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

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

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

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

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

Color artwork

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

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

Figure captions

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

AUTHOR INFORMATION PACK 31 Jan 2011 www.elsevier.com/locate/jethpharm 10

Tables

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

References

Citation in text

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

"Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article

and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

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

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