

MÔNICA AIDAR MENON MIYAKE

**Efeitos da infusão de *Luffa operculata* sobre o epitélio e a
atividade mucociliar do palato isolado de rã**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Ossamu Butugan

SÃO PAULO

2004

"Oh! Imensa é a graça poderosa que reside nas ervas e em suas raras qualidades, porque na terra não existe nada tão vil que não preste à terra algum benefício especial. Dentro do terno cálice da débil flor, residem o veneno e o poder medicinal..."

Romeu e Julieta, Ato II, Cena III - William Shakespeare, 1564 - 1616

Dedicatória

Michelle e Marcel

Meus filhos queridos, alegria da minha vida,
ensinam-me a cada dia o significado do amor irrestrito, ilimitado, pleno,
infinito.

Suraia,

Exemplo de mãe, de mulher, de coragem, de sabedoria, de amor.

Que saudade...

Por tantas razões você não terminou sua tese. Então, esta é por nós duas.

Ao meu pai, **Antonio Douglas Menon**, o melhor exemplo de seriedade, dignidade e profissionalismo, com sua experiência e sabedoria, e cujos passos jamais hesitei em seguir. Obrigada por todo o apoio durante a elaboração deste trabalho.

A meu marido, **Massato Miyake**, amigo e companheiro de todas as horas nos últimos 19 anos. Obrigada por nossos filhos, que têm o privilégio de contar com um pai maravilhoso e presente como você.

Agradecimentos

Ao querido mestre Prof. Dr. Aroldo Miniti, cujo entusiasmo e energia são a luz e o grande estímulo a todos que convivemos no Departamento.

Ao Prof. Dr. Ossamu Butugan, por sua imensa bondade, paciência ilimitada e seu carinho paterno, agradecemos em nome de todos os colegas que o Senhor tem formado ao longo dos anos. Foi uma alegria - e um privilégio - poder contar com a sua orientação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, dinâmico e empreendedor, que tem dado à Otorrinolaringologia um toque de modernidade.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, professor, exemplo, amigo, oráculo dos alunos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Nossa gratidão por sua generosidade, dedicação e entusiasmo ao dividir seus conhecimentos, pelo seu amor incondicional a esta Instituição essencial ao País.

Ao Prof. Dr. Richard L. Voegels, amigo com quem sempre se pode contar, profissional que respeitamos cada vez mais, o agradecimento pela boa vontade e gentileza inesgotáveis, e pela inestimável orientação técnica.

Ao Dr. João Ferreira de Mello Júnior, amigo que muito admiramos, assertivo, inteligente e sempre paciente. Agradecemos pelo seu precioso tempo dispendido com tantas solicitações e aconselhamentos, pelas palavras amigas e elogiosas que sempre tivemos como um grande estímulo.

À bióloga Regiani Carvalho de Oliveira, símbolo da pesquisadora brasileira com seu conhecimento, sua dedicação e sua arte para superar tantos obstáculos. Agradecemos imensamente pelos conhecimentos transmitidos no laboratório e pela autoconfiança que nos inculuiu na execução da pesquisa.

À Dra. Aracy P. S. Balbani, amiga sincera e dedicada, generosa pela idéia original do trabalho e pela preciosa ajuda na bibliografia. O agradecimento por sua disponibilidade e carinho fraterno.

À Dra. Renata C. di Francesco e Dr. Olavo G. Mion, amigos e companheiros de viagens, por sua vivacidade, disponibilidade e simpatia.

Aos colegas Prof. Dr. Milton de Arruda Martins, Dr. Geraldo Lorenzi Filho, Dra. Elnara Márcia Negri, pela atenção, entusiasmo e apoio constante à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edigar R. de Almeida, Dr Gilberto G. S. Formigoni e Dra. Signe S. Grasel, pelo incentivo e idéias que enriqueceram o trabalho.

Ao Dr. Luiz Antonio Costa (Curitiba - PR), fitoterapeuta seriíssimo, autodidata com quem muito aprendemos, agradecemos o interesse, o estímulo e a primeira bibliografia enviada sobre a *Luffa operculata*.

Ao Dr. João Ximenes (Fortaleza - CE), que se demoveu de seu trabalho para prospectar e remeter as preciosas teses da Universidade Federal do Ceará. Toda a nossa gratidão por seu empenho e desprendimento.

Ao Dr. Paulo Roberto A. Roncada, por ter-nos presenteado com sua tese e apoio irrestrito.

Ao Dr. José Roberto Lazzarini Neves, amigo que dividiu sem reservas seus profundos conhecimentos sobre fitomedicina, dirimindo nossas dúvidas infundáveis sobre plantas medicinais.

A Dra. Ceci, Dr. Chanel, Dra. Henriqueta, Dr. Dagoberto, Dr. Eduardo, da Associação Médica Brasileira de Fitomedicina (SOBRAFITO), que nos mostraram o futuro científico e promissor das plantas medicinais brasileiras.

Ao Dr. Aldo Stamm, amigo e chefe, ao Dr. Antoninho Arnone, diretor clínico; aos colegas médicos do Hospital Prof. Edmundo Vasconcelos: Shirley, André, Luís Antonio, Yara, Elcicler, Cleonice, Paulo, Levon, Moacyr, Fernando, Iulo, Hugo, às fonoaudiólogas Regina, Laís, Dagmar, Larissa e Lilian; às funcionárias Sueli, Julieta, Joana. Nossa gratidão pelo apoio constante e interesse que sempre foram um suporte à conclusão deste trabalho.

Ao Rick, que adora os Beatles; ao Victor, que adora ler; ao Fefê, que adora um bife; ao Bruno, que adora a Elis; aos meus sobrinhos queridos que, por tudo isto e muito mais, são um pouquinho meus filhos também.

A Regina e Rosana, minhas irmãs queridas, cúmplices de todos os momentos alegres e difíceis; a meus cunhados Walton e Pedro. Que a união da família seja a base para nossos filhos construírem um mundo mais solidário e fraterno.

Aos meus avós, Luiza e Antonio, Nídia e Jorge, pessoas sábias, lutadoras, imigrantes. Quanto orgulho, quanta saudade.

À minha sogra D. Júlia, e também a Midori, Yukiko e Seiko, agradeço pela presença amiga e pelo carinho com meus filhos durante meus períodos de estudo.

À minha madrinha Sálua (Tata), a meus padrinhos Sérgio e Cristina, tão importantes na minha vida, no estímulo e na procura de novos desafios.

À oceanógrafa Elizabeth Aidar, minha prima saudosa; e a Antonio Malavazzi, meu rigorosíssimo professor de biologia; meu agradecimento a vocês que me ensinaram a gostar das ciências biológicas, - e aqui as utilizei quase todas.

Aos colegas da Pós-Graduação: Mariana, Daniela, Rodrigo, Patrícia, Ítalo, Nilvano, Washington, Syriaco, Cláudio, Josiane, Carlos, Alexandre, Adriana, Christiano, Maria Elisa, Rafael, Michel, Márcia Kii, Márcia Murao, Marconi, Liscia, Fabrizio, Elder, Cecil, Newton, Marzo pelos momentos de descontração e amizade que tornaram tão agradável nossa convivência.

Às caríssimas amigas: Beth, Estelita, Prassede, Denise Burkhard, Rosângela, Egle, Vivian, Denise Nahas, Marly, Alice, Glaura e Stela. Assim como as estrelas, mesmo com o céu encoberto pelas nuvens elas estão sempre lá.

Às secretárias e funcionários da Disciplina de Otorrinolaringologia e da Pós-Graduação: Márcia, Lucy, Bárbara, Marilede, Edzira, Ofélia e Jorge. Jamais esqueceremos sua presteza, eficiência e simpatia de sempre.

Aos biólogos e funcionários do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental e da Patologia (LIM-5): Mariângela, Naomi, Eliane Gazetto, Débora, Heloísa, Dalva, Márcia, Dolores, Ana Júlia, Nildo, Emília, Sandra, Marisa, Thaís, Eliane Tigre, David, Rosa, Alessandra, Rui, Cláudia, D. Severina e Ana Lúcia, pela simpatia de sempre e acolhida calorosa.

Aos biólogos e técnicos do Laboratório de Biologia Celular (LIM 59): Marcelo, Maria Margarida, Hélio, Maria Cecília, Miriam Regina, Maria do Rosário, Ivone e à Profa. Elia Caldine, pela colaboração e dedicação a esta tese.

Às funcionárias do Laboratório de Imuno-histoquímica: Esmeralda, Sandra, Ângela e Ana Lúcia, por sua simpatia e interesse no andamento deste trabalho.

Às secretárias do Departamento de Patologia, Maria Eli e Lenira, por seu atendimento prestimoso e intermediação efetiva sempre que necessário.

Às funcionárias Lucimara, Sandra e Eliana, sem cuja dedicação seria impossível concluir esta tese.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

Lista de Abreviaturas

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
1.1. Objetivos	5
<u>2. REVISÃO DE LITERATURA</u>	6
<u>2.1. <i>Luffa operculata</i></u>	6
<u>2.1.1. Aspectos gerais</u>	6
<u>2.1.2. Utilização farmacológica popular</u>	8
<u>2.1.3. Bioquímica</u>	10
<u>2.1.4. Farmacologia e toxicologia</u>	11
<u>2.1.5. Estudos experimentais e clínicos</u>	13
<u>2.1.6. <i>Luffa cylindrica</i></u>	15
<u>2.2. Transporte mucociliar</u>	17
<u>2.2.1. Introdução</u>	17
<u>2.2.2. Função de barreira</u>	19
<u>2.2.3. Mecanismos celulares de transporte iônico</u>	21
<u>2.3. Métodos de Avaliação</u>	23
<u>2.3.1. Modelo do palato isolado de rã</u>	23
<u>2.3.2. Velocidade de transporte mucociliar (VTM)</u>	23
<u>2.3.3. Freqüência de batimento ciliar (FBC)</u>	24
<u>2.3.4. Diferença de potencial transepitelial (DPT)</u>	25
<u>3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	26
<u>3.1. Material</u>	26
<u>3.1.1. Preparo do palato isolado de rã</u>	28
<u>3.1.2. Preparo da infusão de <i>Luffa operculata</i></u>	28
<u>3.2. Desenvolvimento do Experimento</u>	30
<u>3.2.1. Velocidade de transporte mucociliar (VTM)</u>	31
<u>3.2.2. Freqüência de batimento ciliar (FBC)</u>	32
<u>3.2.3. Diferença de potencial transepitelial (DPT)</u>	34
<u>3.2.4. Estudo histológico do palato de rã</u>	35
3.3. Análise estatística	36

4. RESULTADOS	37
4.1. Velocidade de transporte mucociliar (VTM).....	38
4.2. Freqüência de batimento ciliar (FBC).....	39
4.3. Diferença de potencial transepitelial (DPT).....	41
4.4. Estudo histológico do palato de rã.....	43
<u>5. DISCUSSÃO</u>	50
<u>5.1. <i>Luffa operculata</i></u>	51
<u>5.2. Modelo experimental do palato de rã</u>	53
<u>5.3. Velocidade de transporte mucociliar (VTM)</u>	54
<u>5.4. Freqüência de batimento ciliar (FBC)</u>	55
<u>5.5. Diferença de potencial transepitelial (DPT)</u>	56
<u>5.6. Estudo histológico do palato de rã</u>	56
<u>5.7. Considerações finais</u>	58
<u>6. CONCLUSÕES</u>	62
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	63
8. ANEXOS	SEPARATA EM CD
8.1. Anexo 1 - Ringer rã	
8.2. Anexo 2 - Dados obtidos na pesquisa (em EXCEL)	
8.3. Anexo 3 - Estatística	
8.4. Anexo 4 - Conteúdo da tese	
8.5. Anexo 5 - <i>Paper</i> (Revista <i>Allergy</i>)	

RESUMO

A *Luffa operculata*, popularmente conhecida como “buchinha-do-norte” ou “cabacinha”, é uma planta medicinal muito usada para tratamento de rinites e rinossinusites. Está na composição de medicamentos alopáticos e homeopáticos em muitos países, principalmente na Europa. Na América Latina, o fruto seco da *Luffa operculata* é utilizado comumente para o preparo de uma infusão, que pode ser inalada ou instilada na cavidade do nariz, liberando grande quantidade de muco e assim aliviando os sintomas nasossinusais. Contudo a infusão de *Luffa operculata* pode causar irritação da mucosa nasal, epistaxe ou anosmia. O objetivo deste estudo foi avaliar, no modelo *ex vivo* do palato isolado de rã, os efeitos da infusão da *Luffa operculata* sobre a velocidade de transporte mucociliar (VTM), a frequência de batimento ciliar (FBC), a diferença de potencial transepitelial (DPT) e os aspectos histológicos qualitativos de amostras dos palatos testados. O experimento foi feito com 46 palatos, subdivididos em cinco grupos. A infusão do fruto seco da *Luffa operculata*, feita em Ringer rã, foi testada em 30 palatos, divididos em três grupos com 10 palatos cada um, testados respectivamente em três diferentes concentrações: 60 mg/l, 600 mg/l e 1200 mg/l. Dez palatos foram estudados em um grupo controle com Ringer rã apenas. Foi feita experimentação em outro grupo (n=6) com infusão de *Luffa operculata* feita em água (600 mg/l H₂O), sendo esta a solução empírica recomendada para uso pelos raizeiros (vendedores de plantas medicinais). A VTM, medida em milímetros por segundo, foi obtida pelo deslocamento de uma amostra de muco autólogo do palato de rã encimado por uma partícula de carvão e visualizada em um microscópio estereoscópico. A FBC foi determinada pela observação de movimentos ciliares do epitélio sob luz estroboscópica no microscópio de luz, e medida em Hertz. A DPT, em milivolts, foi obtida pelo posicionamento de microeletrodos (pontes de agar) no epitélio e na lâmina própria do palato. Foram feitas três medições em cada palato: imediatamente antes, 5 minutos e 20 minutos após imersão na infusão, simulando os efeitos da instilação direta da infusão de *Luffa operculata* dentro da cavidade do nariz. Foram coletadas amostras de todos os palatos para estudo histológico em microscópio de luz e de dois palatos de cada grupo para análise de microscopia eletrônica de transmissão. A infusão do fruto seco de *Luffa operculata*, nas concentrações 600 mg/l e 1200 mg/l em Ringer rã e 600 mg/l em água diminuiu significativamente a VTM em 5 e 20 minutos ($p < 0,001$). A FBC sofreu o efeito da interação tempo e tratamento ($p < 0,008$), ou seja, o efeito do tempo não foi semelhante para todos os tratamentos. A infusão de *Luffa operculata* inibiu o aumento da FBC observado no grupo controle, testado em solução isotônica. As alterações da DPT nas concentrações mais elevadas (600 mg/l e 1200 mg/l), na infusão com água e após 20 minutos de imersão ($p < 0,007$) apontam para perda da impermeabilização do epitélio da mucosa do palato de rã, observada na positivação da voltagem consecutiva ao dano epitelial, resultando em menor resistência ao transporte de fluidos. Isto foi confirmado nos estudos histológicos qualitativos com microscopia de

luz, nos quais se observou perda gradual da integridade do epitélio, e na microscopia eletrônica de transmissão, pelo achado freqüente de espaços intercelulares alargados no epitélio dos palatos tratados. Assim, a infusão de *Luffa operculata* promove alterações significativas no epitélio mucociliar no modelo *ex vivo* do palato isolado de rã: diminui a VTM, afeta a FBC e altera a DPT, o que reflete o dano epitelial causado pela infusão nas concentrações testadas. Estas alterações foram dose-dependentes, manifestaram-se depois de curto período de exposição e foram claramente observadas na dose orientada pelos raizeiros.

SUMMARY

Luffa operculata, ordinarily known as "buchinha-do-norte" or "cabacinha", is a medicinal plant largely employed to treat rhinitis and rhinosinusitis. It is used in the composition of conventional or homeopathic remedies in many Countries, mainly in Europe. In Latin America, the dry fruit of *Luffa operculata* is commonly used for preparing an infusion that can be either inhaled or instilled into the nose, delivering profuse mucous secretion and thus alleviating nasal symptoms. Nevertheless, *Luffa operculata* infusion may cause nasal mucosa irritation, epistaxis or anosmia. The aim of this study was to evaluate, in the *ex vivo* model of the isolated frog palate, the effects of *Luffa operculata* infusion on the mucociliary transport velocity (MTV), the ciliary beat frequency (CBF) and the transepithelial potential difference (TPD), plus the qualitative histological aspects in samples of the tested palates. The experiment was carried out with 46 palates, subdivided in five groups. *Luffa operculata* dry fruit infusion, made with frog Ringer, was tested in 30 palates divided in three groups, each of them with 10 palates, tested respectively in three different concentrations of *Luffa operculata*: 60 mg/l, 600 mg/l and 1200 mg/l. Ten palates were studied in a control group with frog Ringer only. Another group (n=6) was also tested with water made *Luffa operculata* infusion (600 mg/l H₂O), which is the empirical solution recommended by hawkers (herbal medicine sellers). MTV was measured in millimeters per second and assessed by measuring the displacement of an autologous mucus sample through the frog palate with a charcoal particle placed on it, under a stereoscope microscope. CBF was determined by observing ciliary movement of the epithelium under stroboscopic flashlight in a light microscope, and measured in Hertz. TPD was measured in millivolts and assessed by positioning agar bridges microelectrodes in the epithelium and the lamina propria of the palate. Three measures were performed for each palate: immediately before, 5 minutes after and 20 minutes after the immersion into the infusion, simulating the effects of direct instillation of *Luffa operculata* infusion into the nose. Samples of every each palate were collected to study histological aspects by light microscopy, plus two samples of each group to be evaluated by electron transmission microscopy. *Luffa operculata* dry fruit infusions at 600 mg/l and 1200 mg/l in frog Ringer and 600mg/l in water significantly decreased MTV at 5 and 20 minutes ($p<0.001$). CBF suffered interaction time/treatment ($p<0.008$), that is, the time effect was not similar to all of the treatments. *Luffa operculata* infusion inhibited the increase of CBF observed in the control group, tested in isotonic solution. TPD alterations at the higher concentrations (600 mg/l and 1200 mg/l), in watery infusion and after 20 minutes of immersion ($p<0.007$) point to loss of the impermeability of the frog palate mucosal epithelium, by voltage positivation due to epithelial damage, thus result in lower resistance to fluid transport. This was confirmed in the qualitative histological aspects under light microscopy, which showed gradual loss of epithelium integrity, and under electron transmission microscopy, by the finding of intercellular spaces frequently widened in the epithelium of the treated frog palates. Thus, *Luffa*

operculata infusion promotes significant changes on mucociliary epithelium on the *ex vivo* model of the isolated frog palate: decreases MTV, affects CBF and alters TPD, which reflects the epithelial damage caused by the infusion in tested concentrations. Those changes were dose-dependent, manifested within a short period after exposure and were clearly observed in the dosis prescribed by hawkers.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	monofosfato de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIREME	Biblioteca Regional de Medicina
cm	centímetros
DIMED	Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos
DL ₅₀	dose letal para 50% dos animais testados
DTP	diferença de potencial transepitelial
ed.	edição
FBC	freqüência de batimento ciliar
g	grama
GMP	monofosfato de guanidina
H ₂ O	água
HE	hematoxilina-eosina
Hz	Hertz
kg	quilograma
l	litro
mg	miligrama
ml	mililitros
mm	milímetros
mm/s	milímetros por segundo
mV	milivolts
nm	nanômetros

p.	página
PAS-AB	ácido periódico de Schiff – Alcian blue
s	segundo
V	Volts
v.	volume
VTM	velocidade de transporte mucociliar

1. INTRODUÇÃO

É crescente o interesse da população mundial em muitas práticas médicas não alopáticas, conhecidas como "Medicina alternativa", dentre elas a fitoterapia, homeopatia, acupuntura, quiropraxia e outras (EISENBERG et al., 1998). A literatura científica tende a denominar tais práticas "Medicina complementar" ou "terapias complementares" (HUGHES, 2001). O uso destas terapias tem crescido consideravelmente em todo o mundo nas últimas décadas, num mercado que movimentava cifras da ordem de bilhões de dólares anualmente na Europa (FISHER; WARD, 1994) e na América do Norte (ASHER et al., 2001, MARCUS; GROLLMAN, 2002). Dentre elas, a fitoterapia é a modalidade médica mais ancestral e disseminada.

No Brasil, praticamente não há estatísticas sobre o tema, porém supõe-se que em algumas áreas do Centro-oeste, Norte e Nordeste o uso de plantas medicinais, pajelanças e beberagens recomendadas por benzedeiças seja preponderante sobre a Medicina alopática, em decorrência de fatores socioeconômicos e culturais (GERALDES et al., 1981). Contudo sabe-se que estas técnicas vêm sendo largamente utilizadas também em centros urbanos, também pela população de maior poder aquisitivo.

Paradoxalmente, muitos dos que utilizam a Medicina complementar possuem nível elevado de escolaridade (ASTIN et al., 1998) e fazem-no por considerar as técnicas complementares isentas de riscos (DE SMET, 2002). Por vezes, os pacientes sequer chegam a relatar ao médico que estão utilizando plantas medicinais ou compostos de homeopatia simultaneamente à prescrição alopática, correndo o risco de sofrer interações medicamentosas, efeitos adversos e complicações peroperatórias. (TSEN et al., 2000, HOYLE, 2001, DERGAL et al., 2002, NIGGEMANN; GRÜBER, 2003).

O uso de plantas para finalidades medicinais remonta ao homem de Neanderthal há cerca de 60.000 anos. Recebem a denominação *fitoterápicos* as diversas preparações farmacêuticas - extratos, tinturas, pomadas e cápsulas - que têm como matéria-prima partes de plantas, como folhas, caules, raízes, flores e sementes, com reconhecido efeito farmacológico. (GERALDES et al., 1981, CARLINI, 1983). Além das suas atividades terapêuticas, devem ser considerados: a cultura relacionada ao uso das plantas, seu baixo custo e a abundância de matéria-prima durante o ano todo, principalmente nos países tropicais. A indústria farmacêutica já incorporou uma série de princípios ativos de plantas à produção de medicamentos de uso alopático, como a erva-de-São João (*Hypericum perforatum*) para o tratamento da depressão, o *Ginkgo biloba* para atenuar vertigens, e mesmo o ácido acetilsalicílico, que tem origem na casca do salgueiro (*Salix alba*). A *Luffa operculata* é comercializada na Europa, na América do Norte e no Brasil em medicamentos homeopáticos e alopáticos.

O uso indiscriminado de fitoterápicos, baseado na crença de ausência de efeitos colaterais, tem gerado preocupação entre os cientistas (SENNA et al., 1999, ERNEST, 2001, ERNEST, 2002, ADAMS et al., 2002, WETZEL et al., 2003). A automedicação é um grande problema: são utilizadas plantas que crescem nos próprios quintais ou coletadas em terrenos baldios ou florestas, que nem sempre correspondem à espécie procurada. Além disso, a quantidade de princípio ativo contida nas plantas pode variar de acordo com a idade do vegetal, a época da colheita, a parte do vegetal utilizada, as condições de estocagem e o tipo de solo. Por exemplo, as plantas que crescem muito próximas a rodovias apresentam concentração elevada de metais como chumbo, zinco e alumínio, entre outros, cujos efeitos podem ser indesejáveis (GERALDES et al., 1981, AUDICANA et al., 2001). Muitas plantas secas e fitoterápicos são vendidos mediante propaganda enganosa e inescrupulosa na mídia. Faltam controle de qualidade e fiscalização adequada destes produtos (ANGELL; KASSIRER, 1998).

Uma parcela significativa dos usuários de Medicina complementar busca o tratamento de doenças respiratórias como a rinite alérgica e a asma (KROUSE; KROUSE, 1999, SENNA et al., 2000, RAGHAVAN; JONES, 2000, ASHER et al., 2001, FRIERI, 2001, BIELORY, 2002), afecções cuja prevalência vem aumentando (MELLO JR; MION, 2003). Dentre 300 norte-americanos com asma ou rinite entrevistados sobre o assunto, 42% revelaram que haviam usado alguma forma de Medicina complementar nos 12 meses anteriores. A fitoterapia foi a modalidade mais usada (24%), e 15% desses pacientes classificavam sua doença como moderada ou grave.

(BLANC et al., 2001). Em nosso meio, pesquisa feita recentemente no Pronto Socorro de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo mostrou que 30% dos pacientes admitem usar plantas medicinais para tratar afecções otorrinolaringológicas (MENON-MIYAKE et al., 2003). Neste inquérito, a "buchinha-do-norte" (*Luffa operculata*) estava dentre as plantas utilizadas no tratamento das rinites e rinosinusites, sendo também lembrada por seus efeitos adversos e contra-indicações.

A utilização fitoterápica da *Luffa operculata* no Brasil é secular e se faz através de seu fruto seco. Do Ceará vem a receita mais conhecida, recomendada informalmente até hoje pelos vendedores de ervas medicinais para o tratamento das rinites e rinosinusites. Faz-se a infusão de 1/4 do fruto em 500ml de água e administra-se por inalação ou instilação nasal, às quais se segue profusa rinorréia mucopurulenta, às vezes sanguinolenta, “acompanhada da expulsão de pólipos”. (MATOS, 1979, VASQUES et al., 1986)

Apesar da larga utilização, faltam estudos sobre a ação da *Luffa operculata* na mucosa do trato respiratório.

1.1. Objetivos

Frente à falta de dados sobre a ação da *Luffa operculata* no epitélio respiratório, e sobre a atividade mucociliar em especial, realizamos um estudo dose-resposta com infusão de *Luffa operculata*, partindo da dose empírica popularmente recomendada, no modelo experimental do palato isolado de rã, com o objetivo geral de avaliar alguns parâmetros indicativos da função do aparelho mucociliar. Nossos objetivos específicos foram avaliar:

- os efeitos da infusão de *Luffa operculata* sobre a velocidade de transporte mucociliar;
- a influência da infusão de *Luffa operculata* sobre a frequência de batimento ciliar epitelial *in vitro*;
- a diferença de potencial transepitelial obtida nos palatos estudados;
- os aspectos histológicos qualitativos do palato de rã após imersão em infusão de *Luffa operculata*, à microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a compreensão do texto, os trabalhos não serão apresentados em ordem cronológica.

2.1. *Luffa operculata*

2.1.1. Aspectos gerais

CACERES (1996) refere que a *Luffa operculata* é nativa da América do Sul, especialmente do Brasil, cresce em toda a América cisandina e é cultivada comercialmente na Guatemala.

SALVIANO (1992a) descreve que a *Luffa operculata* é uma planta angiosperma e dicotiledônea da família das cucurbitáceas. Denominada *Momordica operculata* por Linnaeus em 1759, transferida para o gênero *Luffa* por Cogniaux em 1978, é desde então designada ***Luffa operculata* (L.) Cogn.** A família Cucurbitaceae também alberga 850 espécies, dentre elas vegetais comestíveis – abóbora, chuchu, pepino - ou com propriedades medicinais - como a *Momordica charantia* ou melão-de-são-caetano

(NASEEM; PATIL, 1998). O gênero *Luffa* é composto por oito espécies. A palavra *Luffa* deriva de "luff", que é o nome árabe da planta (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

MATOS (1979) refere que os sinônimos botânicos mais encontrados para a *Luffa operculata* são: *Momordica operculata* L., *Cucumis sepium* G. Mey., *Luffa sepium* (G. Mey.)C. Jeffrey, *Luffa purgans* (Mart.) Mart., *Momordica purgans* Mart., *Momordica quinquefida* Hook. Et Arn., *Poppya operculata* Roem., *Elaterium quinquefidum* Hook. Et Arn., aos quais CACERES (1996) acrescenta *Camenis sepium* G. e *Luffa astorii* Svenson.

LORENZI; MATOS (2002) relatam como sinônimos populares da *Luffa operculata* no Brasil: abobrinha-do-norte, bucha, bucha-dos-paulistas, bucheira, buchinha, buchinha-do-norte, buchinha-paulista, cabacinha, cabacinho, purga-de-joão-pais, purga-dos-frades-da-companhia. ALONSO (2003) refere que na América Latina também é conhecida como *esponjuelo*, *esponjilla*, *pachte*, *pepino de monte*, *zapallito de monte*, *cabacito*, e MATOS (1979) relata as denominações *estropajo*, *moroquilitl*, *tzenayotli* especificamente no México.

Como descrevem LORENZI; MATOS (2002), a planta da *Luffa operculata* é uma trepadeira herbácea, de caule muito ramificado e delgado, de até 10m de comprimento. As folhas são alternadas, cordiformes, recortadas, com base invaginada e pecíolo anguloso, medindo 2 a 8cm de comprimento por 3 a 15cm de largura. As flores são amarelas, com cinco pétalas, e medem até 2cm. Os frutos são oblongo-ovóides a fusiformes, medem de 5 a 6cm em seu maior diâmetro, e seu peso varia em torno de 1g.

Têm deiscência opercular, com pericarpo papiráceo, espinhoso e decacostado, envolvendo um mesocarpo fibroso, frouxo, com três cavidades longitudinais contendo numerosas sementes marrom-escuras, achatadas e lisas (Figura 1).



FIGURA 1 - FRUTOS SECOS DA *Luffa operculata*, CORTE TRANSVERSAL (a) E LONGITUDINAL (b). NO DETALHE, O MESOCARPO FIBROSO E AS SEMENTES.

2.1.2. Utilização farmacológica popular

A parte da planta *Luffa operculata* tradicionalmente usada com finalidade medicinal são os frutos maduros e secos, muito amargos e esternutatórios. Sua indicação mais tradicional, além do tratamento das rinites e rinosinusites, é como laxante ou purgante drástico e abortivo

(MATOS, 1979). A literatura também refere a utilização medicinal da *Luffa operculata* no alcoolismo, febre, picada de cobra, dor ciática, "oftalmia crônica" (doenças oculares), sífilis, tinea, icterícia e "hidropsia". Também são descritas propriedades diurética, emética, irritante, mucolítica e sudorífica (CACERES, 1996), além de atuar como vermífuga, hidragoga e expectorante (VASQUES et al., 1986).

Nas rinosinusites, a inalação do extrato aquoso do fruto alivia a "congestão nasal" (obstrução nasal) com profusa liberação de muco. A infusão pode ser preparada com um quarto do fruto da *Luffa operculata* "lavado em nove águas", ou seja, lavado nove vezes sucessivas com um pouco de água, deixando-o em maceração na nona água durante uma noite (MATOS, 1979). A infusão mais freqüentemente recomendada por prescrição leiga é aquela feita com um quarto do fruto seco em 500 ml de água (VASQUES et al., 1986).

MATOS (1979) relata que a *Luffa operculata*, com a denominação *Momordica bucha*, foi citada no Guia Médico Brasileiro de 1841 como purgativa. Também foi utilizada na composição de um medicamento registrado em 1888 na antiga Inspeção Federal de Saúde, precursora da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos (DIMED), atual Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Eram as "Pílulas Purgativas de Resina de Batata e *Momordica bucha* do Cirurgião Mattos", popularizadas como "Pílulas de Mattos" ou, simplesmente, "pílulas do mato". Este foi, por muitos anos, um dos fitoterápicos de maior preferência no meio rural do Norte e Nordeste do Brasil. Os frutos secos ainda são usados em

associação com outras ervas na forma de extrato aquoso, na mistura denominada “garrafada”, conhecida no sertão nordestino e no Interior do Brasil como abortiva.

VASQUES et al. (1986) relatam outro medicamento contendo *Luffa operculata*, o “Oper-sinus”, devidamente registrado e comercializado na década de 1950. Em 1986, a “cabacinha” era droga aceita pela DIMED e figurava no Catálogo Brasileiro de Produtos Farmacêuticos onde eram registrados os seguintes produtos: Pílulas de Aloe e Cabacinho (Odalay Soares & Cia.), Elixir de Salsa, Caroba e Cabacinho (Laboratório Cícero Diniz S.A.), Elixir de Salsa, Caroba e Cabacinho composto (Laboratório Rabelo S.A.), Elixir de Salsa, Caroba e Cabacinho Iodurado (Laboratório Edison Bezerra S.A.), e Elixir de Salsaparrilha, Caroba e Cabacinho (R & B Faria e Cia Ltda.).

2.1.3. Bioquímica

MATOS (1979) relata que na composição química da *Luffa operculata* estão glicosídeos (açúcares redutores e não redutores), saponina e resina, além de esteróis livres, ácidos orgânicos e fenóis, com ausência de tanino, flavonóides e alcalóides. Na resina foram determinados como princípios ativos: cucurbitacina B, cucurbitacina D e isocucurbitacina B (Figura 2). A aglicona da saponina é a gipsogenina. CACERES (1996) refere ainda que as sementes contêm elaterina, azeite e proteínas.

ALONSO (2003) classifica como triterpenos as cucurbitacinas B e D, isocucurbitacina B, neocucurbitacinas A e B, e gipsogenina. Outros

componentes presentes na *Luffa operculata* são: a buchina (princípio amargo), luffanina e buchina (alcalóides), saponinas, luperosídeos A-H (presentes nas partes aéreas da planta), metacarboxi-fenilalanina, elaterina e citrulina (encontradas nas sementes).

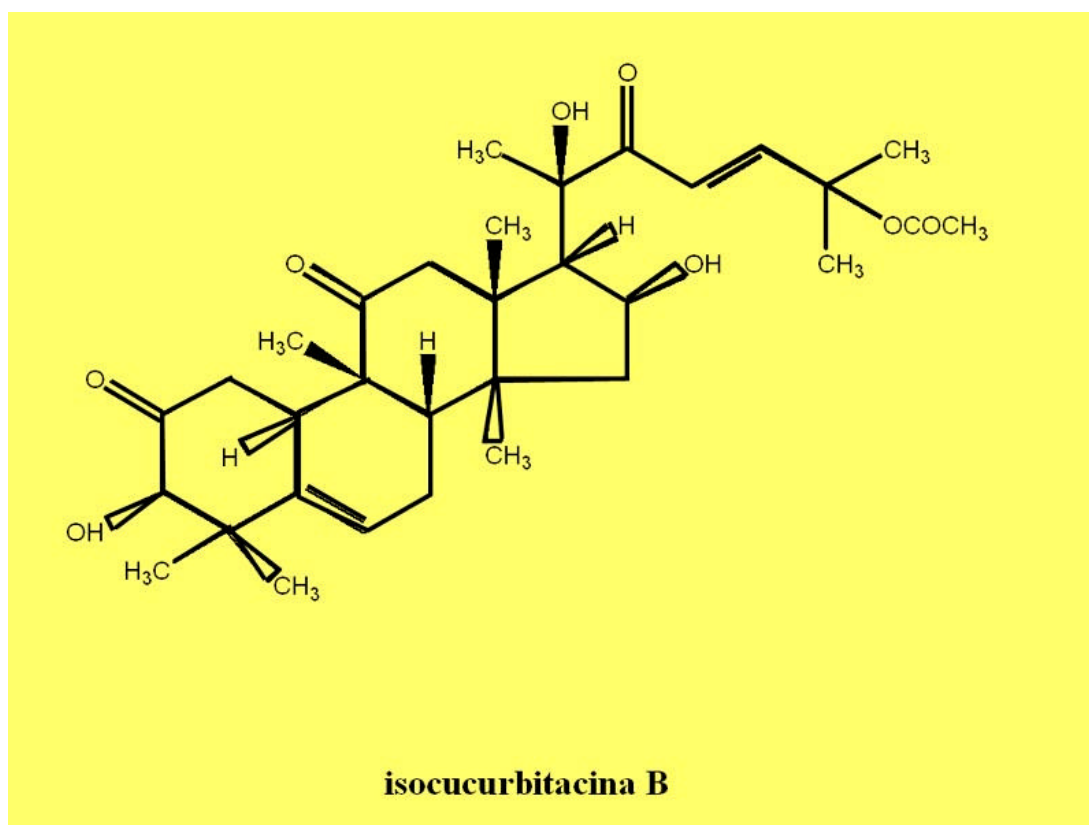


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ISOCUCURBITACINA B, PRINCÍPIO ATIVO DA *Luffa operculata*.

2.1.4. Farmacologia e toxicologia

MATOS (1979) relata que a *Luffa operculata* age sobre as mucosas por efeito das cucurbitacinas e de seus glicosídeos. A saponina colabora com esta ação, emulsificando compostos lipossolúveis ativos, o que facilita o

contato e absorção da isocucurbitacina pelas mucosas e resulta em ação cáustica sobre as mesmas. Refere também que o uso de 30 mg do extrato hidralcoólico seco (princípios ativos brutos) ou de 2,5ml da tintura provoca evacuação fluida e copiosa após duas a três horas da administração, agindo assim como purgante drástico.

CHAMPNEY et al. (1974) estudam o extrato aquoso de *Luffa operculata* a 4%. Surpreendem-se com a falta de ação cardiovascular, antiinflamatória e anti-histamínica, mecanismos pelos quais atuam os medicamentos para obstrução nasal. Observam ação analgésica numa dose próxima à dose letal (160mg/kg).

SILVA (1983), num amplo estudo sobre as atividades farmacológicas da *Luffa operculata*, conclui que, apesar dos extratos aquoso e etanólico do seu fruto seco serem altamente tóxicos em concentrações baixas, possuem atividade farmacológica apreciável. Seus resultados de experimentos *in vivo* e *in vitro* sugerem fortemente o envolvimento de mecanismos colinérgicos e histaminérgicos nos mecanismos da ação do extrato. Conclui que a droga provavelmente age no tratamento da rinosinusite por mecanismo de exsudação serosa e incremento da motilidade ciliar na remoção do material inflamatório, juntamente com o efeito emoliente, e não pelo efeito descongestionante das mucosas nasais.

AGUIAR; NEVES-PINTO (1985), em estudo farmacológico preliminar com *Luffa operculata*, concluem que ela não age como parassimpatomimético, porquanto não sofre bloqueio da atropina. Também não é bloqueadora do sistema nervoso vegetativo simpático, pois seus

efeitos são anulados pela adrenalina. Supõem que ela interfira diretamente no sistema contrátil do músculo, considerando-a uma droga musculotrópica. Sua ação hipotensora ocorreria por vasodilatação periférica.

VASQUES et al. (1986) relatam que o fruto da *Luffa operculata* é extremamente ativo, devendo ser usado com cautela, uma vez que doses excessivas podem provocar evacuações fluidas abundantes, cólicas, náuseas e vômitos, e mesmo hemorragias e abortos. A dose tóxica para o homem, extrapolada a partir da DL₅₀, ou dose letal para 50% de animais testados (camundongos), corresponde a 75mg/kg, ou 5g para o fruto seco, ou 50 ml da tintura a 10%. Já LORENZI; MATOS (2002) referem que a DL₅₀ para ratos é 170mg/kg, isto é, uma dose de pouco mais de 1g do extrato de *Luffa operculata* é capaz de matar um homem de 70kg.

KAWAHARA et al. (2001), descrevem as neocucurbitacinas, e a elas atribuem propriedade de inibição da expressão do gene do fator de osteoclastogênese sobre células humanas semelhantes a osteoclastos.

2.1.5. Estudos experimentais e clínicos

RONCADA (2001) testa o extrato do fruto da *Luffa operculata* a 0,5% e 1%, administrando-o na cavidade nasal de coelhos pelo período de 14 dias. Conclui que, nestas condições, ele pode provocar alterações estruturais superficiais na mucosa, como a perda de cílios, sem outras alterações de ultra-estrutura.

WIESENAUER et al. (1989) fazem um estudo controlado duplo-cego e randomizado sobre o efeito de três preparados homeopáticos, dois deles

contendo *Luffa operculata*, comparados com placebo. Foram avaliados 157 pacientes com rinosinusite. Os autores relatam que não houve diferença marcante no sucesso terapêutico entre os combinados de drogas analisadas, nem entre o grupo de droga ativa e placebo. Houve melhora de 81% dos pacientes com rinosinusite aguda e 67% daqueles com rinosinusite crônica. Relatam ainda que os resultados são comparáveis aos descritos em estudos com antibioticoterapia e gotas nasais descongestionantes.

ADLER (1999) descreve eficácia e segurança de um outro medicamento homeopático com *Luffa operculata* em sua composição para o tratamento da rinosinusite aguda em 119 adultos. O tratamento durou duas semanas, e não foram reportados efeitos colaterais. Refere a melhora de 81,5% dos pacientes, e somente um paciente necessitou de complementação com antibiótico.

WEISER et al. (1999) fazem um estudo comparativo entre um composto homeopático com *Luffa operculata* e cromoglicato de sódio, ambos de uso tópico nasal, em 146 pacientes com rinite alérgica intermitente (sazonal). Os autores referem melhora rápida e duradoura, com melhora do índice de qualidade de vida e equivalência terapêutica de ambas as formas de tratamento.

GLATTHAAR-SAALMULLER; FALLIER-BECKER (2001) avaliam o efeito antiviral *in vitro* de um composto homeopático contendo *Luffa operculata*, *Euphorbium resinifera* e *Pulsatilla pratensis*, usado nos quadros inflamatórios nasais. Descrevem clara atividade antiviral dos dois últimos

componentes, mas a *Luffa operculata* não demonstra nenhuma atividade neste sentido.

Hoje existe no mercado nacional um preparado à base de *Luffa operculata* 1% e soro fisiológico, de venda livre nas farmácias. Com esta medicação SALVIANO (1992 b) trata 33 pacientes com rinosinusite aguda ou rinosinusite crônica agudizada. Dois pacientes necessitaram de antibioticoterapia adicional. Conclui que o medicamento é útil no tratamento das rinosinusites, com resultados clínicos bons em 87,9% dos casos, mostrando melhora clínica e radiológica. O tempo médio de cura ou melhora foi de 7,4 dias, e a tolerância ao medicamento foi satisfatória, na medida que o autor avaliou os efeitos colaterais - ardor ou irritação nasal na instilação, coriza e espirros, aumento do fluxo nasal - inerentes à própria medicação.

2.1.6. *Luffa cylindrica*

DI STASI, HIRUMA-LIMA (2002) descrevem a *Luffa cylindrica* e alertam que ela deve ser diferenciada da *Luffa operculata*. Trata-se da "esponja vegetal", cujos frutos são maiores, oblongos e cilíndricos com até 35 cm de comprimento. A *Luffa cylindrica* Roem. tem por sinônimos botânicos: *Luffa aegyptiaca* Mill., *Luffa clavata* Roxb., *Luffa parvula* Ham. , *Luffa pentandra* Roxb., *Luffa scabra* Schum., *Momordica carinata* Vell., *Momordica cylindrica* L., *Momordica luffa* L.. Em nosso meio é conhecida pelo nome de buchinha, bucha-dos-paulistas, fruta-dos-paulistas, bucha-dos-pescadores, quingobó-grande, esfregão e pepino-bravo. É usada para higiene pessoal e limpeza geral.

ALONSO (2003) relata a utilização da *Luffa cylindrica* em medicina chinesa desde o século X D.C.

POMA et al. (1999) relatam atividade antiproliferativa sobre o cultivo de melanoma humano pelo componente lufina, encontrado nas sementes da *Luffa cylindrica*.

A Comissão E (AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1999) é o guia terapêutico oficial com a lista de monografias dos fitoterápicos utilizados na Alemanha. A *Luffa operculata* não consta daquele documento, mas sim a *Luffa aegyptica*, relatada como de uso popular nos quadros de resfriados, coriza e afecções sinusais supurativas. Está classificada no ítem de monografias “nulas ou não aprovadas”, onde se incluem as ervas sem estudos clínicos suficientes, sem comprovação de sua eficácia ou seu risco. Contudo reiteramos que os medicamentos homeopáticos comercializados na Alemanha contêm *Luffa operculata*(Figura 3).



FIGURA 3 - MEDICAMENTOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL (a), NOS ESTADOS UNIDOS (b) E NA EUROPA (c) CONTENDO *Luffa operculata*.

2.2. Transporte mucociliar

2.2.1. Introdução

O aparelho mucociliar tem um importante papel na defesa inespecífica da via aérea nasal e dos seios paranasais, assim como nos demais segmentos do trato respiratório (QURAIISHI et al., 1998; MENON-MIYAKE et al., 2003b). O transporte mucociliar no aparelho respiratório é um mecanismo que depende da integridade dos cílios e do muco e do acoplamento entre ambos. SLEIGH et al. (1988) relatam que sua eficiência depende (1) da força motriz do cílio, determinada pelo tamanho, densidade e frequência do batimento ciliar; (2) da quantidade de muco e suas propriedades físico-químicas e (3) da quantidade do chamado fluido periciliar.

BALBANI (2001) descreve que o transporte mucociliar ocorre graças às propriedades reológicas do muco (isto é, sua viscoelasticidade), ao batimento ciliar em ondas metacrônicas e ao acoplamento entre os cílios e o muco. Essas características dependem da morfologia do epitélio e da lâmina própria. O batimento ciliar, em condições normais, é coordenado, resultando numa onda que transporta o muco e as partículas a ele adsorvidas. O mecanismo de batimento, já bem descrito na literatura, pode ser sintetizado em duas etapas: *batimento propulsivo efetivo* - quando o cílio está completamente estendido, promovendo a propulsão da epifase gel - e *batimento de recuperação* - momento em que retorna à posição inicial, mantendo-se próximo à superfície celular (Figura 4).

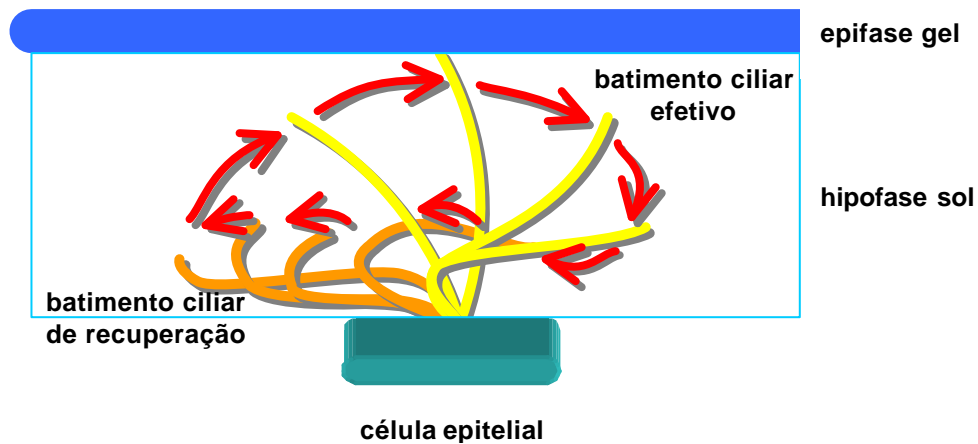


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE BATIMENTO CILIAR

O muco é composto por água (95%), proteínas (3%), lipídios (1%) e minerais (1%), como relatam BASBAUM; WELSH (1994). É produzido pelas células secretoras (caliciformes), células serosas e glândulas da lâmina própria (MACCHIONE, 1998). As células serosas do epitélio glandular estão envolvidas na produção de glicoproteínas neutras (fucomucinas) que compõem a fase aquosa do muco respiratório. Já as células secretoras e mucosas elaboram glicoproteínas ácidas (sialomucinas e sulfomucinas) que formam um fluido espesso. O conjunto das secreções é o muco que reveste o epitélio ciliado, formado por uma *hipofase sol* (fluido periciliar) e uma *epifase gel* (camada em contato com o topo dos cílios). A quantidade e a composição bioquímica do muco são essenciais ao mecanismo de transporte mucociliar. Se há excesso de fluido periciliar, ocorre desacoplamento da epifase gel dos cílios; se há desidratação da epifase gel

e aumento de seu teor protéico, o aumento de viscosidade reduz a eficiência do batimento ciliar (WANNER et al., 1996).

As secreções produzidas são, em parte, de alto peso molecular, ricamente glicosiladas, com moléculas complexas cuja estrutura protéica consiste de um número variável de aminoácidos, codificados por vários genes de mucina. Os fenótipos alteram-se em condições patológicas. Nas doenças das vias aéreas, ocorre dano da mucosa, viscoelasticidade alterada das secreções e falha no *clearance*, com favorecimento da colonização bacteriana levando a destruição do epitélio (JEFFERY; LI, 1997).

A secreção de muco é regulada por uma variedade de peptídeos moduladores e mediadores químicos. ROGERS (2000) descreve que mecanismos neurais contribuem para o controle da secreção de muco em modelos animais e em humanos. Em todas as espécies estudadas, predominam os mecanismos colinérgicos.

2.2.2. Função de barreira

BASBAUM; WELSH (1994) descrevem que o epitélio respiratório serve como uma barreira que separa o lúmen dos componentes do interstício. Esta barreira ocorre pelo fato do epitélio ser como uma camada de células fortemente aderidas por *tight junctions*^{*}, cuja principal função é

* *Tight junctions* é um termo utilizado largamente na literatura, referente a junções celulares apicais, de função primordialmente impermeabilizante. Nos textos em português consultados encontramos traduções distintas, como junções fortes (MACCHIONE, 1998), zônulas de oclusão (JUNQUEIRA, 1999), e junções íntimas (Descritores das Ciências da Saúde - BIREME). Optamos por manter o nome original em inglês, grafando-o em itálico.

inibir o movimento de água e de solutos através do epitélio. A prova de integridade das *tight junctions* é a resistência elétrica transepitelial.

JUNQUEIRA; CARNEIRO (1999) relatam que nos epitélios prismáticos as junções celulares se apresentam numa ordem definida da parte apical para a parte basal da célula. As zônulas de oclusão são as junções mais apicais, e formam um cinturão ao redor da célula, há fusão dos folhetos externos das membranas celulares das células vizinhas, permitindo efeito selador. A junção encontrada a seguir é a zônula de adesão, que contribui para aderência entre células vizinhas. As junções comunicantes podem ocorrer em qualquer posição nas membranas laterais das células epiteliais e permitem a passagem de moléculas informacionais, como AMP cíclico, GMP e íons. Outra estrutura juncional é o desmossomo ou mácula de adesão, estrutura complexa, em forma de disco. Os desmossomos aparecem retos aos cortes histológicos, sugerindo rigidez da estrutura. Na região do desmossomo as membranas celulares se afastam cerca de 30nm ou mais.

GONZÁLEZ-MARISCAL (2003) afirmam que *tight junctions* constituem a barreira à passagem de íons e moléculas através da via paracelular, e do movimento de proteínas e lípidos entre os domínios basolateral e apical da membrana plasmática. Mais de 40 proteínas diferentes se localizam nas *tight junctions* não só do epitélio, mas também no endotélio e nas células mielinizadas. Os achados mais recentes sobre *as tight junctions* levam a crer que sua função não seja somente a de barreira, mas que estejam também envolvidas em complexos mecanismos de sinalização em cascata que controlam o crescimento e a diferenciação celular.

2.2.3. Mecanismos celulares de transporte iônico

MACCHIONE (1998) descreve que o epitélio mucociliar é polarizado anatomica e funcionalmente. Anatomicamente há um lado apical, composto pelos cílios e microvilos, cujo gradiente elétrico tende a negativo. O lado da membrana basolateral volta-se para o espaço intersticial. Esses dois compartimentos são separados pelas *tight junctions*.

BASBAUM; WELSH (1994) mostram modelo descritivo conforme esquema da Figura 5.

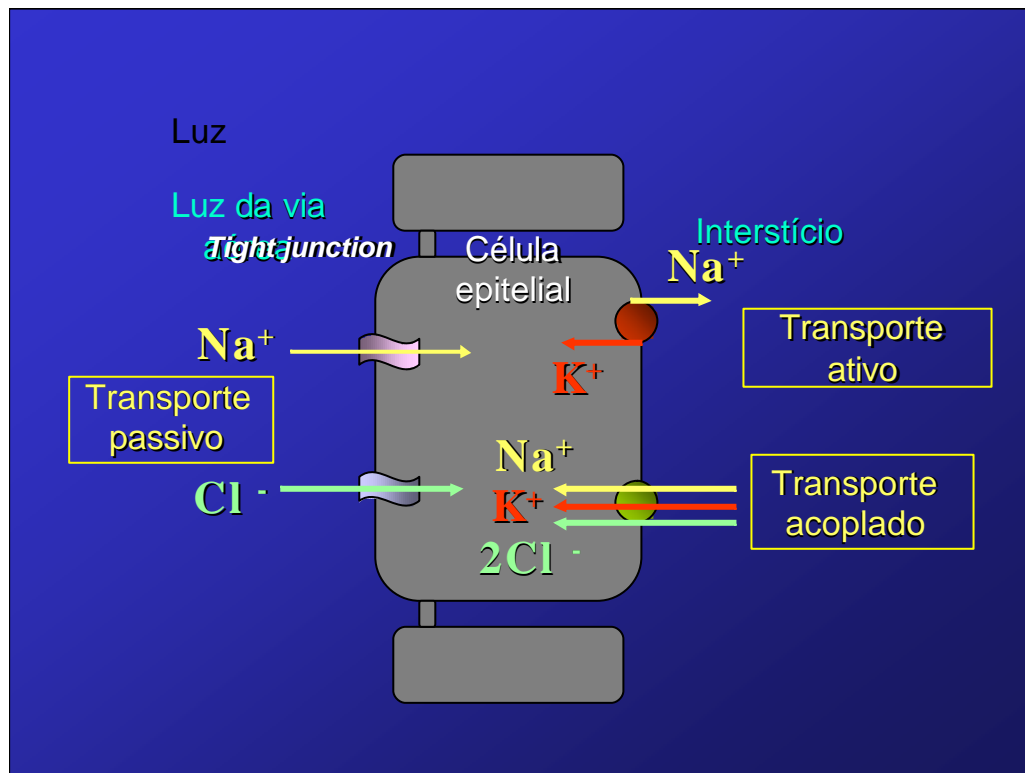


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TRANSPORTE IÔNICO NO EPITÉLIO RESPIRATÓRIO

A secreção transepitelial de cloro (Cl^-) e a absorção de sódio (Na^+) pela superfície epitelial são processos eletrogênicos ativos. O Cl^- entra na célula na membrana basolateral por um processo de co-transporte eletricamente neutro, acoplado ao Na^+ e, provavelmente, ao potássio (K^+). O Na^+ entra na célula movendo-se num gradiente eletroquímico favorável, fornecendo a energia para levar o Cl^- contra seu gradiente eletroquímico. Os íons Cl^- se acumulam no interior da célula em concentração maior que a prevista para seu equilíbrio eletroquímico. Então, saem da célula através dos canais de Cl^- da membrana apical. Íons Na^+ que entram na membrana basolateral acoplados ao Cl^- também saem através da própria membrana basolateral através da ação da Na^+ - K^+ -adenosino-trifosfatase (ATPase). Esta enzima fornece a energia para a secreção transepitelial de Cl^- pela manutenção de baixa concentração de Na^+ . Além disso, a Na^+ - K^+ -ATPase acumula K^+ dentro da célula. Os íons K^+ saem passivamente através dos canais de K^+ da membrana basolateral. A condutância de K^+ da membrana basolateral e o gradiente de concentração deste íon hiperpolarizam a célula, fornecendo o gradiente eletroquímico para saída do Cl^- . Também fornece em parte a força para entrada do Na^+ na membrana apical. A membrana apical contém canais de Na^+ que permitem a entrada passiva deste íon em gradiente eletroquímico favorável (BASBAUM; WELSH, 1994).

2.3. Métodos de Avaliação

2.3.1. Modelo do palato isolado de rã

O palato isolado de rã é um sistema conveniente para estudo do aparelho mucociliar, pois tem um epitélio virtualmente idêntico ao das vias aéreas dos mamíferos. O anfíbio apresenta seu palato revestido por epitélio colunar ciliado pseudoestratificado, recoberto por filme mucoso (FESTA, 1993). Ele continua a secretar muco e mantém o batimento ciliar por até 14 dias após o sacrifício do animal, se mantido sob refrigeração. Isto ocorre pela mimetização das condições da rã em seu habitat natural durante os períodos de hibernação.

RUBIN et al. (1990) padronizam o estudo do transporte mucociliar em preparações de palato de rã e constatam que a *Rana catesbeiana*, conhecida como rã touro, possui muco com propriedades viscoelásticas semelhantes às de humanos normais, e que ambos se comportam da mesma maneira quando colocados em seu epitélio.

Esta preparação, já utilizada por PUCHELLE et al. (1982), serve para estudar o transporte de diferentes amostras de muco pelo sistema ciliar e a ativação ou inibição ciliar.

2.3.2. Velocidade de transporte mucociliar (VTM)

O método de análise *in vitro* do transporte do muco em palato de rã é classicamente aceito para determinar a VTM em epitélio ciliado. Por

apresentar uma superfície plana, o palato permite a observação direta da velocidade de transporte de uma amostra de muco colocado sobre esse epitélio (MACCHIONE et al., 1995). O deslocamento do muco encimado por uma partícula insolúvel (resina, carvão vegetal ou discos de alumínio) é visualizado através de microscópio com lupa estereoscópica equipada com uma lente reticulada. O resultado final é expresso em milímetros por segundo (mm/s).

Autores têm-se utilizado deste método para avaliar a atuação de diferentes substâncias sobre o epitélio, como calcitonina tópica nasal (BRAGA et al., 1992), amiloride (FESTA et al., 1995), uridina 5-trifosfato (FESTA et al., 1997), além do efeito de antioxidantes e do material particulado urbano, poluente da atmosfera (MACCHIONE et al., 1998).

2.3.3. Frequência de batimento ciliar (FBC)

REIMER et al. (1977) descrevem o estudo *in vivo* e *in vitro* do transporte mucociliar pela medida de reflexão da luz incidente sobre o epitélio sob microscopia. PUCHELLE et al. (1982) relatam a avaliação da FBC medida em Hertz (Hz), também sob incidência de luz, no palato isolado de rã.

A FBC tem sido utilizada como método diagnóstico das discinesias ciliares (SCHIDLOW, 1994) e na avaliação dos efeitos de toxinas bacterianas sobre o epitélio humano (YUN et al., 1999). Está descrita para avaliar, em modelo animal, a toxicidade e os efeitos de medicamentos tópicos nasais e seus excipientes na motilidade ciliar (MERKUS et al., 2001).

Em epitélio nasal humano, este método *in vitro* avalia o efeito das soluções salinas hipertônicas (MIN et al., 2001).

Para medir a FBC no palato de rã na técnica modificada e descrita por MACCHIONE (1998) visualiza-se um grupo de cílios sob um feixe de luz estroboscópica, através de um microscópio de luz conectado a uma câmera que envia mensagens a um monitor de vídeo. O sistema permite a gravação dos dados e a análise em computador.

2.3.4. Diferença de potencial transepitelial (DPT)

O transporte iônico e de água através do epitélio respiratório e a secreção das glândulas das vias aéreas têm papel essencial na produção, composição e regulação do volume de muco do trato respiratório. Mudanças no controle do transporte iônico do epitélio respiratório podem alterar o gradiente de concentração de íons, influenciando o fluxo de água e, conseqüentemente, o transporte mucociliar (NAKAGAWA, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e realizado em obediência às normas éticas da Instituição.

3.1. Material

Foram utilizadas rãs da espécie *Rana catesbeiana*, também conhecidas como rã touro, do biotério do Laboratório de Patologia de Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), provenientes de ranários que as fornecem a restaurantes.

Foram estudados 46 palatos isolados de rã no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os palatos foram distribuídos em cinco grupos (1, 2, 3, 4 e 5).

Grupo 1 - Dez palatos foram examinados usando-se a solução isotônica de Ringer rã (**grupo controle**).

Grupo 2 - Dez palatos foram examinados após imersão em infusão preparada com 1/4 do fruto seco em 5 litros de Ringer rã. (**infusão diluída** = 60 mg/l ou 0,3g/5000ml).

Grupo 3 - Dez palatos foram testados com a infusão de *Luffa operculata* preparada com 1/4 do fruto seco em 500ml de Ringer rã. (**infusão base**= 600mg/l ou 0,3g/500ml).

Grupo 4 - Dez palatos foram submetidos aos exames após imersão em infusão mais concentrada, preparada com 1/4 do fruto seco em 250ml de Ringer rã (**infusão concentrada** = 1200mg/l ou 0,3g/250ml).

Grupo 5 - Seis palatos foram submetidos aos exames após imersão em infusão, preparada como na fórmula empírica: infusão com 1/4 do fruto seco em 500ml de água mineral (**infusão em água** = 600mg/l H₂O ou 0,3g/500ml H₂O).

Cada palato dos grupos de estudo foi examinado três vezes: **antes** da imersão em infusão de *Luffa operculata*, após **5 minutos** da imersão e após **20 minutos** da imersão. Estes tempos foram arbitrados em função do tempo de transporte mucociliar nasal da sacarina em humanos, pressupondo o tempo que um medicamento ficaria em contato com a mucosa do nariz depois de instilado.

3.1.1. Preparo do palato isolado de rã

Cada rã foi sacrificada por decapitação após ter ficado por uma hora em recipiente com gelo, o qual provoca baixa da taxa metabólica, diminuição dos reflexos e da mobilidade, além de anestesia física no animal, tal qual ocorre durante seus períodos de hibernação natural. Reiteramos que foram feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento das rãs, reduzir o número de animais utilizados e adotar alternativas às técnicas *in vivo*.

Após a decapitação a mandíbula foi desarticulada e a porção superior da cabeça, removida. O palato foi colocado em placa de Petri sobre uma gaze umedecida em Ringer rã (Anexo 1), coberto por filme plástico e conservado sob refrigeração (4°C) por dois dias. Nestas condições, a atividade ciliar se mantém.

3.1.2. Preparo da infusão de *Luffa operculata*

Infusão é o extrato aquoso obtido de uma matéria vegetal colocada em água quente e posteriormente abafada, como se fazem os chás. Se for fervida, deve sê-lo por curto período. O produto da fervura prolongada da matéria vegetal, como no cozimento, denomina-se decocto (LORENZI; MATOS, 2002).

A preparação da infusão de *Luffa operculata* teve por base empírica a proporção observada na fórmula popular, orientada pelos raizeiros que comercializam a planta: 1/4 do fruto seco em 500 ml de água. Porém, neste

estudo foi usado o Ringer rã, solução fisiológica da rã, para que fossem analisados somente os efeitos da planta, e não do solvente. Assim, denominamos "infusão base" (Grupo 3) o grupo com aquela proporção. Testamos mais dois grupos, "infusão diluída" (Grupo 2) e "infusão concentrada" (Grupo 4), contemplando variações possíveis na prática. Apenas no Grupo 5 utilizamos a água como base da infusão, tal como é preparada pelos pacientes que a utilizam, de forma a avaliar os possíveis efeitos dessa solução na mucosa humana.

Em vista da diferença de peso e tamanho dos frutos, a quantidade de massa do fruto foi padronizada, na intenção de minimizar a variação da quantidade de princípio ativo no experimento. Houve o cuidado de incluir no preparo das infusões, nas diferentes concentrações, partes da casca, da polpa fibrosa e das sementes da *Luffa operculata*, por não termos indícios de onde se concentra o princípio ativo desejado. Foram pesados 10 frutos secos de *Luffa operculata*, com variação aproximada entre 1g a 1,5g, e média de 1,2g. Este último valor foi arbitrado como o peso padrão de um fruto seco de *Luffa operculata* para o experimento. A solução empírica, recomendada pelos raizeiros, é feita com 1/4 do fruto seco, que corresponde a 0,3g. Depreendemos a concentração de cada uma das soluções utilizadas em infusão a partir deste peso, como descrito acima.

Antes de cada sessão do experimento foi efetuada pesagem da quantidade de fruto necessária para o preparo de infusão em balança de precisão (Precisa 120A). Os fragmentos de *Luffa operculata* foram colocados

em jarra refratária, junto com a quantidade pré-determinada de Ringer rã (nos Grupos 2, 3, 4) ou de água mineral (Grupo 5). O líquido foi fervido, interrompendo-se a fervura, logo no início, ao borbulhar. Durante este período observou-se a rápida formação de espuma no sobrenadante, em maior ou menor quantidade, diretamente proporcional à concentração da infusão. O recipiente refratário foi tampado até esfriar naturalmente e alcançar a temperatura ambiente. A infusão foi utilizada depois de retirados os resíduos macroscópicos da planta.

3.2. Desenvolvimento do Experimento

No terceiro dia após o sacrifício da rã realizava-se o experimento. Uma amostra de muco era coletada na extremidade posterior do palato com estilete e imediatamente imersa em óleo mineral para prevenir a desidratação. A coleta da secreção era feita antes da primeira nebulização, garantindo a integridade do muco autólogo. O palato era então colocado sobre uma placa de polietileno acolchoada com gaze umedecida com Ringer rã, em câmara de acrílico (41 x 21 x 26,5 cm), em temperatura ambiente (25° C), sob nebulização durante 50 minutos. A umidificação da câmara era feita com Ringer rã, através de nebulizador ultrassônico (ICEL, US 800), mantendo umidade relativa de 100%.

3.2.1. Velocidade de transporte mucociliar (VTM)

A VTM foi avaliada através da medida do deslocamento de amostra de muco autólogo encimada por uma partícula de carvão vegetal, colocada sobre a superfície epitelial do palato de rã, sob a óptica de um microscópio estereoscópico ZEISS equipado com uma ocular reticulada (Figuras 6 e 7). As amostras de muco foram lavadas em éter de petróleo para retirada do óleo mineral antes de serem colocadas sobre o epitélio do palato de rã. O muco se movimentava no sentido céfalo-caudal do palato.

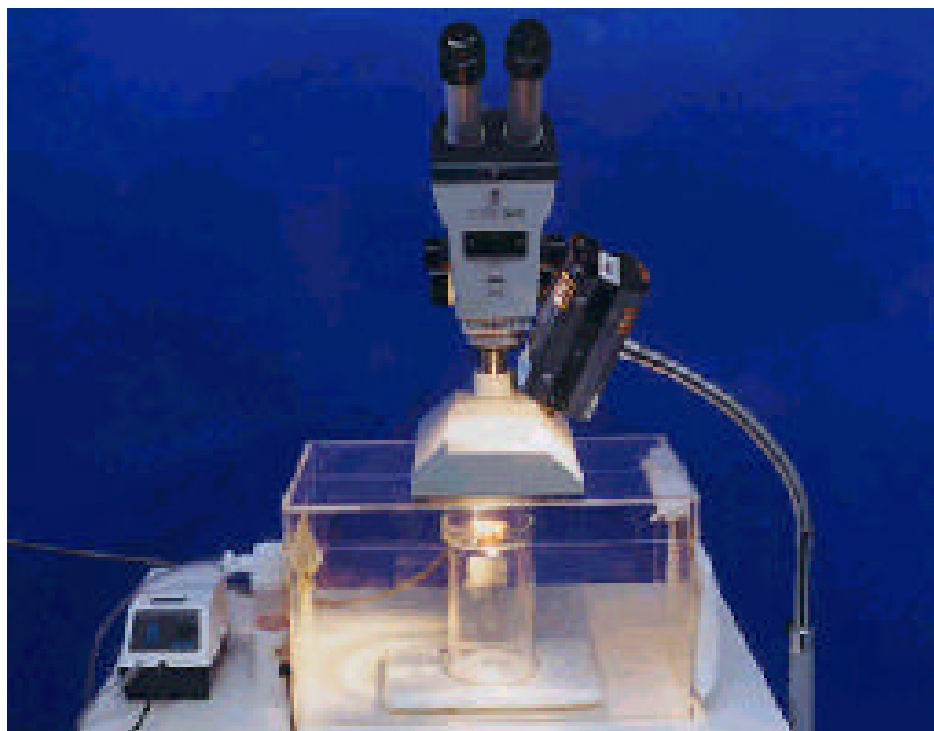


FIGURA 6 - SISTEMA PARA MEDIDA DA VELOCIDADE DE TRANSPORTE MUCOCILIAR (VTM) NO PALATO ISOLADO DE RÃ.



FIGURA 7 - DETALHE DO PALATO ISOLADO DE RÃ SOB A OCULAR DO MICROSCÓPIO.

A VTM, expressa em milímetros por segundo (mm/s), foi calculada através da divisão da distância percorrida pela partícula de carvão (6mm na ocular reticulada) durante o tempo, cronometrado em segundos (cronômetro TIMEX Triathlon). Foram repetidas cinco medições, obtendo-se a média utilizada para cálculo em cada tempo e concentração de infusão analisados no estudo.

3.2.2. Frequência de batimento ciliar (FBC)

A FBC foi medida em Hertz (Hz), utilizando-se a técnica modificada e descrita por MACCHIONE (1998). Para esta mensuração no epitélio do palato de rã utilizamos um aparelho composto por uma câmara filmadora (SONY- 3CCD – *color video camera*), acoplada a um microscópio de luz

(OLYMPUS BX 50), sob o qual o palato de rã era colocado (Figura 8). Um estroboscópio emitindo *flashes* a uma frequência conhecida era direcionado para a superfície do epitélio. O equipamento possui um programa de computador que permite controlar a frequência da emissão dos *flashes*. A imagem do epitélio, iluminado pela luz estroboscópica e capturada pela câmara filmadora era transmitida para um monitor que permitia, então, uma perfeita visualização do epitélio e do batimento ciliar. Visualizando o epitélio, diminuíamos a frequência da luz do estroboscópio até não conseguirmos ver o movimento dos cílios, significando que o batimento ciliar era concordante com a frequência da luz emitida. A frequência era então anotada, conforme se apresentava no monitor pequeno do sistema, e o processo era repetido três vezes em áreas diferentes do epitélio.

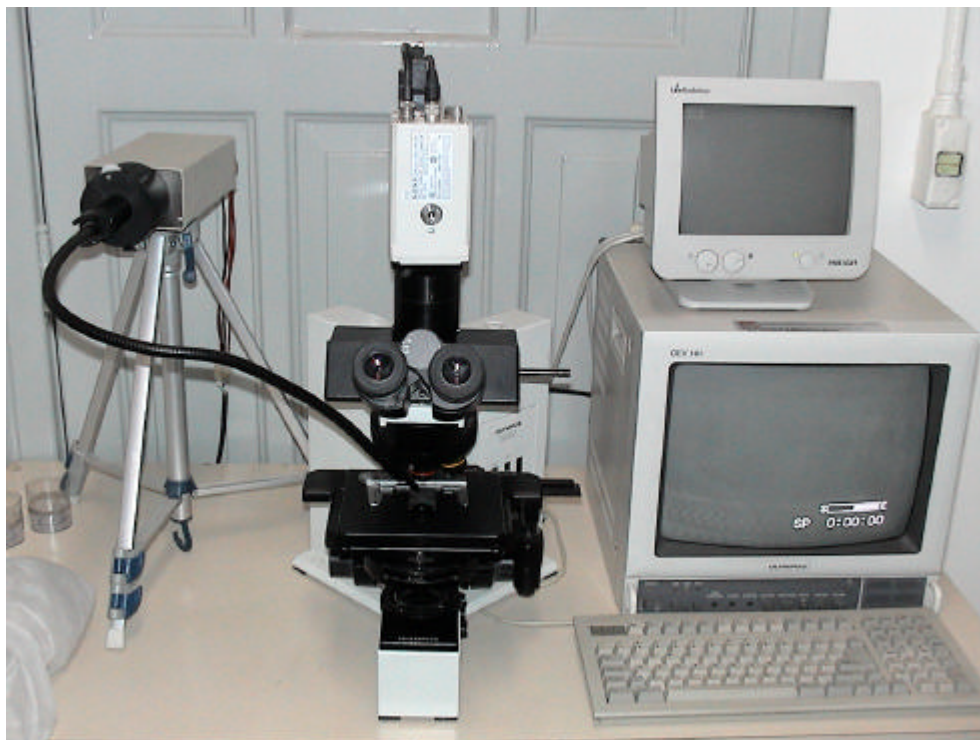


FIGURA 8 - SISTEMA PARA MEDIDA DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR (FBC).

3.2.3. Diferença de potencial transepitelial (DPT)

A DPT foi medida através da técnica de KNAUF et al. (1984) modificada em nosso laboratório. Utilizamos dois microeletrodos flexíveis (pontes de agar), saturados com cloreto de potássio (KCl) conectados a duas semi-células de calomelano, sendo uma de referência e outra de teste, ambas ligadas a um voltímetro aterrado de grande *input* (PROCYON) (Figura 9). O eletrodo de referência foi colocado na submucosa e o de teste, acima da superfície epitelial, na intersecção da região cefálica. Foram feitas três medidas, expressas em milivolts (mV), para obtenção da média para análise estatística.



FIGURA 9 - VOLTÍMETRO PARA MEDIDA DA DIFERENÇA DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL (DPT) NO PALATO ISOLADO DE RÃ.

3.2.4. Estudo histológico do palato de rã

Ao término dos experimentos para medida da velocidade de transporte mucociliar, da frequência de batimento ciliar *in situ* e da diferença de potencial transepitelial, foram coletadas amostras do epitélio de todos os palatos, fixadas em solução de formaldeído tamponado 4% para processamento histológica em blocos de parafina. As lâminas foram divididas e coradas através de *hematoxilina-eosina* (HE), para análise das características do epitélio e lâmina própria em microscopia de luz, e pela solução de ácido periódico Schiff e Alcian Blue (PAS/AB). A última cora em vermelho o muco neutro (PAS+) e em azul o muco ácido (AB+) (JONES; REID, 1978). Utilizamos microscópio ZEISS.

Foram colhidas amostras de dois palatos de cada grupo, fixadas em glutaraldeído 2% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1,3% para estudo da ultra-estrutura em microscopia eletrônica de transmissão. Utilizamos o microscópio eletrônico JEOL 1010, com magnificação de 8.000 a 80.0000 vezes.

3.3. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando modelos generalizados lineares para medidas repetidas, tendo como variáveis dependentes os parâmetros: velocidade de transporte mucociliar, frequência de batimento ciliar e diferença de potencial transepitelial. Como termos explicativos foram considerados os diferentes tempos de observação (0, 5 e 20 minutos de tratamento) e as diferentes concentrações da infusão de *Luffa operculata*. Foi também incorporada como variável independente um termo de interação entre tempo e concentração.

O nível de significância crítico foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Os cálculos estatísticos, tanto descritivos (médias, desvio padrão e gráficos) como os modelos generalizados lineares, foram efetuados pelo programa SPSS versão 10.0 para Windows.

4. RESULTADOS

Procedendo ao estudo dos palatos de rã tratados com as diferentes concentrações da infusão de *Luffa operculata* observamos nítido aumento macroscópico da quantidade de muco após a imersão, entremeado muitas vezes por bolhas de ar. Esse aumento relacionou-se com a concentração da infusão, intensificando-se nos palatos tratados com 600 mg/l e 1200 mg/l de infusão de *Luffa operculata* em Ringer rã (Grupos 3 e 4 respectivamente) e 600 mg/l de água (Grupo 5). Este muco pôde ser observado na medição da velocidade de transporte mucociliar (VTM) e da freqüência de batimento ciliar (FBC).

Observamos também variação relacionada ao tempo de recuperação do batimento ciliar após a imersão. Conforme a infusão foi mais concentrada (Grupos 3, 4 e 5), evidenciamos macroscopicamente a estase do muco sobre o palato, traduzindo-se em ausência de transporte mucociliar e paralisia dos cílios nos primeiros momentos após sua retirada da infusão, o que durava cerca de 1 a 3 minutos. A VTM e a FBC se recuperavam lentamente depois disto.

4.1. Velocidade de transporte mucociliar (VTM)

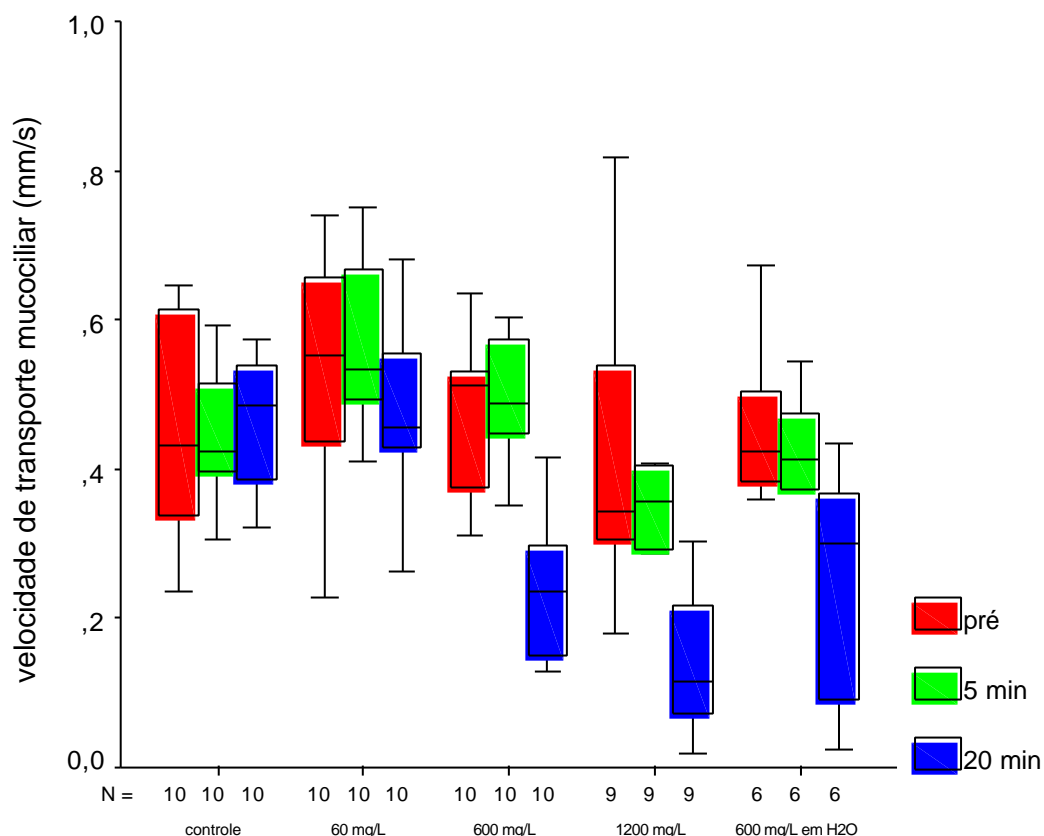
A Tabela 1 mostra a análise descritiva dos parâmetros obtidos para VTM nos tempos 0, 5 e 20 minutos em termos de média, desvio padrão e número de palatos avaliados. O Gráfico 1 ilustra esses dados na forma de caixas (*box plot*).

Como pode ser visto, houve significativa redução da VTM, acentuada em função da dose da infusão e do tempo de imersão do palato de rã. Os modelos generalizados lineares demonstraram um efeito significativo de tempo ($p < 0,001$) e interação entre tempo e tratamento ($p < 0,002$).

TABELA 1 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA VELOCIDADE DE TRANSPORTE MUCOCILIAR (VTM) NO PALATO ISOLADO DE RÃ EM RELAÇÃO AO TEMPO DE IMERSÃO EM INFUSÃO DE *Luffa operculata* (mm/s)

tempo de imersão (minutos)	concentração da infusão (mg/l)	média da VTM (mm/s)	desvio padrão da VTM	número de palatos
0	controle (Ringer rã)	0,4593	0,1458	10
0	60 em Ringer rã	0,5359	0,1517	10
0	600 em Ringer rã	0,4752	0,1109	10
0	1200 em Ringer rã	0,4295	0,2032	9
0	600 em água	0,4617	0,1153	6
0	Total	0,4742	0,1481	45
5	controle (Ringer rã)	0,4413	8,748E-02	10
5	60 em Ringer rã	0,5596	0,1057	10
5	600 em Ringer rã	0,4719	0,1249	10
5	1200 em Ringer rã	0,3491	0,1388	9
5	600 em água	0,4032	0,1150	6
5	Total	0,4509	0,1314	45
20	controle (Ringer rã)	0,4610	9,428E-02	10
20	60 em Ringer rã	0,4670	0,1491	10
20	600 em Ringer rã	0,2422	9,975E-02	10
20	1200 em Ringer rã	0,1446	9,677E-02	9
20	600 em água	0,2529	0,1607	6
20	Total	0,3227	0,1753	45

GRÁFICO 1 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA VELOCIDADE DE TRANSPORTE MUCOCILIAR (VTM) NO PALATO ISOLADO DE RÃ EM RELAÇÃO AO TEMPO DE IMERSÃO EM INFUSÃO DE *Luffa operculata* (mm/s)



4.2. Frequência de batimento ciliar (FBC)

A Tabela 2 mostra a análise descritiva dos valores da FBC para os diferentes tempos de observação e as diferentes concentrações da *Luffa operculata*, em termos de média, desvio padrão e número de palatos.

A análise estatística mostrou que há efeito de tempo, além de interação de tempo e tratamento sobre a frequência de batimento ciliar (FBC), ou seja, os tratamentos com infusão de *Luffa operculata* não se comportam igualmente no tempo.

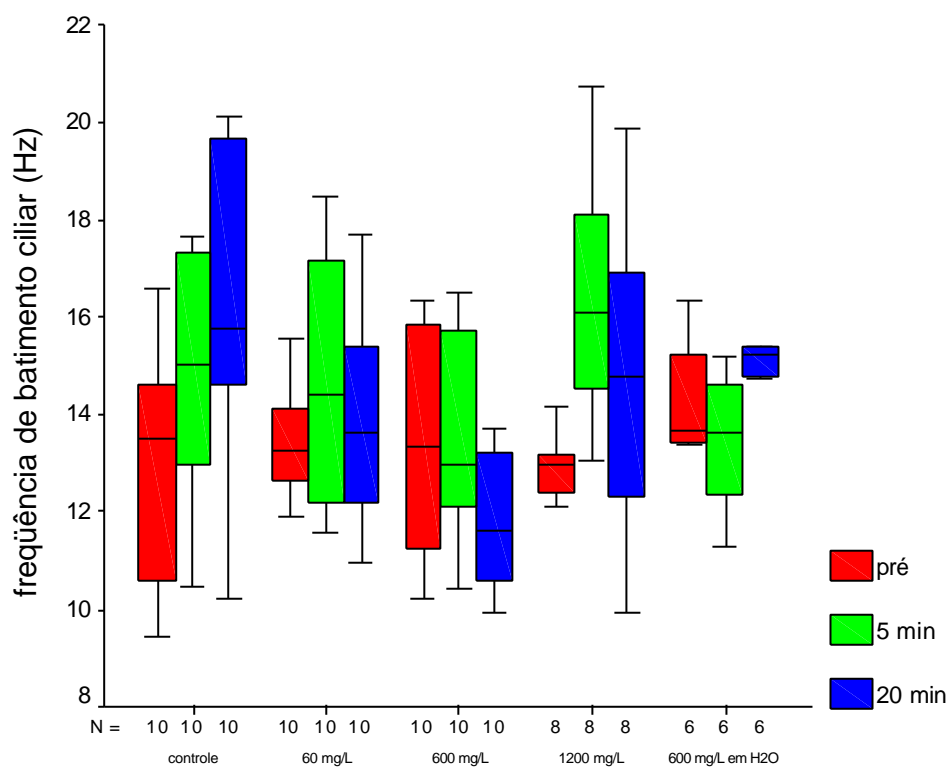
TABELA 2 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR (FBC) NO PALATO ISOLADO DE RÃ EM RELAÇÃO AO TEMPO DE IMERSÃO EM INFUSÃO DE *Luffa operculata* (Hz)

tempo de imersão (minutos)	concentração da infusão (mg/l)	média da FBC (Hertz)	desvio padrão da FBC	número de palatos
0	controle (Ringer rã)	13,0677	2,3543	10
0	60 em Ringer rã	13,4800	1,2071	10
0	600 em Ringer rã	13,2070	2,2885	10
0	1200 em Ringer rã	12,7229	1,0409	8
0	600 em água	14,2844	1,2236	6
0	total	13,2963	1,7694	44
5	controle (Ringer rã)	14,6740	2,5550	10
5	60 em Ringer rã	14,5920	2,4402	10
5	600 em Ringer rã	13,5600	2,1634	10
5	1200 em Ringer rã	16,4142	2,5301	8
5	600 em água	13,4444	1,4733	6
5	total	14,5509	2,4363	44
20	controle (Ringer rã)	16,3367	3,1575	10
20	60 em Ringer rã	14,0337	2,3006	10
20	600 em Ringer rã	12,2233	2,2629	10
20	1200 em Ringer rã	14,7288	3,2814	8
20	600 em água	15,7606	1,6691	6
20	total	14,5075	2,9351	44

Observamos no grupo controle (Grupo 1) um achado consistente visto em outros trabalhos já realizados neste laboratório, que é o efeito de melhora da FBC quando os palatos são expostos à solução fisiológica para rã (Ringer rã) por mais tempo. Esta característica restauradora foi perdida nos palatos tratados com infusão de *Luffa operculata* (Grupos 2, 3, 4 e 5), mesmo que diluída (Grupo 2).

Detectamos um efeito significativo de tempo ($p < 0,007$) e interação entre tempo e tratamento ($p < 0,008$) sobre a FBC. O Gráfico 2 representa esses dados em esquema *box plot*, incluindo o efeito ascendente da FBC durante a imersão prolongada em Ringer rã (grupo controle).

GRÁFICO 2 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR (FBC) NO PALATO ISOLADO DE RÃ EM RELAÇÃO AO TEMPO DE IMERSÃO EM INFUSÃO DE *Luffa operculata* (Hz). Min: minutos. Hz: Hertz



4.3. Diferença de potencial transepitelial (DPT)

Os palatos do Grupo 1 (grupo controle) mantêm sua DPT em níveis praticamente constantes, em torno de -1,6 mV, com pequenas oscilações ao longo do tempo. Depois de 5 minutos de imersão do palato em altas

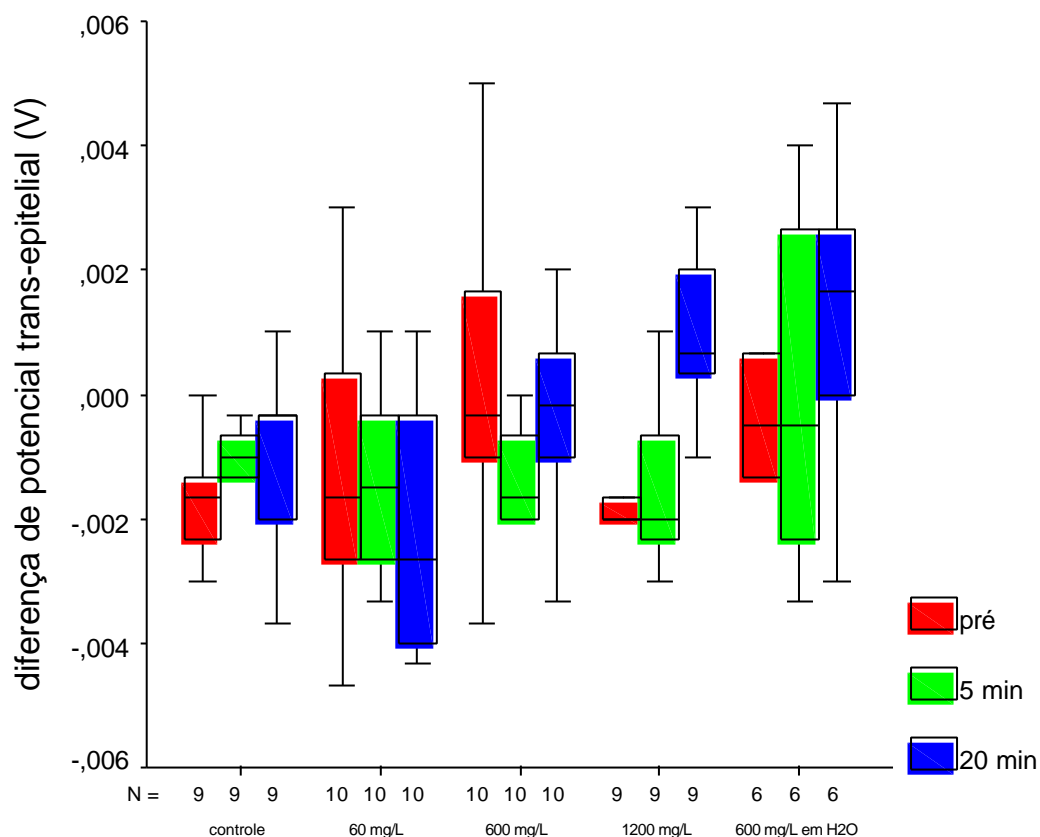
concentrações de infusão de *Luffa operculata*, em Ringer rã (Grupos 3 e 4) e em água (Grupo 5), a voltagem medida tendeu a positiva.

O efeito de tempo e a interação entre tempo e tratamento foram significativos ($p < 0,048$ e $p < 0,007$ respectivamente). A Tabela 3 e o Gráfico 3 ilustram esses resultados.

TABELA 3 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DIFERENÇA DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL (DPT) NO PALATO ISOLADO DE RÃ EM RELAÇÃO AO TEMPO DE IMERSÃO EM INFUSÃO DE *Luffa operculata* (mV)

tempo de imersão (minutos)	concentração da infusão (mg/l)	média da DDP (mV)	desvio padrão da DPT	número de palatos
0	controle (Ringer rã)	-1,6300E-03	1,060E-03	9
0	60 em Ringer rã	-1,2501E-03	2,196E-03	10
0	600 em Ringer rã	1,324E-04	2,375E-03	10
0	1200 em Ringer rã	-1,4452E-03	1,878E-03	9
0	600 em água	-4,4283E-04	3,538E-03	6
0	total	-9,4343E-04	2,234E-03	44
5	controle (Ringer rã)	-1,1111E-03	1,131E-03	9
5	60 em Ringer rã	-1,4320E-03	1,441E-03	10
5	600 em Ringer rã	-2,1007E-03	2,837E-03	10
5	1200 em Ringer rã	-9,2556E-04	2,196E-03	9
5	600 em água	1,667E-06	2,836E-03	6
5	total	-1,2193E-03	2,147E-03	44
20	controle (Ringer rã)	-9,9889E-04	1,465E-03	9
20	60 em Ringer rã	-2,2990E-03	1,895E-03	10
20	600 em Ringer rã	-2,6600E-04	1,463E-03	10
20	1200 em Ringer rã	8,526E-04	1,708E-03	9
20	600 em água	1,278E-03	2,594E-03	6
20	total	-4,3861E-04	2,136E-03	44

GRÁFICO 3 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA DIFERENÇA DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL (DPT) NO PALATO ISOLADO DE RÃ EM RELAÇÃO AO TEMPO DE IMERSÃO EM INFUSÃO DE *Luffa operculata* (V). Min: minutos. V: Volts



4.4. Estudo histológico do palato de rã

Amostras do tecido epitelial de todos os palatos foram colhidas logo após o experimento e estudadas de forma qualitativa em microscopia de luz. Foram colhidas amostras de dois palatos de cada um dos grupos para estudo histológico à microscopia eletrônica de transmissão.

Nos palatos do grupo controle (Grupo 1) pudemos evidenciar a integridade do epitélio, com presença de cílios e a camada de muco

preservada, submucosa presente e células de muco sem conteúdo. (Figuras 10 e 11). À microscopia eletrônica, as células estavam alinhadas lado a lado, unidas por desmossomos e *tight junctions*. (Figuras 12, 13 e 14).

As anormalidades no epitélio se acentuaram gradualmente conforme aumento da concentração da infusão estudada. O Grupo 5, com palatos imersos na infusão feita em água, teve resultados mais próximos aos do Grupo 4 (infusão concentrada de *Luffa operculata* em Ringer rã).

Nos palatos tratados nas infusões concentradas observamos com freqüência, à microscopia de luz, o epitélio irregular, com presença de grande quantidade de muco nas glândulas e sobre o epitélio. Por vezes dramaticamente desorganizado, o epitélio apresentava edema intercelular e fendas, resultado de rotura epitelial. (Figuras 15, 16 e 17).

À microscopia eletrônica, observamos perda de cílios e espaços intercelulares alargados à custa de edema intercelular, corroborando o achado de alteração no transporte iônico e de fluidos. (Figuras 18 e 19).

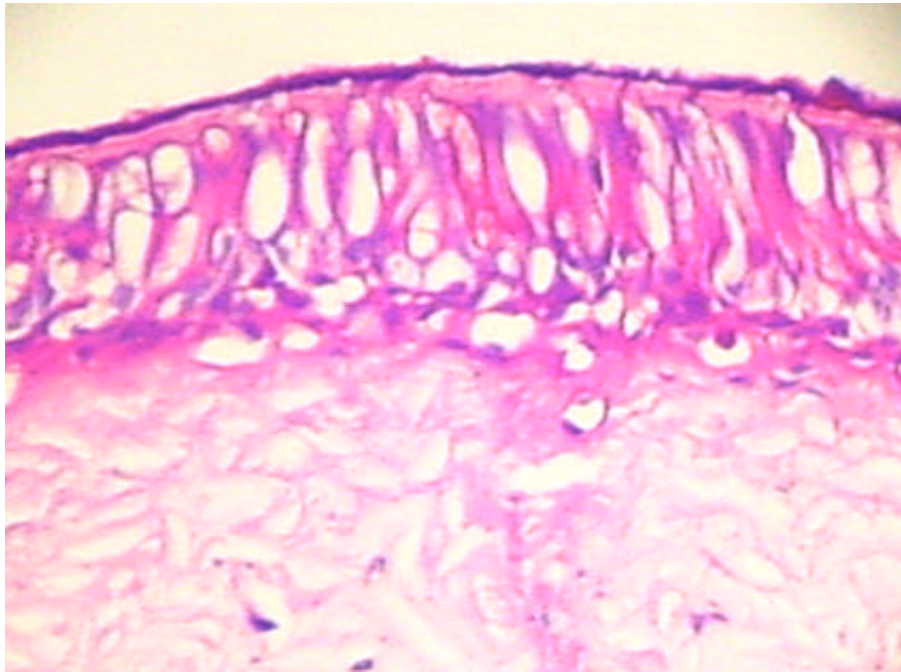


FIGURA 10 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 1 EXIBINDO ASPECTO NORMAL: CAMADA DE MUCO EM CONTATO COM A SUPERFÍCIE EPITELIAL E LÂMINA PRÓPRIA PRESERVADAS. (MICROSCOPIA DE LUZ, COLORAÇÃO PAS-AB, AUMENTO 100 VEZES).

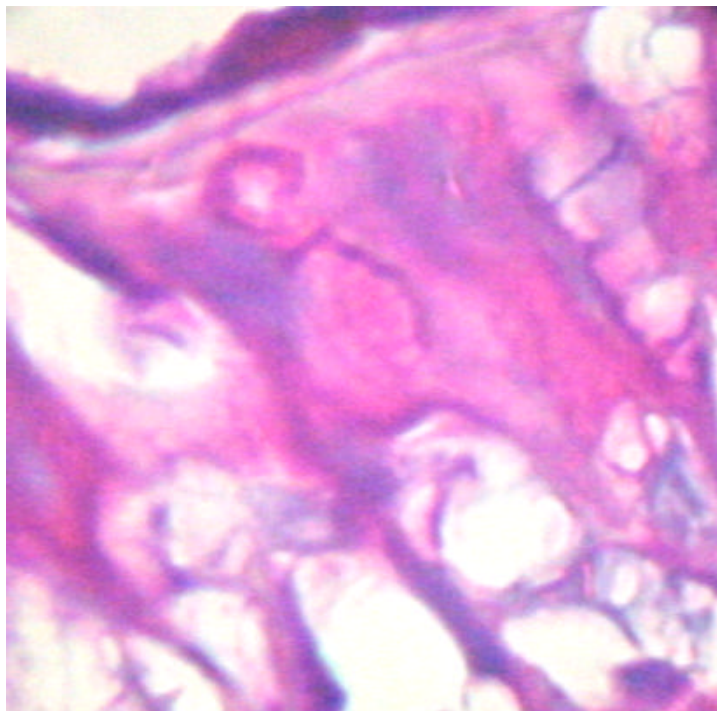


FIGURA 11 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 1 EXIBINDO DETALHES DAS GLÂNDULAS DA LÂMINA PRÓPRIA. (MICROSCOPIA DE LUZ, COLORAÇÃO PAS-AB, AUMENTO 400 VEZES).

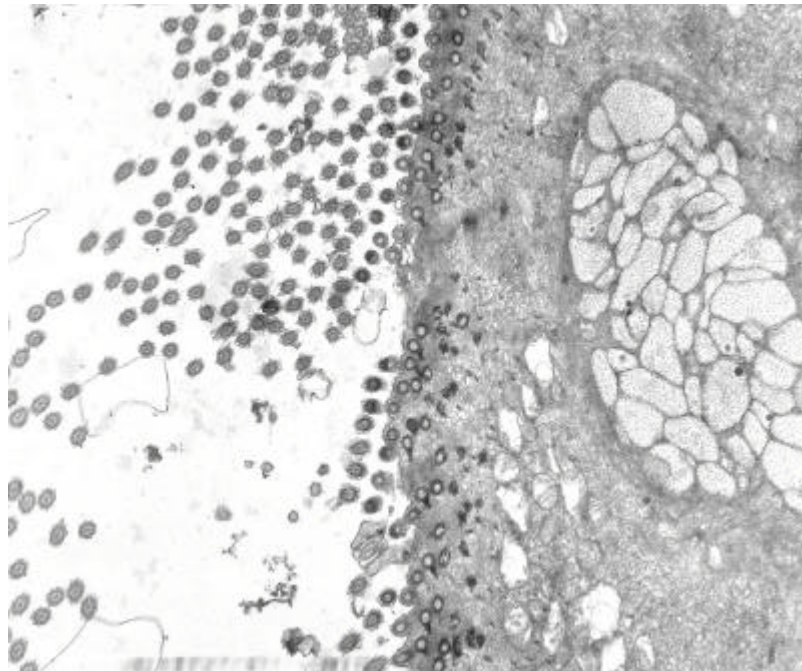


FIGURA 12 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 1 EXIBINDO CÍLIOS EM CORTE TRANSVERSAL E MUCO CONTIDO EM CORTE DE CÉLULA MUCOSA. (MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO, AUMENTO 8.000 VEZES)

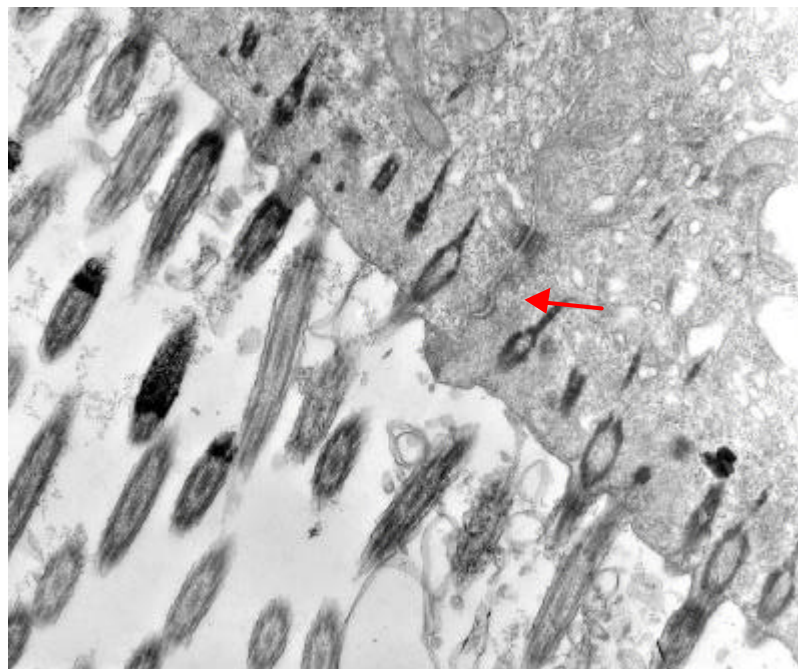


FIGURA 13 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 1 EXIBINDO CÍLIOS EM CORTE LONGITUDINAL E *TIGHT JUNCTION* ÍNTEGRA (SETA) ENTRE DUAS CÉLULAS CILIADAS CONTÍGUAS. (MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO, AUMENTO 20.000 VEZES)

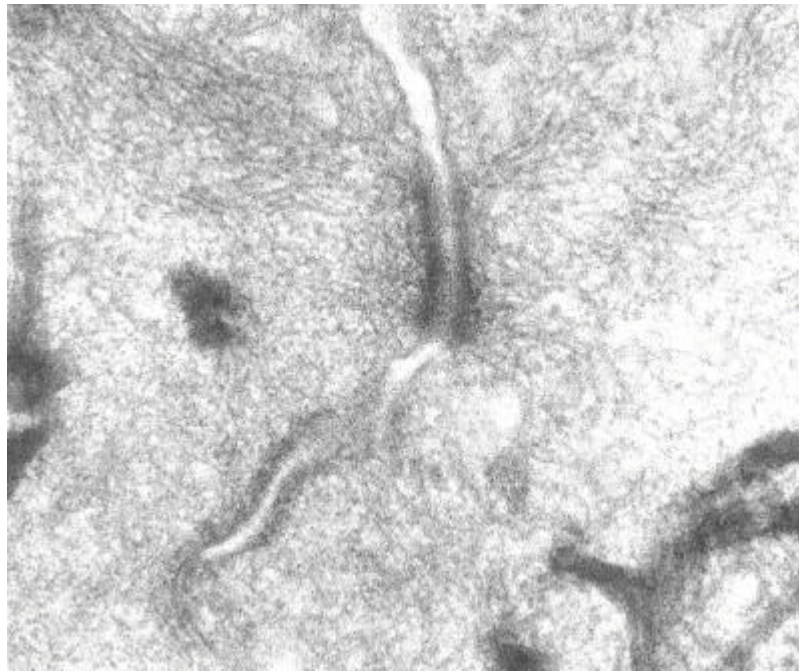


FIGURA 14 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 1 MOSTRANDO DETALHES DE UM DESMOSSOMO, LADEADO POR FILAMENTOS INTERMEDIÁRIOS DE CITOQUERATINA. (MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO, AUMENTO 80.000 VEZES).

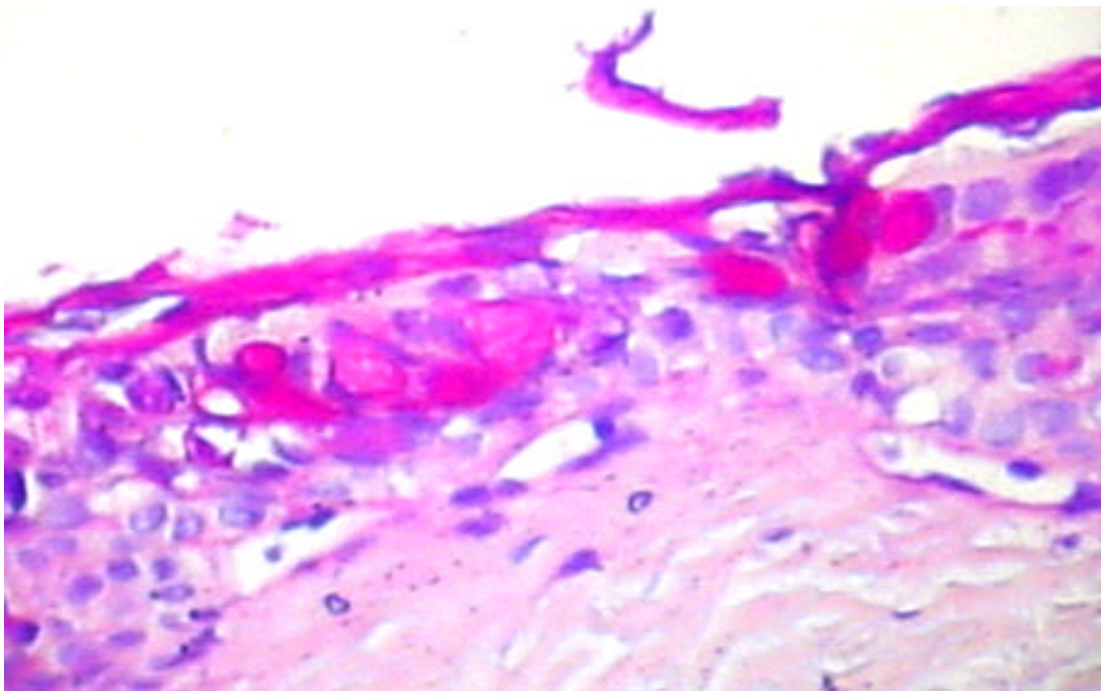


FIGURA 15 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 5 EXIBINDO DESORGANIZAÇÃO DO EPITÉLIO E AUMENTO DO VOLUME DE MUCO EXTRUSADO. (MICROSCOPIA DE LUZ, COLORAÇÃO PAS-AB, AUMENTO 100 VEZES)

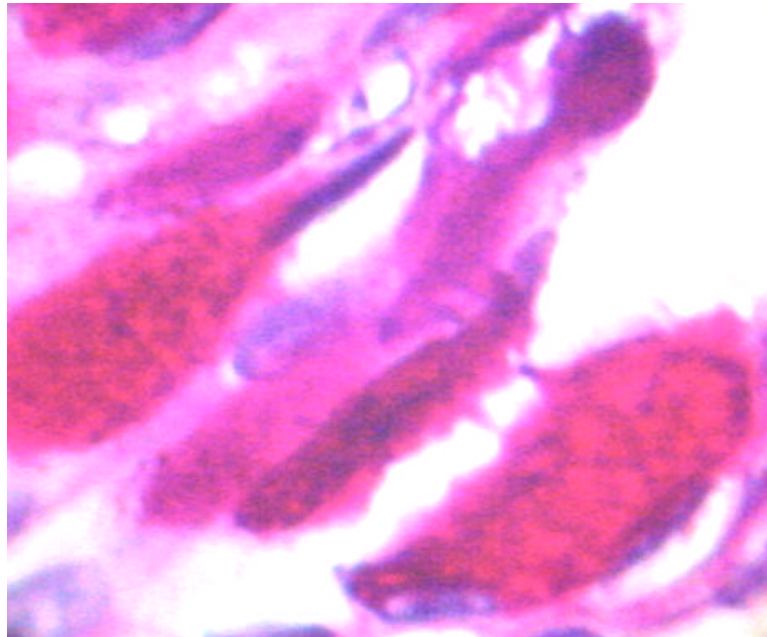


FIGURA 16 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 4, EXIBINDO DESTRUÇÃO EPITELIAL, VACUOLIZAÇÃO CELULAR E AUMENTO DO ESPAÇO INTERCELULAR . (MICROSCOPIA DE LUZ, COLORAÇÃO PAS-AB, AUMENTO 400 VEZES)

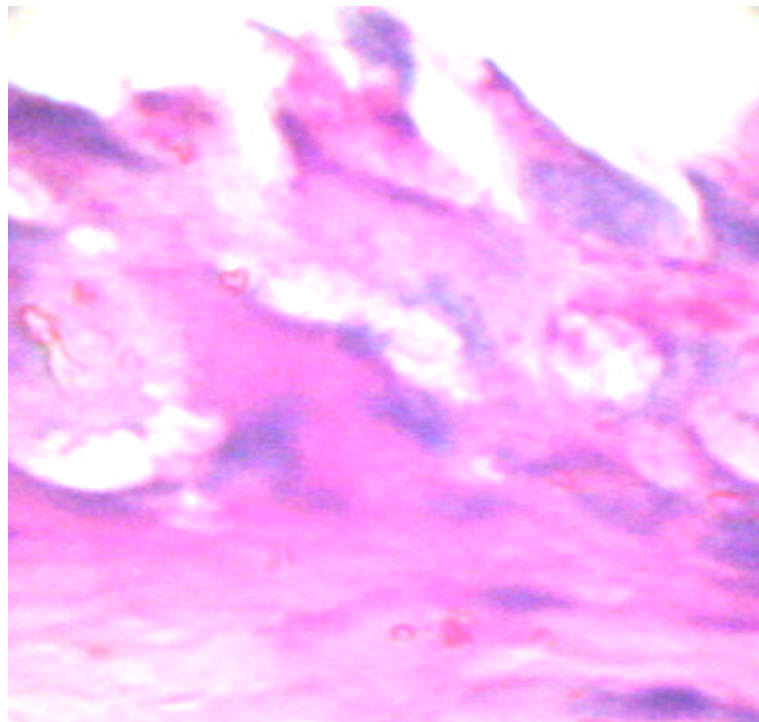


FIGURA 17 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 4 EXIBINDO DESORGANIZAÇÃO EPITELIAL, EDEMA CELULAR E EXTRUSÃO COMPLETA DO MUCO. (MICROSCOPIA DE LUZ, COLORAÇÃO PAS-AB, AUMENTO 400 VEZES).

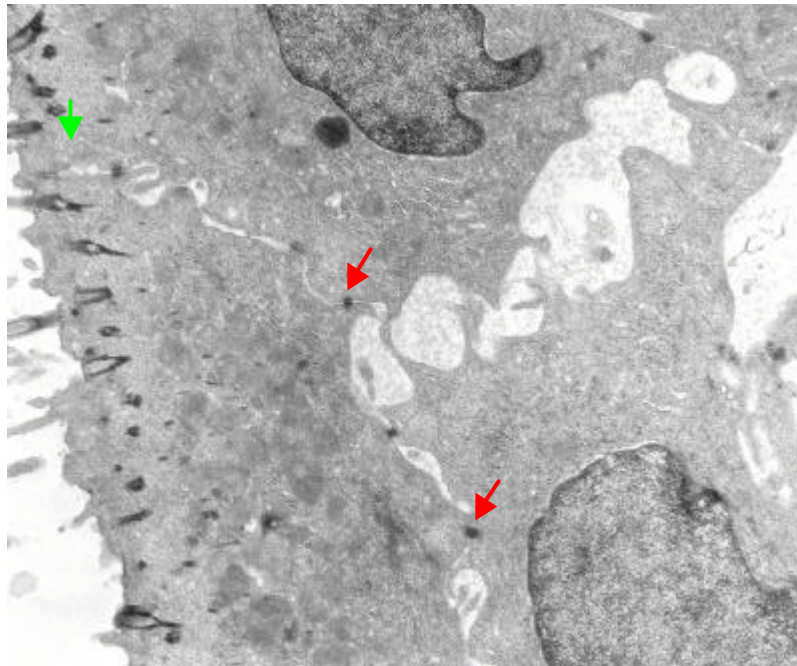


FIGURA 18 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 5 EXIBINDO AUMENTO DO ESPAÇO INTERCELULAR PRESENÇA DE JUNÇÕES INTERCELULARES: DESMOSSOMOS (SETA VERMELHA) E *TIGHT JUNCTION* (SETA VERDE). O AUMENTO DO TRÂNSITO DE FLUIDO PARA O EXTRACELULAR É EVIDÊNCIA MORFOLÓGICA DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE DA BARREIRA EPITELIAL. (MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO, AUMENTO 10.000 VEZES).

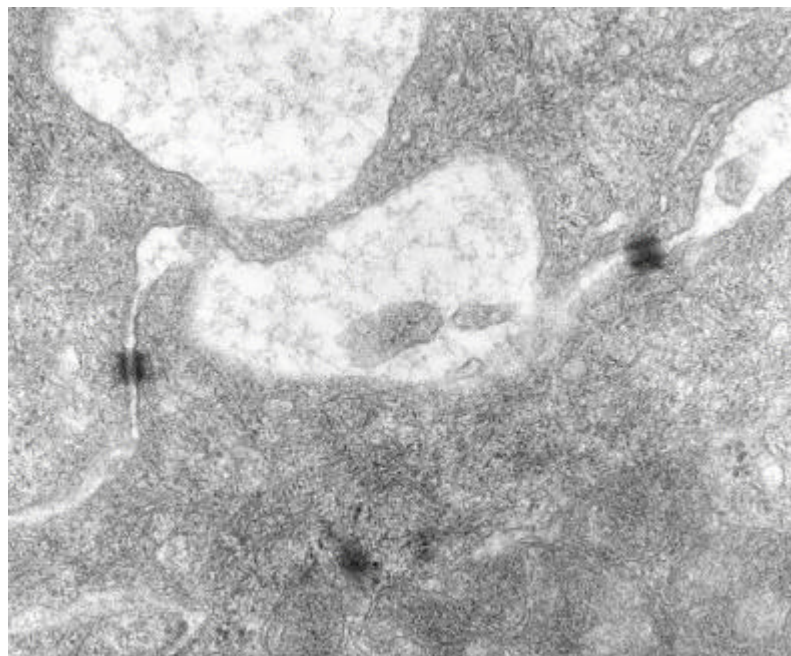


FIGURA 19 - LÂMINA DE EPITÉLIO DE PALATO DE RÃ DO GRUPO 5, DETALHE DA LÂMINA ACIMA, EXIBINDO DOIS DESMOSSOMOS E AUMENTO DO ESPAÇO INTERCELULAR À CUSTA DE MATERIAL FLUIDO CONTENDO PROTEÍNAS (FLOCULAÇÃO). (MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO, AUMENTO 40.000 VEZES).

5. DISCUSSÃO

O tratamento das rinites e rinosinusites com a inalação ou instilação nasal da infusão de *Luffa operculata* ("buchinha-do-norte") é uma prática muito antiga e comum na população leiga (MATOS, 1979, VASQUES et al, 1986, MENON-MIYAKE et al., 2003a). Salientamos que há um único medicamento à base *Luffa operculata* disponível no mercado brasileiro (SALVIANO, 1992 b), de tal forma que o fruto seco da planta rotineiramente é adquirido de raizeiros do comércio informal para preparo caseiro da infusão. Em contrapartida, em diversos países da Europa, especialmente na Alemanha, existem vários medicamentos alopáticos e homeopáticos formulados com *Luffa operculata*, apesar desta não constar da Comissão E, principal guia terapêutico de plantas medicinais do mundo. (AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1999).

Apesar da utilização popular da *Luffa operculata* e dos relatos informais de efeitos adversos - epistaxe, irritação nasal, alterações do olfato e até necrose da pirâmide nasal após período prolongado de utilização -, é notória a escassez de estudos científicos sobre a planta. A descrição de liberação profusa de muco nasal em consequência do uso da *Luffa*

operculata (MATOS, 1979) é um indício de seu efeito direto sobre o aparelho mucociliar nasal, aspecto que merece elucidação científica.

Este trabalho avaliou de maneira sistemática, através de um modelo experimental *ex vivo*, os efeitos da infusão de *Luffa operculata* sobre o epitélio respiratório. Estudamos três parâmetros que contemplam diferentes propriedades do transporte mucociliar: a velocidade de transporte mucociliar (indicador da integridade do muco, cílios e de seu acoplamento), a frequência de batimento ciliar (motor do sistema) e a diferença de potencial transepitelial (que reflete o equilíbrio iônico e hídrico do epitélio). Observamos alteração consistente dos três parâmetros supracitados, posteriormente corroborada no estudo morfológico qualitativo do epitélio do palato de rã.

5.1. *Luffa operculata*

Destacamos a presença de espuma na preparação da infusão utilizada no experimento, reflexo da presença de saponina na composição química da *Luffa operculata*. MATOS (1979) refere que a saponina emulsifica os compostos lipossolúveis ativos da mucosa, facilitando a absorção e ação das cucurbitacinas e glicosídeos pela a mucosa. É possível que emulsificação não seja o termo químico mais adequado, pois o que ocorre é uma alteração da tensão superficial da mucosa, própria da ação das saponinas, provocando polarização. Isto resulta em efeito cáustico no

tecido. A saponina é o componente verdadeiramente irritante que gera processo inflamatório, e pode levar a graves alterações da mucosa se a *Luffa operculata* for usada por longo prazo.

Nosso estudo demonstrou que a infusão de *Luffa operculata* tem efeito deletério sobre o epitélio pseudoestratificado colunar ciliado do palato de rã em condições de normalidade. Esta tendência foi observada na dose da infusão preconizada informalmente pela população, porém vários fatores coadjuvantes devem ser considerados.

O fato de a infusão ser feita com água potencializa a toxicidade da planta sobre o epitélio respiratório. Os dados obtidos no grupo de infusão com água (Grupo 5) mais se assemelham ao grupo examinado com infusão concentrada em Ringer rã (Grupo 4), comparativamente ao Grupo 3, com a mesma concentração de *Luffa operculata* em relação ao solvente.

Além disso, é grande a margem de erro na transmissão informal de uma receita baseada apenas na tradição popular, que permite a variação da concentração e o modo de uso terapêutico da infusão da *Luffa operculata*. Essa variabilidade aumenta quando se utiliza um fruto seco maior ou uma quantidade menor de água e quando há excesso de evaporação (decoção), concentrando a solução.

Lembramos ainda que em grande parte das vezes, a infusão popular é usada para inalação, e mesmo assim as propriedades cáusticas do princípio ativo são mantidas, demonstrando que este é volátil e termorresistente.

Assim, deduzimos que a preparação caseira de *Luffa operculata* possa ser especialmente tóxica para o epitélio nasal humano, agravando os distúrbios do transporte mucociliar nasal que decorrem de condições patológicas como as rinites e rinossinusites (JEFFERY; LI, 1997). Os princípios ativos da planta poderiam complicar o processo inflamatório pré-existente na mucosa, provocado pela doença de base, seus agentes etiológicos, e, eventualmente, piorado por componentes de medicamentos – vasoconstritores e conservantes, por exemplo – já usados pelo paciente (YUN et al., 1999, MERKUS et al., 2001).

5.2. Modelo experimental do palato de rã

Optamos pelo modelo experimental do palato de rã, uma preparação pouco familiar aos otorrinolaringologistas, porém muito usado nos estudos de fisiopatologia do epitélio respiratório (RUBIN et al., 1990, PUCHELLE et al., 1982, FESTA, 1993, MACCHIONE, 1998). Este modelo mostra-se muito útil para outros estudos relativos ao epitélio e ao aparelho mucociliar, razão pela qual o recomendamos junto a esses especialistas e demais pesquisadores das vias respiratórias. Reiteramos que o modelo do palato isolado de rã é excelente pela praticidade e facilidade de observação da atividade mucociliar.

ROGERS (2000) descreve a predominância do sistema nervoso parassimpático sobre a produção de muco, estudada por AGUIAR;

NEVES-PINTO (1975) com relação à *Luffa operculata* em outro modelo animal. Não pudemos inferir sobre as influências neurais à produção de muco, tampouco avaliar componentes da resposta inflamatória neste modelo *ex vivo*.

5.3. Velocidade de transporte mucociliar (VTM)

Observamos durante o estudo que os palatos tratados com infusão de *Luffa operculata* secretavam mais muco logo após retirados da solução. Os resultados da nossa pesquisa, se extrapolados para seres humanos, correspondem assim ao achado da medicina popular quando da utilização da infusão de "buchinha-do-norte": aumento da liberação de muco nasal.

A eficiência do transporte mucociliar, que depende de uma união adequada entre cílios e muco (SLEIGH et al., 1988, MACCHIONE, 1998, BALBANI, 2001), é prejudicada com aumento exacerbado deste. Em condições normais somente o topo do cílio interage com o muco durante seu batimento efetivo, enquanto o movimento de recuperação é feito com o cílio imerso na camada sol, que apresenta uma pequena impedância. A espessura da camada sol é crítica para o transporte mucociliar: excesso do líquido promove um desacoplamento entre muco e cílio, enquanto a desidratação induz a ineficiência mecânica, fazendo que o cílio interaja com a camada gel também durante o movimento de recuperação (BASBAUM; WELSH, 1994, WANNER et al., 1996).

Em nosso experimento a diminuição da VTM, conforme visto na Tabela 1 e no Gráfico 1, pode se dever à fluidificação do muco por excesso de líquido extravasado do intracelular, o que promove o desacoplamento entre muco e cílios.

5.4. Freqüência de batimento ciliar (FBC)

Este método de avaliação, descrito em vários trabalhos e diferentes modelos (BRAGA et al., 1992, FESTA et al., 1995, MACCHIONE et al., 1995, FESTA et al., 1997, MACCHIONE et al., 1998), mostra-se muito útil no estudo de substâncias tóxicas e medicamentos tópicos nasais.

As alterações que observamos neste parâmetro demonstram que a infusão de *Luffa operculata* atua sobre os cílios - força motriz do transporte mucociliar - já a partir da menor concentração testada. Todas as concentrações de infusão estudadas diminuíram a capacidade de melhora do batimento, observada ao longo do tempo no grupo controle (Grupo 1) , conforme mostra o Gráfico 2. Este achado reforça a tese de ação tóxica da infusão de *Luffa operculata* sobre o epitélio respiratório.

5.5. Diferença de potencial transepitelial (DPT)

A medida da diferença de potencial transepitelial (DPT) é bastante útil para estudar a integridade bioelétrica do epitélio, que depende das ligações entre as células epiteliais, como as junções intercelulares do epitélio respiratório (BASBAUM; WELSH, 1994, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999, GONZÁLEZ-MARISCAL, 2003). Os valores da DPT representam a força potencial para manutenção de um fluxo iônico ativo através do epitélio, dependente da magnitude e direção da rede de íons que atravessam a membrana da célula (BASBAUM; WELSH, 1994, MACCHIONE, 1998, NAKAGAWA, 2002). Assim, as medidas de DPT servem como índices da integridade da membrana epitelial.

A positivação da voltagem corresponde a lesão epitelial importante, com destruição das *tight junctions* (BASBAUM; WELSH, 1994). Esse achado de nosso estudo (vide Tabela 3 e Gráfico 3) condiz com a lesão epitelial provocada pela imersão do palato em soluções de *Luffa operculata* mais concentradas (Grupos 4 e 5) e por tempo mais prolongado.

5.6. Estudo histológico do palato de rã

As anormalidades do epitélio, quando observadas de forma qualitativa à microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, acentuaram-se gradualmente conforme o aumento da concentração da infusão da planta

estudada. O Grupo 5, com palatos imersos na infusão feita em água, teve resultados mais próximos aos do Grupo 4 (infusão concentrada de *Luffa operculata* em Ringer rã), sugerindo que o solvente água potencializa as lesões epiteliais causadas pela planta.

RONCADA (2001), utilizando *Luffa operculata* 1%, não observa alterações epiteliais significativas à microscopia eletrônica após instilar a medicação por 14 dias na cavidade nasal de coelhos. Nota apenas perda de cílios, também observada no grupo controle. Enfatizamos que naquele estudo foi usada a preparação comercial à base de *Luffa operculata*, e não a solução empírica de utilização popular.

Em nosso estudo, encontramos anomalias epiteliais nos palatos tratados com infusão de *Luffa operculata*, havendo não apenas perda de cílios, mas também edema intercelular. Pelos achados histológicos podemos inferir que exista uma desestabilização das *tight junctions* e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade epitelial, o que interfere diretamente com a regulação da hipofase sol do muco e uma progressiva alteração da DPT. Isto sugere que a infusão concentrada de *Luffa operculata* afeta a integridade das junções intercelulares epiteliais e o equilíbrio iônico local (MACCHIONE et al., 1998).

Os achados histológicos, em especial à microscopia eletrônica de transmissão, confirmaram os resultados dos demais métodos de avaliação funcional do transporte mucociliar no palato de rã, esclarecendo os mecanismos pelos quais ocorre o fenômeno de rinorréia profusa provocada pela *Luffa operculata*, já observado há décadas. Embora SILVA (1983)

avente a possibilidade disto ocorrer em função da congestão mucosa, seguida de aumento da permeabilidade capilar e aumento da fluidez do muco já produzido. Em nosso experimento verificamos a liberação de muco intraepitelial.

5.7. Considerações finais

Este estudo foi concebido em um contexto de aumento do interesse da população pelas diversas práticas da Medicina complementar. Avultam-se as somas gastas em tratamentos alternativos em todo o planeta. Embora a ciência médica evolua cada vez mais, a população de muitos países, inclusive do nosso, independentemente do nível sócio-econômico e cultural, atribui poderes medicinais a plantas que jamais foram alvo de qualquer estudo científico, erroneamente considerando-as inócuas. Neste sentido, é fator agravante que, no Brasil, as plantas medicinais sejam extremamente acessíveis e de baixo custo, se considerarmos os riscos inerentes à sua utilização inadequada e eventual toxicidade. Em vista destes fatos, é nítido que as universidades e as instituições de pesquisa não podem mais ignorar a Medicina complementar e as plantas medicinais.

Luffa operculata é apenas uma dentre estimadas 55.000 espécies de plantas medicinais brasileiras (CARLINI, 1983). Os relatos sobre a planta e suas características vão se complementando ao longo do tempo (CHAMPNEY et al., 1974, MATOS, 1979, AGUIAR, NEVES-PINTO, 1985,

CACERES, 1996, SALVIANO, 1992a, DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002, LORENZI; MATOS, 2002; ALONSO, 2003), assim como estudos sobre outras cucurbitáceas (NASEEM; PATIL, 1998, POMA et al., 1999). A *Luffa operculata* é usada informalmente no tratamento das rinites e rinossinusites, doenças de prevalência crescente na população mundial (MELLO JR.; MION, 2003).

Chama-nos a atenção o fato de haver poucos estudos clínicos com a *Luffa operculata* (WIESENAUER et al., 1989, SALVIANO, 1992 b, ADLER, 1999, WEISER et al., 1999, GLATTHAAR-SAALMULLER; FALLIER-BECKER, 2001). Estes trabalhos são estudos comparativos, ou sobre a eficácia de compostos homeopáticos. A grande diluição dos componentes nestes últimos medicamentos não nos permite afirmar que o efeito atingido seja resultado direto da presença da *Luffa operculata*. Em termos práticos, os achados de nosso estudo sugerem que o "tratamento natural" com *Luffa operculata* para rinites e rinossinusites deveria ser empregado com extrema cautela e os médicos, para melhor orientar os pacientes, devem estar atentos ao risco de seus efeitos negativos no *clearance* mucociliar.

Em nosso laboratório, outros estudos complementares abrangendo a *Luffa operculata* deverão ser efetuados para complementação das informações obtidas neste trabalho, tais como a análise morfométrica do muco no material coletado para estudo histológico, e a avaliação das características reológicas do muco em resposta a este tratamento (QURASHI et al., 1998).

Deste estudo deve ficar uma mensagem: os profissionais de saúde devem estar mais atentos ao uso, por parte dos dos pacientes, das plantas medicinais. Além disso, devem procurar conhecê-las: por um lado, valorizar a inegável potencialidade medicinal das plantas, mas reconhecer sua capacidade de reações adversas, alergias, intoxicações e interações medicamentosas diversas. As plantas medicinais devem e merecem ser estudadas à luz da ciência. Esta observação tem conotação especial no Brasil, o país de maior biodiversidade do planeta. Aqui existem condições técnicas em todos os níveis para aproveitamento desta preciosa matéria-prima vegetal na produção de fitomedicamentos.

Fitomedicamentos são remédios feitos à base de extratos vegetais padronizados, com efeito terapêutico comprovado, e não isentos de efeitos colaterais. Para sua composição, acompanha-se o vegetal desde sua origem, sua colheita, a extração do princípio ativo, observando-se sua pureza, homogeneidade e padronização. Os fitomedicamentos também passam por todas as fases de estudos experimentais e clínicos, conforme a legislação que rege os medicamentos sintéticos, tornando-os "fitoterápicos cientificamente confiáveis". Exemplo recente de fitomedicamento mundialmente bem sucedido é o extrato de *Ginkgo biloba*, uma planta de origem chinesa.

Definida a composição química da *Luffa operculata*, suas ações farmacológicas devem ser melhor pesquisadas para aproveitamento de seu potencial terapêutico. Por exemplo, há fitomedicamentos mucolíticos cuja base é a saponina. Neste âmbito, devem ser priorizados os estudos sobre

sua toxicidade. A indústria farmacêutica tem hoje condições de identificar e neutralizar componentes tóxicos das plantas medicinais. Assim, a *Luffa operculata* poderá ser utilizada no desenvolvimento de medicamentos com controle de qualidade, não só para aplicação nas vias respiratórias, mas eventualmente na mucosa digestiva (como laxativo) e com finalidade citotóxica na terapia do câncer (KAWAHARA et al., 2001).

A demanda por tratamentos naturais com conotação científica tem crescido: o mundo está preocupado com hábitos saudáveis, alimentação natural, sem aditivos ou agrotóxicos. A "ciência" das plantas medicinais vem da tradição de uso, por receitas que passam de geração a geração. Em nosso Brasil miscigenado, caboclos, índios, negros, orientais e descendentes de europeus, todos têm uma bagagem cultural de medicina invejável, que deveríamos respeitar, observar e pesquisar.

Num País como o nosso, pobre em recursos financeiros, porém riquíssimo em diversidade biológica e cultural, talvez a maior contribuição dos cientistas seja resgatar essas tradições, dar-lhes validação científica e utilizá-las para beneficiar e orientar o maior número possível de pacientes. Isto deve resultar em novos medicamentos padronizados e cientificamente testados, mais eficientes, seguros e acessíveis à população.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que a infusão do fruto seco de *Luffa operculata* nas concentrações testadas altera significativamente a função do aparelho mucociliar no palato isolado de rã. As alterações observadas foram dose-dependentes.

Especificamente quanto aos parâmetros analisados, observamos:

- redução significativa da velocidade de transporte mucociliar (VTM) em altas concentrações da infusão e por longo período de imersão;
- redução significativa da frequência de batimento ciliar (FBC) em todas as concentrações da infusão de *Luffa operculata*.
- modificação da diferença de potencial transepitelial (DPT), em altas concentrações da infusão e por longo período de imersão, indicativa de alterações do equilíbrio iônico;
- alterações ultraestruturais, coerentes com o achado anterior, como desorganização do epitélio e edema intercelular por ruptura das junções intercelulares epiteliais, especialmente das *tight junctions*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, K.E.; COHEN, M.H.; EISENBERG, D.; JONSEN, A.R. Ethical considerations of complementary and alternative medical therapies in conventional medical settings. **Ann. Intern. Med.**, v.137, p.660-4, 2002.

ADLER, M. Efficacy and safety of a fixed-combination homeopathic therapy for sinusitis. **Adv. Ther.**, v.16, n.2, p.103-11, 1999.

AGUIAR, F.J.C.; NEVES-PINTO, R.M. Estudo farmacológico preliminar do cabacinho (*Momordica bucha, L.*). **F. Med. (BR)**, v.91, n.2, p.151-5, 1985.

ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. 2 ed. Buenos Aires, Isis Ediciones SRL, 2004. NO PRELO: Esponjuelo.

** De acordo com:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e documentação. Estrutura e apresentação de teses. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha. São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação, 1996.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com LIST OF JOURNAL INDEXED IN INDEX MEDICUS.

AMERICAN BOTANICAL COUNCIL. **The complete German comission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines.** (CD-ROM) Austin, IntegrativMedicine, 1999.

ANGELL, M.; KASSIRER, J.P. Alternative medicine - the risks of untested and unregulated remedies. **N. Engl. J. Med.**, v.339, n.12, p.839-41, 1998.

ASHER, B.F.; SEIDMAN, M.; SNYDERMAN, C. Complementary and alternative medicine in otolaryngology. **Laryngoscope**, v.111, p.1383-9, 2001.

ASTIN, J.A. Why patients use alternative medicine: results of a national study. **J.A.M.A.**, v.279, n.19, p.1548-53, 1998.

AUDICANA, M.; BERNEDO, N.; GONZALEZ, I; MUÑOZ, D.; FERNANDEZ, E.; GASTAMINZA, G. An unusual case of baboon syndrome due to mercury present in a homeopathic medicine. **Contact Derm.**, v.45, p.185, 2001.

BALBANI, A.P.S. **Ação do estrógeno e progesterona na mucosa nasal humana: medida do transporte mucociliar da sacarina e pesquisa de receptores hormonais através de método imunoistoquímico.** São Paulo, 2001. 71 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

BASBAUM, C.; WELSH, M.J. Mucous secretion and ion transport in airways. In: MURRAY, J.F.; NADEL, J.A., ed. **Textbook of respiratory medicine**. Philadelphia, WB Saunders, 1994. v.1, p.323-44.

BIELORY, L. Adverse reactions to complementary and alternative medicine: ragweed's cousin, the coneflower (echinacea), is "a problem more than a sneeze". **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v.88, p.7-9, 2002.

BLANC, P.D.; TRUPIN, L.; EARNEST, G.; KATZ, P.; YELIN, E.H.; EISNER, M. Alternative therapies among adults with a reported diagnosis of asthma or rhinosinusitis: data from a population-based survey. **Chest**, v.120, p.1461-7, 2001.

BRAGA, P.C.; PIATTI, G.; DAL SASSO, M.; BERNINI, A. The effects of calcitonin nasal preparations and their excipients on mucociliary clearance in an ex-vivo frog palate test. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.44, n.11, p.938-40.

CARLINI, E.A. Pesquisas com plantas brasileiras usadas em medicina popular. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v.29, n.5/6, p.109-10, 1983.

CÁCERES, A. **Plantas de uso medicinal en Guatemala**. Guatemala, Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1996. p. 165-6.

CHAMPNEY, R. FERGUSON, N.M.; FERGUSON, G.G.: Selected pharmacological studies of *Luffa operculata*. **J. Pharm. Sci.**, v. 63, n.6, p.942-3, 1974.

DE SMET, P.A.G.M. Herbal remedies. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.25, p.2046-56, 2002.

DERGAL, J.M.; GOLD, J.L.; LAXER, D.A.; LEE, M.S.; BINNS, M.A.; LANCTOT, K.L.; FREEDMAN, M.; ROCHON, P.A. Potential interactions between herbal medicines and conventional drug therapies used by older adults attending a memory clinic. **Drug Aging**, v.19, n.11, p.879-86, 2002.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; SOUZA-BRITO, A.R.B.; MARIOT, A.; SANTOS, C.M. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo, Editora UNESP, 2002. p.180-1.

EISENBERG, D.M.; DAVIS, R.B.; ETTNER, S.L.; APPEL, S.; WILKEY, S.; ROMPAY, M.V.; KESSLER, R.C. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997. **J.A.M.A.**, v.280, n.18, p.1569-75, 1998.

ERNEST, E. Research into complementary/alternative medicine: an attempt to dispel the myths. **Int. J. Clin. Pract.** v. 55, n. 6, p. 376-379, 2001.

ERNEST, E. The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: ginkgo, St.John's wort, ginseng, echinacea, saw palmetto, and Kava. **Ann. Intern. Med.**, v.136, p.42-53, 2002.

FESTA, E. **Efeito do amiloride na velocidade de transporte mucociliar e na diferença de potencial transepitelial no palato isolado de rã.** São Paulo, 1993. 88p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

FESTA, E.; MACCHIONE, M.; PAIVA, P.S.O.; SALDIVA, P.H.N.; KING, M. Effects of aerolized amiloride on mucociliary transport velocity and transepithelial potential difference in isolated frog palate. **J. Aerosol Med.**, v.8, p.167-76, 1995.

FESTA, E.; GUIMARÃES, E.; MACCHIONE, M.; SALDIVA, P.H.N.; KING, M. Acute effects of uridine-5'-triphosphate on mucociliary clearance in isolated frog palate. **J. Aerosol Med.**, v. 10, n. 1, p. 25-29, 1997.

FISHER, P.; WARD, A. Complementary medicine in Europe. **B.M.J.**, v.309, p.107-11, 1994.

FRIERI, M. Herbal therapies: what allergist-immunologists should know regarding patient use of complementary and alternative medicine. **Allergy Asthma Proc.**, v.22, p.209-15, 2001.

GERALDES, Z.A.S.; LIM, T.A.; LEITE, M.M.J.; LEMMI, R.C.; FERNANDES, M.A. Medicamentos vegetais de origem popular e suas implicações na assistência e ensino de enfermagem. **Rev. Esc. Enf. USP**, v.15, n.3, p.247-55, 1981.

GLATTHAAR-SAALMULLER, B.; FALLIER-BECKER, P. Antiviral action of Euforbium compositum and its components. **Försch. Komplementärmed. Klass Naturheilkd**, v.8, n.4, p.207-12, 2001.

GONZÁLEZ-MARISCAL, L.; BETANZOS, A.; NAVA, P.; JARAMILLO, B.E. Tight junction proteins. **Prog. Biophys. Mol. Biol.**, v.81, p.1-44, 2003.

HOYLE, L. Complementary and alternative medicine and psychiatry. **Am. J. Psychiatry**, v.158, n.9, p.1541-2, 2001.

HUGHES, E.F. Overview of complementary, alternative and integrative medicine. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v.44, n.4, p.774-9, 2001.

JEFFERY, P.K.; LI, D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. **Eur. Respir. J.**, v.10, p.1655-62, 1997.

JONES, R.; REID, L. Secretory cells and their glycoproteins in health and disease. **Br. Med. Bull.**, v.34, p.9-16, 1978.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1999. Cap.4, p.50-71: Tecido Epitelial.

KAWAHARA, N.; KURATA, A.; HAKAMATSUKA, T.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine "buchinha" (*Luffa operculata*) and their effect on PEBP2-alphaA and OCIF gene expression in a human osteoblast-like Saos-2 cell line. **Chem. Farm. Bull. (Tokyo)**, v.49, n.10, p.1377-9, 2001.

KNAUF, H.; HAAG, R.; LUBCKE, R.; BERGER, E.; GEROK, W. Determination of short-circuit current in the in vivo perfused rat colon. **Am. J. Physiol.**, v.246, p.151-8, 1984.

KROUSE, J.H.; KROUSE, H.J. Patient use of traditional and complementary therapies in treating rhinosinusitis before consulting an otolaryngologist. **Laryngoscope**, v.109, p.1223-7, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil**. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. p. 196-197.

MACCHIONE, M. **Efeitos de oxidantes, H₂O₂ e material particulado urbano (PM₁₀) sobre o epitélio mucociliado**. São Paulo, 1998. 123 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.

MACCHIONE, M.; GUIMARÃES, E.T.; SALDIVA P.H.N.; LORENZI-FILHO, G. Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.1347-1355, 1995.

MACCHIONE, M.; LORENZI-FILHO, G.; GUIMARÃES, E.T.; JUNQUEIRA, V.B.C.; SALDIVA, P.H.N. The use of the frog palate preparation to assess the effects of oxidants on ciliated epithelium. **Free Radic. Biol. Med.**, v.24, n.5, p.714-21, 1998.

MARCUS, D.M.; GROLLMAN, A.P. Botanical medicines - the need for new regulations. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.25, p.2073-6, 2002.

MATOS, F.J.A. Farmacognosia de *Luffa operculata* cogn. **Rev. Bras. Farm.**, v.60, n.7/9, p.69-76, 1979.

MELLO JR, J.F.; MION, O. Rinite Alérgica. In: CAMPOS, C.A.H.; COSTA, H.O.O., ed. **Tratado de Otorrinolaringologia**. São Paulo, Editora Roca, 2003. v.3, cap.7, p.68-81.

MENON-MIYAKE, M.A.; CANIELLO, M.; BALBANI, A.P.S.; BUTUGAN, O. Inquérito sobre o uso de plantas medicinais para tratamento de afecções otorrinolaringológicas entre pacientes de um hospital público terciário. In: CONGRESSO TRIOLÓGICO DE OTORRINOLARINGOLOGIA, 3. Rio de Janeiro, 2003. **Resumo dos Trabalhos**. Rio de Janeiro, 2003a, p. 93.

MENON-MIYAKE, M.A.; RAMOS, C.C.; VENOSA, A.R.; LIMA, A.S.; MARONE, S.A.M. Mecanismos imunológicos da mucosa das vias aéreas superiores e fisiopatologia do anel linfático de Waldeyer: conceitos atuais. **Arq. Fund. Otorrinolaringol.**, v.7, n.2, p.143-50, 2003b.

MERKUS, P.; ROMEIJN, S.G.; VERHOEF, J.C.; MERKUS, F.W.H.M.; SCHOUWENBURG, P.F. Classification of cilio-inhibiting effects of nasal drugs. **Laryngoscope**, v.111, p.595-602, 2001.

MIN, Y.G.; LEE, K.S.; YUN, J.B.; RHEE, C.S.; RHYOO, C.; KOH, Y.Y.; YI, W.J.; PARK, K.S. Hypertonic saline decreases ciliary movement in human nasal epithelium *in vitro*. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v.124, p.313-316, 2001.

NAKAGAWA, N.K. **Efeitos do furosemide, hipovolemia e choque hemorrágico sobre o muco respiratório e diferença de potencial transepitelial traqueal em cães.** São Paulo, 2002, 121 p. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

NASEEM, M.; PATIL, S. Antispermatic and androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.61, p.9-16, 1998.

NIGGEMANN, B.; GRÜBER, C. Side-effects of complementary and alternative medicine. **Allergy**, v.58, p.707-16, 2003.

POMA, A.; MARCOZZI, G.; CESARE, P.; CARMIGNANI, M.; SPANO, L. Antiproliferative effect and apoptotic response *in vitro* of human melanoma cells to liposomes containing the ribosome-inactivating protein luffin. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1472, n.1-2, p.197-205, 1999.

PUCHELLE, E.; ZAHM, J. M.; SADOUL P. Mucociliary frequency of frog palate epithelium. **Am. J. Physiol.** v.242 (Cell. Physiol.11), p.C31-5, 1982.

QURAIISHI, M.S.; JONES, N.S.; MASON, J. The rheology of nasal mucus: a review. **Clin. Otolaryngol.**, v.23, n.5, p.403-13, 1998.

RAGHAVAN, U.; JONES, N.S. Complementary and alternative therapy for nasal conditions. **J. Laryngol. Otol.**, v.114, p.919-24, 2000.

REIMER, A.; HAKANSSON, C.H.; MERCKE, U.; TOREMALM, NG. The mucociliary activity of the upper respiratory tract - a method for use in experimental studies on human material. **Acta Otolaryngol.**, v.83, p.491-7, 1977.

ROGERS, D.F. Motor control of airway goblet cells and glands. **Respir. Physiol.**, v.125, p.129-44, 2000.

RONCADA, P.R.A. **Estudo analítico das alterações estruturais e ultra-estruturais da superfície do epitélio da mucosa nasal (concha inferiores e septo nasal) de coelhos após o uso tópico do extrato do fruto da *Luffa operculata***. São Paulo, 2001. 109p. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

RUBIN, B.K.; RAMIREZ, O.; KING, M. Mucus-depleted frog palate as a model for study of mucociliary clearance. **J. Appl. Physiol.**, v.69, p.424-9, 1990.

SALVIANO, P.A. Revisão sobre o uso terapêutico da *Luffa operculata* (L) Cogniaux (cabacinha). **Rev. Bras. Med.**, v.49, n.9, p.672-4, 1992a.

SALVIANO, P.A. Tratamento da sinusite com preparação contendo *Luffa operculata* e solução fisiológica. **Rev. Bras. Med.**, v.49, n.9, p.681-2, 1992b.

SCHIDLOW, DV. Primary ciliary dyskinesia (the immotile cilia syndrome). **Ann. Allergy**, v.73, p.457-66, 1994.

SENN, G.; PASSALACQUA, G.; CRIVELLARO, M; BONADONNA, P.; GANI, F.; DORIZZI, R.; DAMA, A.; CANONICA, G.W.; LOMBARDI, C. Unconventional medicine: a risk of undertreatment of allergic patients. **Allergy**, v.54, p.1117-8, 1999.

SENN, G.; PASSALACQUA, G.; BONADONNA, P.; AGOSTINIS, F.; LOMBARDI, C.; COCCO, G.; ZANON, P.; CANONICA, G.W. Is alternative medicine acceptable in allergology? **Allergy**, v.55, p.1200, 2000.

SILVA, E.A. **Estudo farmacológico da *Luffa operculata* (L.) Cogniaux.** Fortaleza, 1983. 86p. Tese (mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

SLEIGH, MA.; BLAKE, J.R.; LIRON, N. The propulsion of mucus by cilia. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.137, p.726-41, 1988.

TSEN, L.C.; SEGAL, S.; POTHIER, M.; BADER, A.M. Alternative medicine use in presurgical patients. **Anesthesiology**, v.93, n.1, p.148-51, 2000.

VASQUES, C.A.V.; VASQUES, N.V.; ARRAES, L.A.; GELLER, M. Revisão farmacognóstica da cabacinha (*Luffa operculata* Cogn.). **F. Med. (BR)**, v. 93, n. 3, p. 185-7, 1986.

WANNER, A.; SALATHÉ, M.; O'RIORDAN, T.G. Mucociliary clearance of the airways. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.154, p.1868-902, 1996.

WEISER, M.; GEGENHEIMER, L.H.; KLEIN, P. A randomized equivalence trial comparing the efficacy and safety of *Luffa comp.*- Heel nasal spray with cromolyn sodium spray in the treatment of seasonal allergic rhinitis. **Försch. Komplementärmed.**, v.6, n.3, p.142-8, 1999.

WETZEL, M.S.; KAPTCHUK, T.J.; HARAMATI, A.; EISENBERG, D.M. Complementary and alternative medical therapies: implications for medical education. **Ann. Intern. Med.**, v.138, p.191-6, 2003.

WIESENAUER, M.; GAUS, W.; BOHNACKER, U.; HÄUSSLER, S. [Efficiency of homeopathic drug combinations for the treatment of sinusitis / results of a randomized double-blind study with general practitioners]. Wirksamkeitsprüfung von homöopathischen Kombinationspräparaten bei Sinusitis. Ergebnisse einer randomisierten Doppelblindstudie unter Praxisbedingungen. **Arzneim-Forsch / Drug Res.**, v.39, n.5, p. 620-5, 1989.

YUN, Y.S.; MIN, Y.G.; RHEE, C.S.; JUNG, I.H.; KOH, Y.Y.; JANG T.Y.; JUNG, D.H. Effects of toxin of *Staphylococcus aureus* on the ciliary activity and ultrastructure of human nasal ciliated epithelial cells. **Laryngoscope**, v.109, p.2021-4, 1999.

ANEXO 1

Ringer rã

Solução "estoque"

Pesa-se em balança de precisão:

NaCl - 8,60g

CaCl - 0,33g

KCl - 0,30g

Mistura-se em recipiente refratário com água destilada - 1000 ml.

.....

Para o preparo de Ringer rã, dilui-se a solução estoque 1:1 em água destilada.

Planilha 1: Dados coletados entre Novembro/200

Planilha 2: Média e desvio padrão para estatístic:

PROJETO LUFFA

Rãs Grupo Controle 1

TRANSPORTE			
B4	T0	T 5	T 20
1	7,6	17,27	11,88
2	7,61	13,77	12,49
3	11,39	13,16	12,63
4	9,83	14,56	11,22
5	12,4	11,33	14
Média	9,766	14,018	12,444
Desv Pad	2,174817	2,173263	1,033697

PD		
B4	T 0	T 5
1	-0,003	-0,003
2	0	-0,004
3	-0,002	-0,001
Média	-0,001666667	-0,00267
Desv Pad	0,001527525	0,001528

TRANSPORTE			
B6	T0	T 5	T 20
1	17,32	12,66	11,31
2	16,26	10,25	13,01
3	15,32	9,44	11,25
4	12	14,14	11,77
5	14,73	11,84	10,7
Média	15,126	11,666	11,608
Desv Pad	2,004116	1,87744	0,870816

PD		
B6	T 0	T 5
1	-0,003	-0,001
2	-0,002	-0,001
3	-0,002	-0,001
Média	-0,002333333	-0,001
Desv Pad	0,00057735	0

TRANSPORTE			
B8	T0	T 5	T 20
1	16,38	20,49	16,5

PD		
B8	T 0	T 5
1	0,002	-0,001

2	18,21	16,6	18,25
3	19,34	13,53	16,83
4	17,02	12,69	18,58
5	17,99	11,61	18,14
Média	17,788	14,984	17,66
Desv Pad	1,140162	3,594716	0,929973

2	-0,001	-0,001
3	-0,001	-0,001
Média	0	-0,001
Desv Pad	0,001732051	0

TRANSPORTE			
B10	T0	T 5	T 20
1	10,76	18,17	10,52
2	9,84	13,46	11,47
3	8,32	12,7	9,52
4	8,59	13,56	10,13
5	8,88	11,91	10,95
Média	9,278	13,96	10,518
Desv Pad	1,007681	2,445619	0,748245

PD		
B10	T 0	T 5
1	-0,002	-0,002
2	-0,006	-0,001
3	-0,001	-0,001
Média	-0,003	-0,00133
Desv Pad	0,002645751	0,000577

TRANSPORTE			
B12	T0	T 5	T 20
1	22,71	12,69	18,55
2	14,53	13,98	15,34
3	17,29	18,99	13,76
4	18,99	16,29	15,08
5	20,96	13,7	14,92
Média	18,896	15,13	15,53
Desv Pad	3,18028	2,528151	1,793321

PD		
B12	T 0	T 5
1	-0,003	-0,001
2	-0,002	-0,002
3	-0,001	0,001
Média	-0,002	-0,00067
Desv Pad	0,001	0,001528

TRANSPORTE			
B14	T0	T 5	T 20
1	25,74	18,12	16,84
2	29,13	19,36	21,95
3	31,78	20,91	17,42
4	19,91	18,09	20,13
5	20,36	21,36	17,13
Média	25,384	19,568	18,694
Desv Pad	5,250555	1,527799	2,245558

PD		
B14	T 0	T 5
1	-0,001	0
2	-0,002	-0,007
3	-0,005	-0,001
Média	-0,002666667	-0,00267
Desv Pad	0,002081666	0,003786

TRANSPORTE			
B16	T0	T 5	T 20
1	10,63	23,4	12,56
2	11,93	15,37	17,7
3	10,52	12,53	17,01
4	8,97	11,49	15,41
5	13,74	17,77	14,16
Média	11,158	16,112	15,368

PD		
B16	T 0	T 5
1	-0,001	0
2	-0,001	0,001
3	0,002	0,002
Média	0	0,001
Desv Pad	0,001732051	0,001

Desv Pad 1,784368 4,759414 2,090471

TRANSPORTE			
B18	T0	T 5	T 20
1	9,17	8,49	9,35
2	10,86	12,34	11,06
3	9,22	10,04	10,25
4	8,98	8,29	9,38
5	8,48	11,5	12,24
Média	9,342	10,132	10,456
Desv Pad	0,897619	1,791946	1,221773

PD		
B18	T 0	T 5
1		
2		
3		
Média		
Desv Pad		

TRANSPORTE			
B30	T0	T 5	T 20
1	12,33	10,82	10,49
2	15,36	10,31	12,75
3	11,63	10,99	10,65
4	11,84	11	10,45
5	13,06	10,78	11,4
Média	12,844	10,78	11,148
Desv Pad	1,510209	0,280624	0,974433

PD		
B30	T 0	T 5
1	-0,001	-0,001
2	-0,002	-0,002
3	-0,001	-0,001
Média	-0,001333333	-0,00133
Desv Pad	0,00057735	0,000577

TRANSPORTE			
B38	T0	T 5	T 20
1	17,23	12,6	12,78
2	15,89	15,09	10,74
3	15,23	14,93	12,34
4	14,58	15,24	13,68
5	12,59	14,16	11,6
Média	15,104	14,404	12,228
Desv Pad	1,713791	1,090885	1,121838

PD		
B38	T 0	T 5
1	0,001	0,001
2	0,001	-0,001
3	-0,007	-0,001
Média	-0,001666667	-0,00033
Desv Pad	0,004618802	0,001155

TRANSPORTE			
B23	T0	T 5	T 20
1	12,94	8,59	10,27
2	10,69	7,75	11,03
3	8,85	9,16	11,49
4	13,04	9,17	10,23
5	10,39	9,62	11,16
Média	11,182	8,858	10,836
Desv Pad	1,792364	0,719145	0,560785

PD		
B23	T 0	T 5
1	-0,001	-0,001
2	-0,001	-0,001
3	-0,001	-0,003
Média	-0,001	-0,00167
Desv Pad	0	0,001155

TRANSPORTE			
B24	T0	T 5	T 20
1	6,87	11,49	9,18
2	7,16	7,21	10,48
3	8,53	8,16	7,43
4	8,2	10,68	9,92
5	9,74	7,44	7,07
Média	8,1	8,996	8,816
Desv Pad	1,149021	1,959957	1,507458

PD		
B24	T 0	T 5
1	0,003	-0,003
2	-0,001	-0,001
3	-0,001	-0,006
Média	0,000333333	-0,00333
Desv Pad	0,002309401	0,002517

TRANSPORTE			
B25	T0	T 5	T 20
1	8,99	10,25	10,53
2	8,41	12,79	9,49
3	10,34	9,51	7,46
4	8,31	13,64	8,59
5	8,94	10,66	11,13
Média	8,998	11,37	9,44
Desv Pad	0,809858	1,759787	1,473906

PD		
B25	T 0	T 5
1	-0,003	-0,001
2	-0,002	0,001
3	-0,002	-0,001
Média	-0,002333333	-0,00033
Desv Pad	0,000577735	0,001155

TRANSPORTE			
B26	T0	T 5	T 20
1	13,13	14,88	12,56
2	11,66	11,02	10,49
3	12,09	9,17	10,04
4	10,92	11,99	11,59
5	7,08	13,74	9,59
Média	10,976	12,16	10,854
Desv Pad	2,32005	2,245184	1,208813

PD		
B26	T 0	T 5
1	-0,001	-0,001
2	-0,003	-0,001
3	-0,001	-0,002
Média	-0,001666667	-0,00133
Desv Pad	0,001154701	0,000577

TRANSPORTE

PD

B31	T0	T 5	T 20
1	8,66	10,74	35,38
2	10,77	10,15	30,13
3	8,45	9,27	25,19
4	7,72	11,66	28,68
5	10,11	12,62	23,14
Média	9,142	10,888	28,504
Desv Pad	1,257048	1,301949	4,73575

B31	T 0	T 5
1	-0,003	0,002
2	-0,002	0,001
3	-0,003	0
Média	-0,002666667	0,001
Desv Pad	0,00057735	0,001

TRANSPORTE			
B32	T0	T 5	T 20
1	10,93	8,43	19,74
2	11,63	8,51	27,32
3	10,42	7,02	17,56
4	9,84	7,98	33,12
5	11,16	8,05	16,65
Média	10,796	7,998	22,878
Desv Pad	0,689442	0,593355	7,098346

PD		
B32	T 0	T 5
1	0,001	-0,001
2	0,005	-0,002
3	0,003	0,002
Média	0,003	-0,00033
Desv Pad	0,002	0,002082

TRANSPORTE			
B35	T0	T 5	T 20
1	11,89	10,65	14,21
2	14,91	11,41	12,37
3	12,51	11,41	13,71
4	16,95	12,56	13,58
5	12,41	12,63	14,74
Média	13,734	11,732	13,722
Desv Pad	2,143427	0,847066	0,883555

PD		
B35	T 0	T 5
1	-0,001	-0,001
2	-0,002	-0,002
3	-0,004	-0,003
Média	-0,002333333	-0,002
Desv Pad	0,001527525	0,001

TRANSPORTE			
B36	T0	T 5	T 20
1	18,02	16,63	13,11
2	17,91	14,81	11,53
3	15,09	13,93	15,18
4	12,65	13,2	14,67
5	14,14	14,38	15,66
Média	15,562	14,59	14,03
Desv Pad	2,360057	1,286643	1,694506

PD		
B36	T 0	T 5
1	-0,004	-0,002
2	-0,005	-0,001
3	-0,005	-0,005
Média	-0,004666667	-0,00267
Desv Pad	0,00057735	0,002082

TRANSPORTE			
B37	T0	T 5	T 20
1	8,73	13,67	16,02

PD		
B37	T 0	T 5
1	0,002	0

2	10,19	11,57	11,95
3	11,46	11,29	12,71
4	8,47	15,14	13,48
5	10,59	12,61	14,52
Média	9,888	12,856	13,736
Desv Pad	1,265591	1,584765	1,592115

2	0	0
3	-0,001	-0,001
Média	0,000333333	-0,00033
Desv Pad	0,001527525	0,000577

TRANSPORTE			
B39	T0	T 5	T 20
1	17,67	9,44	11,93
2	32,23	12,72	13,51
3	20,68	10,04	13,45
4	27,36	11,26	13,49
5	34,3	12,13	11,03
Média	26,448	11,118	12,682
Desv Pad	7,180534	1,37736	1,142681

PD		
B39	T 0	T 5
1	-0,002	-0,003
2	-0,004	-0,003
3	-0,003	-0,004
Média	-0,003	-0,00333
Desv Pad	0,001	0,000577

Rãs Grupo "Infusão E Empírica" 3

TRANSPORTE			
B19	T0	T 5	T 20
1	7,4	10,06	19,12
2	9,71	10,63	18,89
3	8,95	10,01	15,11
4	11,33	9,08	13,82
5	9,73	9,99	11,88
Média	9,424	9,954	15,764
Desv Pad	1,425616	0,555995	3,175174

PD		
B19	T 0	T 5
1	0,004	-0,001
2	-0,001	-0,002
3	0,002	0,003
Média	0,001666667	0
Desv Pad	0,002516611	0,002646

TRANSPORTE			
B20	T0	T 5	T 20
1	18,71	11,29	19,08
2	15,9	10,5	23,96
3	13,47	8,91	28,19
4	16,84	11,19	34,36
5	14,99	10,52	30,99
Média	15,982	10,482	27,316
Desv Pad	1,967173	0,952245	5,978598

PD		
B20	T 0	T 5
1	0	-0,001
2	0	-0,002
3	0	0
Média	0	-0,001
Desv Pad	0	0,001

TRANSPORTE			
B21	T0	T 5	T 20
1	17,55	17,51	46,48
2	24,72	15,38	56,52
3	20,34	19,06	46,08
4	14,83	14,9	54,73
5	18,82	18,3	30,65

PD		
B21	T 0	T 5
1	-0,002	-0,003
2	0,001	-0,001
3	-0,001	-0,001
Média	-0,000666667	-0,00167
Desv Pad	0,001527525	0,001155

Média	19,252	17,03	46,892
Desv Pad	3,664706	1,818213	10,23187

TRANSPORTE			
B22	T0	T 5	T 20
1	8,89	21,41	32,23
2	11,6	28,49	37,66
3	13,55	37,65	46,45
4	11,43	29,86	38,58
5	11,02	38,3	58,47
Média	11,298	31,142	42,678
Desv Pad	1,662519	7,017469	10,1827

PD		
B22	T 0	T 5
1	0,003	-0,001
2	0,001	-0,001
3	0,002	0
Média	0,002	-0,00067
Desv Pad	0,001	0,000577

TRANSPORTE			
B27	T0	T 5	T 20
1	9,18	10,09	15,06
2	11,22	10,65	22,37
3	12,84	10,6	27,43
4	10,85	8,11	22,49
5	15,53	10,44	26,34
Média	11,924	9,978	22,738
Desv Pad	2,399006	1,066991	4,851234

PD		
B27	T 0	T 5
1	-0,001	-0,001
2	-0,001	-0,003
3	-0,001	-0,002
Média	-0,001	-0,002
Desv Pad	0	0,001

TRANSPORTE			
B28	T0	T 5	T 20
1	12,44	13	11,32
2	10,49	10,29	11,9
3	9,99	10,87	19
4	11,95	10,4	13,09
5	11,58	13,81	16,88
Média	11,29	11,674	14,438
Desv Pad	1,021298	1,620626	3,344984

PD		
B28	T 0	T 5
1	-0,004	0,001
2	0	0,001
3	-0,001	0,002
Média	-0,001666667	0,001333
Desv Pad	0,002081666	0,000577

TRANSPORTE			
B33	T0	T 5	T 20
1	11,41	14,22	21,56
2	11,96	13,2	18,2
3	11,23	13,35	24,89
4	10,89	12,46	18,78
5	12,23	11,64	17,58
Média	11,544	12,974	20,202
Desv Pad	0,544959	0,973232	3,030119

PD		
B33	T 0	T 5
1	0,003	-0,002
2	0,006	-0,003
3	0,006	-0,001
Média	0,005	-0,002
Desv Pad	0,001732051	0,001

TRANSPORTE			
B34	T0	T 5	T 20
1	10,27	10,69	39,68
2	10,7	13,48	38,2
3	9,41	12,59	32,07
4	10,53	14,87	25,83
5	9,38	13,43	33,73
Média	10,058	13,012	33,902
Desv Pad	0,624396	1,534249	5,486371

PD		
B34	T 0	T 5
1	-0,004	-0,009
2	-0,001	-0,006
3	-0,006	-0,012
Média	-0,003666667	-0,009
Desv Pad	0,002516611	0,003

TRANSPORTE			
B40	T0	T 5	T 20
1	16,54	13,62	24,78
2	15,27	10,99	26,76
3	16,47	11,09	24,59
4	20,37	10,64	22,36
5	21,62	12,34	21,22
Média	18,054	11,736	23,942
Desv Pad	2,767315	1,233827	2,178031

PD		
B40	T 0	T 5
1	-0,001	-0,001
2	-0,001	-0,002
3	-0,001	-0,002
Média	-0,001	-0,00167
Desv Pad	0	0,000577

TRANSPORTE			
B41	T0	T 5	T 20
1	10,89	12,63	58,91
2	13,38	14,59	26,99
3	14,73	12,53	38,25
4	16,81	13,56	41,16
5	16,59	13,62	35,8
Média	14,48	13,386	40,222
Desv Pad	2,451612	0,842455	11,71164

PD		
B41	T 0	T 5
1	0,001	-0,001
2	0	-0,006
3	0,001	-0,006
Média	0,000666667	-0,00433
Desv Pad	0,00057735	0,002887

TRANSPORTE			
B3	T0	T 5	T 20
1	11,47	65	80
2	11,76	80	101
3	11,62	67	120
4	9,73	100	115
5	11,19	83	119
Média	11,154	79	107
Desv Pad	0,823608	14,12445	16,89675

PD		
B3	T 0	T 5
1	0,004	0,003
2	0,003	0,004
3	0,003	0,005
Média	0,003333333	0,004
Desv Pad	0,00057735	0,001

TRANSPORTE			
B5	T0	T 5	T 20
1	17,28	11,38	184
2	19,71	13,37	960,47
3	14,95	12,38	124,09
4	16,45	18,07	218,88
5	18,99	19,03	212,07
Média	17,476	14,846	339,902
Desv Pad	1,920594	3,470336	348,917

PD		
B5	T 0	T 5
1	-0,005	0
2	-0,004	-0,006
3	0,001	-0,001
Média	-0,002666667	-0,00233
Desv Pad	0,00321455	0,003215

TRANSPORTE			
B7	T0	T 5	T 20
1	17,74	10,63	
2	16,72	10,47	
3	14,67	10,58	
4	12,04	9,02	
5	13,12	11,65	
Média	14,858	10,47	
Desv Pad	2,3859	0,939761	

PD		
B7	T 0	T 5
1	-0,001	0
2	-0,003	-0,001
3	-0,002	-0,001
Média	-0,002	-0,00067
Desv Pad	0,001	0,000577

TRANSPORTE			
B9	T0	T 5	T 20
1	9,64	8,91	27,41
2	7,94	15,13	25,26
3	10,72	19,6	25,84
4	9,52	19,27	20,45
5	9,78	19,27	20,74
Média	9,52	16,436	23,94
Desv Pad	1,002297	4,594027	3,154893

PD		
B9	T 0	T 5
1	-0,002	-0,001
2	-0,003	-0,004
3	-0,001	-0,001
Média	-0,002	-0,002
Desv Pad	0,001	0,001732

TRANSPORTE			
B11	T0	T 5	T 20
1	20,03	13,35	22,24
2	20,99	24,1	18,94
3	21,45	15,21	77,52

PD		
B11	T 0	T 5
1	-0,002	-0,001
2	-0,003	-0,001
3	-0,004	-0,001

4	17,63	29,44	89,56
5	17,97	22,86	53,91
Média	19,614	20,992	52,434
Desv Pad	1,73755	6,639832	31,79368

Média	-0,003	-0,001
Desv Pad	0,001	0

TRANSPORTE			
B13	T0	T 5	T 20
1	18,23	18,84	100,99
2	25	22,28	78,52
3	22,32	18,83	93,58
4	27,62	22,27	64,14
5	29,98	20,32	75,2
Média	24,63	20,508	82,486
Desv Pad	4,582456	1,723215	14,75522

PD		
B13	T 0	T 5
1	0,001	-0,001
2	-0,002	-0,002
3	-0,005	-0,003
Média	-0,002	-0,002
Desv Pad	0,003	0,001

TRANSPORTE			
B15	T0	T 5	T 20
1	24,05	15,4	36,09
2	27,01	16,3	38,31
3	49,77	17,51	28,25
4	34,22	17,17	34,34
5	31,2	17,77	36,41
Média	33,25	16,83	34,68
Desv Pad	10,02037	0,973062	3,860648

PD		
B15	T 0	T 5
1	-0,001	0,001
2	-0,001	0,001
3	-0,001	0,001
Média	-0,001	0,001
Desv Pad	0	0

TRANSPORTE			
B17	T0	T 5	T 20
1	14,44	12,99	44,76
2	11,37	15,27	25,58
3	12,08	22,37	25,06
4	11,39	19,8	23,11
5	15,41	15,52	19,38
Média	12,938	17,19	27,578
Desv Pad	1,868012	3,799993	9,908629

PD		
B17	T 0	T 5
1		
2		
3		
Média		
Desv Pad		

TRANSPORTE			
B29	T0	T 5	T 20
1	15,42	7,27	15,04
2	15,46	10,48	29,04
3	21,73	9,87	16,6
4	16,27	8,29	19,57
5	18,57	13,69	18,69
Média	17,49	9,92	19,788
Desv Pad	2,694355	2,460102	5,467163

PD		
B29	T 0	T 5
1	0,001	-0,003
2	-0,002	-0,001
3	-0,004	-0,003
Média	-0,001666667	-0,00233
Desv Pad	0,002516611	0,001155

TRANSPORTE			
B42	T0	T 5	T 20
1	5,17	12,67	24,19
2	9,09	14,3	54,09
3	5,99	18,97	80,99
4	7,38	14,57	80,73
5	9,07	12,97	72,21
Média	7,34	14,696	62,442
Desv Pad	1,774007	2,52604	24,01491

PD		
B42	T 0	T 5
1	0	-0,003
2	-0,003	-0,005
3	-0,003	-0,001
Média	-0,002	-0,003
Desv Pad	0,001732051	0,002

Rãs Grupo Infusão em Água 5

TRANSPORTE			
BA1	T0	T 5	T 20
1	10,61	37,99	112,7
2	11,51	10,95	42,59
3	11,24	52,56	58,5
4	13,45	24,28	42,76
5	12,68	21,67	74,95
Média	11,898	29,49	66,3
Desv Pad	1,147027	16,09738	29,17584

PD		
BA1	T 0	T 5
1	-0,002	-0,001
2	0,001	-0,001
3	-0,001	0
Média	-0,000666667	-0,00067
Desv Pad	0,001527525	0,000577

TRANSPORTE			
BA2	T0	T 5	T 20
1	15,5	11,66	371,12
2	14,37	16,83	456,42
3	13,03	13,39	117,27
4	11,55	20,38	110,06
5	13,43	13,09	133,82
Média	13,576	15,07	237,738
Desv Pad	1,479554	3,523656	163,7267

PD		
BA2	T 0	T 5
1	0	-0,003
2	0,002	-0,003
3	0	-0,001
Média	0,000666667	-0,00233
Desv Pad	0,001154701	0,001155

TRANSPORTE			
BA3	T0	T 5	T 20
1	15,64	12,16	14,69
2	18,05	13,36	15,52
3	15,13	12,4	18,03
4	15,93	13,2	17,82
5	13,27	11,95	15,36
Média	15,604	12,614	16,284
Desv Pad	1,714841	0,631015	1,531839

PD		
BA3	T 0	T 5
1	-0,001	-0,002
2	-0,008	-0,004
3	-0,009	-0,004
Média	-0,006	-0,00333
Desv Pad	0,004358899	0,001155

TRANSPORTE			
BA4	T0	T 5	T 20
1	8,28	11,92	15,85
2	9,43	10,18	14,09
3	9,5	12,89	12,91
4	9,34	9,8	13,25
5	8	10,45	13,03
Média	8,91	11,048	13,826
Desv Pad	0,71211	1,305936	1,221753

PD		
BA4	T 0	T 5
1	-0,001	0,002
2	-0,001	0,001
3	0,001	0,005
Média	-0,000333333	0,002667
Desv Pad	0,001154701	0,002082

TRANSPORTE			
BA5	T0	T 5	T 20
1	14,53	11,47	17,19
2	17,7	13,73	28,99
3	13,69	18,61	20,59
4	13,29	15,77	15,72
5	14,67	10,82	12,76
Média	14,776	14,08	19,05
Desv Pad	1,732709	3,199187	6,230726

PD		
BA5	T 0	T 5
1	-0,001	0
2	-0,002	-0,001
3	-0,001	0
Média	-0,001333333	-0,00033
Desv Pad	0,00057735	0,000577

TRANSPORTE			
BA6	T0	T 5	T 20
1	12,08	16,99	18,55
2	17,84	15,42	22,71
3	12,2	15,84	18,13
4	20,8	15,59	23,03
5	20,48	16,59	23,2
Média	16,68	16,086	21,124
Desv Pad	4,300884	0,674781	2,551839

PD		
BA6	T 0	T 5
1	0,005	0,004
2	0,005	0,004
3	0,005	0,004
Média	0,005	0,004
Desv Pad		0

Desv Pad

01 e abril/2003

feito no SPSS

	FREQUÊNCIA			
T 20	B4	T 0	T 5	T 20
-0,004	1	9,34	15,87	13,15
-0,001	2	10,3	16,54	15,87
-0,001	3	10,3	11,9	13,51
-0,002	Média	9,98	14,77	14,17667
0,001732	Desv Pad	0,554256	2,507967	1,477475

RÃS

B4
B6
B8
B10
B12
B14
B16
B18
B30
B38

	FREQUÊNCIA			
T 20	B6	T 0	T 5	T 20
0,001	1	15,16	14,92	15,62
-0,001	2	10,86	13,51	13,51
-0,001	3	13,69	10,52	14,7
-0,00033	Média	13,23667	12,98333	14,61
0,001155	Desv Pad	2,185551	2,246783	1,057875

RÃS

B4
B6
B8
B10
B12
B14
B16

	FREQUÊNCIA			
T 20	B8	T 0	T 5	T 20
-0,001	1	13,69	17,85	20,83

-0,001	2	13,69	17,48	19,23	B18
0,001	3	16,39	16,94	19,23	B30
-0,00033	Média	14,59	17,42333	19,76333	B38
0,001155	Desv Pad	1,558846	0,457639	0,92376	

RÃS

FREQUÊNCIA					
T 20	B10	T 0	T 5	T 20	
-0,001	1	13,15	16,12	20,83	B4
-0,001	2	13,33	18,86	17,54	B6
0,001	3	13,69	16,94	16,94	B8
-0,00033	Média	13,39	17,30667	18,43667	B10
0,001155	Desv Pad	0,274955	1,406319	2,094286	B12
					B14
					B16
					B18
					B30
					B38

FREQUÊNCIA				
T 20	B12	T 0	T 5	T 20
0	1	17,85	17,85	18,18
-0,001	2	19,6	16,94	20,4
0	3	12,34	14,08	20,4
-0,00033	Média	16,59667	16,29	19,66
0,000577	Desv Pad	3,788804	1,967257	1,281718

FREQUÊNCIA				
T 20	B14	T 0	T 5	T 20
0,001	1	14,92	14,7	10,98
-0,001	2	17,54	9,43	10,63
-0,001	3	13,51	14,7	9
-0,00033	Média	15,32333	12,94333	10,20333
0,001155	Desv Pad	2,045051	3,042636	1,056709

FREQUÊNCIA				
T 20	B16	T 0	T 5	T 20
0,001	1	9,8	12,65	15,38
0,001	2	10,75	10,3	14,28
0,001	3	11,23	12,04	14,92
0,001	Média	10,59333	11,66333	14,86
0	Desv Pad	0,727759	1,21944	0,552449

FREQUÊNCIA				
T 20	B18	T 0	T 5	T 20
	1	17,85	17,85	11,36
	2	11,62	17,54	18,18
	3	11,36	17,54	17,54
	Média	13,61	17,64333	15,69333
	Desv Pad	3,674248	0,178979	3,766395

FREQUÊNCIA				
T 20	B30	T 0	T 5	T 20
-0,001	1	15,38	11,23	20
-0,006	2	11,9	16,94	20,4
-0,004	3	14,49	17,54	20
-0,00367	Média	13,92333	15,23667	20,13333
0,002517	Desv Pad	1,807881	3,48282	0,23094

FREQUÊNCIA				
T 20	B38	T 0	T 5	T 20
-0,002	1	8,4	12,04	15,62
-0,001	2	10,1	9,7	13,69
-0,005	3	9,8	9,7	18,18
-0,00267	Média	9,433333	10,48	15,83
0,002082	Desv Pad	0,907377	1,351	2,252354

FREQUÊNCIA				
T 20	B23	T 0	T 5	T 20
-0,001	1	16,66	20	10,86
-0,001	2	12,19	20	12,34
0,001	3	12,19	15,38	12,5
-0,00033	Média	13,68	18,46	11,9
0,001155	Desv Pad	2,580756	2,667358	0,904212

RÃS

B23
B24
B25
B26
B31
B32
B35
B36
B37
B39

FREQUÊNCIA				
T 20	B24	T 0	T 5	T 20
-0,004	1	15,15	19,23	16,39
-0,002	2	8,77	18,86	20
-0,003	3	11,76	13,51	16,67
-0,003	Média	11,89333	17,2	17,68667
0,001	Desv Pad	3,192089	3,200984	2,008291

RÃS

B23
B24
B25
B26
B31
B32
B35
B36
B37
B39

FREQUÊNCIA				
T 20	B25	T 0	T 5	T 20
-0,002	1	13,33	14,92	12,82
-0,005	2	13,69	11,11	9,34
-0,005	3	11,49	9,25	10,75
-0,004	Média	12,83667	11,76	10,97
0,001732	Desv Pad	1,180056	2,890346	1,7504

RÃS

FREQUÊNCIA				
T 20	B26	T 0	T 5	T 20
-0,002	1	15,62	14,28	15,87
-0,002	2	9,8	14,08	13,15
-0,001	3	11,36	13,33	10,98
-0,00167	Média	12,26	13,89667	13,33333
0,000577	Desv Pad	3,012574	0,500833	2,45015

B23
B24
B25
B26
B31
B32
B35
B36
B37
B39

FREQUÊNCIA

T 20	B31	T 0	T 5	T 20
-0,001	1	11,11	17,24	19,23
-0,001	2	14,92	13,51	19,23
0,001	3	12,19	15,15	14,08
-0,00033	Média	12,74	15,3	17,51333
0,001155	Desv Pad	1,963645	1,869519	2,973354

FREQUÊNCIA				
T 20	B32	T 0	T 5	T 20
0,001	1	18,86	10,1	13,51
0,002	2	12,19	16,66	17,54
0	3	15,62	13,69	10,63
0,001	Média	15,55667	13,48333	13,89333
0,001	Desv Pad	3,335451	3,28488	3,470912

FREQUÊNCIA				
T 20	B35	T 0	T 5	T 20
-0,003	1	11,23	14,49	14,7
-0,005	2	13,88	11,11	12,34
-0,005	3	17,24	10,98	10,86
-0,00433	Média	14,11667	12,19333	12,63333
0,001155	Desv Pad	3,011982	1,990034	1,936733

FREQUÊNCIA				
T 20	B36	T 0	T 5	T 20
-0,001	1	16,12	11,23	12,04
-0,003	2	14,49	10,63	14,28
-0,003	3	14,49	12,82	10,3
-0,00233	Média	15,03333	11,56	12,20667
0,001155	Desv Pad	0,941081	1,13168	1,995228

FREQUÊNCIA				
T 20	B37	T 0	T 5	T 20
-0,002	1	14,08	18,51	14,7

-0,001	2	14,49	18,86	13,88
-0,009	3	13,51	14,08	15,87
-0,004	Média	14,02667	17,15	14,81667
0,004359	Desv Pad	0,492172	2,664451	1,000117

FREQUÊNCIA				
T 20	B39	T 0	T 5	T 20
-0,004	1	9,61	14,08	15,62
-0,004	2	12,98	16,39	15,38
-0,004	3	15,38	14,28	15,15
-0,004	Média	12,65667	14,91667	15,38333
0	Desv Pad	2,898557	1,279857	0,235018

FREQUÊNCIA				
T 20	B19	T 0	T 5	T 20
0,001	1	17,54	13,33	15,62
0,003	2	18,51	13,33	14,92
0,002	3	12,98	11,76	10,52
0,002	Média	16,34333	12,80667	13,68667
0,001	Desv Pad	2,952835	0,90644	2,764658

RÃS

FREQUÊNCIA				
T 20	B20	T 0	T 5	T 20
0,002	1	11,23	15,38	15,62
0	2	10,52	14,28	12,04
0	3	10,52	15,87	10,3
0,000667	Média	10,75667	15,17667	12,65333
0,001155	Desv Pad	0,409919	0,814269	2,712514

B19
B20
B21
B22
B27
B28
B33
B34
B40
B41

FREQUÊNCIA				
T 20	B21	T 0	T 5	T 20
-0,001	1	10,52	12,5	11,62
-0,001	2	10,3	9,61	11,11
-0,002	3	9,8	9,25	11,23
-0,00133	Média	10,20667	10,45333	11,32
0,000577	Desv Pad	0,368963	1,781582	0,266646

RÃS

B19
B20
B21

B22
B27
B28
B33
B34
B40
B41

FREQUÊNCIA				
T 20	B22	T 0	T 5	T 20
0,001	1	12,19	11,9	16,39
0,003	2	13,51	12,34	17,54
-0,001	3	14,28	14,7	18,86
0,001	Média	13,32667	12,98	17,59667
0,002	Desv Pad	1,056993	1,505722	1,235975

RÃS

B19
B20
B21
B22
B27
B28
B33
B34
B40
B41

FREQUÊNCIA				
T 20	B27	T 0	T 5	T 20
-0,001	1	10,3	9,9	8,77
0	2	12,65	11,9	9,7
-0,001	3	10,75	10,86	13,33
-0,00067	Média	11,23333	10,88667	10,6
0,000577	Desv Pad	1,24733	1,000267	2,409544

FREQUÊNCIA				
T 20	B28	T 0	T 5	T 20
-0,004	1	9,09	14,49	9,25
-0,001	2	16,12	10	12,98
0,002	3	9,17	11,9	10,52
-0,001	Média	11,46	12,13	10,91667
0,003	Desv Pad	4,035877	2,253819	1,896374

FREQUÊNCIA				
T 20	B33	T 0	T 5	T 20
-0,002	1	14,28	13,88	10,75
0,003	2	14,49	17,85	9,17
-0,001	3	11,62	17,85	11,36
0	Média	13,46333	16,52667	10,42667
0,002646	Desv Pad	1,599823	2,292081	1,130236

FREQUÊNCIA				
T 20	B34	T 0	T 5	T 20
0,001	1	19,23	16,66	10,1
-0,002	2	15,15	14,92	9,61
0	3	13,15	15,62	10
-0,00033	Média	15,84333	15,73333	9,903333
0,001528	Desv Pad	3,098731	0,875519	0,258908

FREQUÊNCIA				
T 20	B40	T 0	T 5	T 20
-0,002	1	17,24	17,85	11,49
-0,004	2	16,94	15,38	15,38
-0,004	3	14,08	14,7	12,82
-0,00333	Média	16,08667	15,97667	13,23
0,001155	Desv Pad	1,744286	1,657599	1,977144

FREQUÊNCIA				
T 20	B41	T 0	T 5	T 20
0	1	15,87	10,63	12,04
0	2	12,82	16,12	12,04
0,001	3	11,36	12,04	11,62
0,000333	Média	13,35	12,93	11,9
0,000577	Desv Pad	2,301239	2,851158	0,242487

FREQUÊNCIA				
T 20	B3	T 0	T 5	T 20
0,003	1	15,62	19,23	
0,003	2	11,36	18,18	
0,003	3	10,86	11,62	
0,003	Média	12,61333	16,34333	
0	Desv Pad	2,615824	4,12408	

RÃS

FREQUÊNCIA				
T 20	B5	T 0	T 5	T 20
0,002	1	9,61	18,18	20,2
0,003	2	12,04	16,94	18,51
0,001	3	10,1	20,2	20,83
0,002	Média	10,58333	18,44	19,84667
0,001	Desv Pad	1,285081	1,645479	1,199681

- B3
- B5
- B7
- B9
- B11
- B13
- B15
- B17
- B29
- B42

FREQUÊNCIA				
T 20	B7	T 0	T 5	T 20
0,002	1	14,28	13,89	19,6
0,002	2	15,87	16,39	13,89
0,002	3	12,32	15,87	15,48
0,002	Média	14,15667	15,38333	16,32333
0	Desv Pad	1,778211	1,319141	2,946936

RÃS

- B3
- B5
- B7
- B9
- B11
- B13
- B15
- B17
- B29
- B42

FREQUÊNCIA				
T 20	B9	T 0	T 5	T 20
0	1	11,9	17,54	13,51
0,004	2	12,98	20,83	13,51
0,003	3	13,69	23,8	13,69
0,002333	Média	12,85667	20,72333	13,57
0,002082	Desv Pad	0,901351	3,131363	0,103923

RÃS

- B3
- B5
- B7
- B9
- B11
- B13
- B15
- B17
- B29
- B42

FREQUÊNCIA				
T 20	B11	T 0	T 5	T 20
0,001	1	13,15	14,08	17,54
0	2	12,98	14,7	15,38
0,001	3	13,51	12,82	19,6

0,000667	Média	13,21333	13,86667	17,50667
0,000577	Desv Pad	0,270617	0,957984	2,110197

FREQUÊNCIA				
T 20	B13	T 0	T 5	T 20
0	1	10,63	17,24	12,91
0	2	16,66	17,85	9,09
0,002	3	10,63	18,18	12,5
0,000667	Média	12,64	17,75667	11,5
0,001155	Desv Pad	3,481422	0,4769	2,097165

FREQUÊNCIA				
T 20	B15	T 0	T 5	T 20
0,001	1		12,34	17,87
0	2		11,76	
0	3		10,2	
0,000333	Média		11,43333	
0,000577	Desv Pad		1,106767	

FREQUÊNCIA				
T 20	B17	T 0	T 5	T 20
	1	15,87	16,94	10,86
	2	9,7	16,66	8,47
	3	10,75	16,94	10,52
	Média	12,10667	16,84667	9,95
	Desv Pad	3,301156	0,161658	1,292942

FREQUÊNCIA				
T 20	B29	T 0	T 5	T 20
-0,003	1	12,82	16,94	13,51
-0,001	2	14,83	16,84	18,18
-0,003	3	11,76	11,9	16,39
-0,00233	Média	13,13667	15,22667	16,02667
0,001155	Desv Pad	1,559305	2,881412	2,356106

FREQUÊNCIA				
T 20	B42	T 0	T 5	T 20
-0,001	1	13,69	13,88	9,25
-0,001	2	15,38	14,92	14,92
-0,001	3	10,2	10,41	15,15
-0,001	Média	13,09	13,07	13,10667
0	Desv Pad	2,641609	2,361588	3,341951

FREQUÊNCIA				
T 20	BA1	T 0	T 5	T 20
0,003	1	13,33	10,63	17,24
0,003	2	12,5	12,82	21,27
0,002	3	14,49	10,41	18,86
0,002667	Média	13,44	11,28667	19,12333
0,000577	Desv Pad	0,99955	1,332454	2,027864

FREQUÊNCIA				
T 20	BA2	T 0	T 5	T 20
0,003	1	18,51	14,28	17,24
0,002	2	15,87	14,49	15,62
0	3	11,36	13,69	11,49
0,001667	Média	15,24667	14,15333	14,78333
0,001528	Desv Pad	3,615527	0,414769	2,9649

RÃS

BA1
BA2
BA3
BA4
BA5
BA6

FREQUÊNCIA				
T 20	BA3	T 0	T 5	T 20
-0,002	1	19,23	15,38	15,62
-0,001	2	10,2	13,33	16,66
0,003	3	10,63	15,15	13,88
0	Média	13,35333	14,62	15,38667
0,002646	Desv Pad	5,093882	1,123076	1,404611

RÃS

BA1
BA2
BA3
BA4
BA5
BA6

FREQUÊNCIA				
T 20	BA4	T 0	T 5	T 20
-0,004	1	13,69	17,24	12,5
-0,005	2	14,92	16,66	15,15
0	3	20,4	11,62	18,18
-0,003	Média	16,33667	15,17333	15,27667
0,002646	Desv Pad	3,572287	3,090911	2,842118

RÃS

BA1
BA2
BA3
BA4
BA5
BA6

FREQUÊNCIA				
T 20	BA5	T 0	T 5	T 20
0,002	1	10,98	12,98	15,87
0,002	2	15,38	13,88	14,49
0,001	3	14,7	10,2	13,88
0,001667	Média	13,68667	12,35333	14,74667
0,000577	Desv Pad	2,368572	1,918367	1,019526

FREQUÊNCIA				
T 20	BA6	T 0	T 5	T 20
0,007	1	13,51	16,12	15,38
0,003	2	12,5	13,69	14,49
0,004	3	14,92	9,43	15,87
0,004667	Média	13,64333	13,08	15,24667
0,002082	Desv Pad	1,215497	3,386458	0,699595

TRANSPORTE

TT0	T0	T5	T20
1	9,766	14,018	12,444
1	15,126	11,666	11,608
1	17,788	14,984	17,66
1	9,278	13,96	10,518
1	18,896	15,13	15,53
1	25,384	19,568	18,694
1	11,158	16,112	15,368
1	9,342	10,132	10,456
1	12,844	10,78	11,148
1	15,104	14,404	12,228

PD

TT0	T0	T5	T20
1	-0,00167	-0,00267	-0,002
1	-0,00233	-0,001	-0,00033
1	0	-0,001	-0,00033
1	-0,003	-0,00133	-0,00033
1	-0,002	-0,00067	-0,00033
1	-0,00267	-0,00267	-0,00033
1	0	0,001	0,001

1			
1	-0,00133	-0,00133	-0,00367
1	-0,00167	-0,00033	-0,00267

FREQUÊNCIA

TT0	T0	T5	T20
1	9,98	14,77	14,17667
1	13,23667	12,98333	14,61
1	14,59	17,42333	19,76333
1	13,39	17,30667	18,43667
1	16,59667	16,29	19,66
1	15,32333	12,94333	10,20333
1	10,59333	11,66333	14,86
1	13,61	17,64333	15,69333
1	13,92333	15,23667	20,13333
1	9,433333	10,48	15,83

TRANSPORTE

TTO	T0	T5	T20
2	11,182	8,858	10,836
2	8,1	8,996	8,816
2	8,998	11,37	9,44
2	10,976	12,16	10,854
2	9,142	10,888	28,504
2	10,796	7,998	22,878
2	13,734	11,732	13,722
2	15,562	14,59	14,03
2	9,888	12,856	13,736
2	26,446	11,118	12,682

PD

TT0	T0	T5	T20
2	-0,001	-0,00167	-0,00033
2	0,000333	-0,00333	-0,003
2	-0,00233	-0,00033	-0,004
2	-0,00017	-0,00133	-0,00167
2	-0,00267	0,001	-0,00033
2	0,003	-0,00033	0,001
2	-0,00233	-0,002	-0,00433
2	-0,00467	-0,00267	-0,00233
2	0,000333	-0,00033	-0,004
2	-0,003	-0,00333	-0,004

FREQUÊNCIA

TT0	T0	T5	T20
2	13,68	18,46	11,9
2	11,89333	17,2	17,68667
2	12,83667	11,76	10,97
2	12,26	13,89667	13,33333
2	12,74	15,3	17,51333
2	15,55667	13,48333	13,89333
2	14,11667	12,19333	12,63333
2	15,03333	11,56	12,20667
2	14,02667	17,15	14,81667
2	12,65667	14,91667	15,38333

TRANSPORTE

TT0	T0	T5	T20
3	9,424	9,954	15,764
3	15,982	10,482	27,316
3	19,252	17,03	46,892
3	11,298	31,142	42,678
3	11,924	9,978	22,738
3	11,29	11,674	14,438
3	11,544	12,974	20,202
3	10,058	13,012	33,902
3	18,054	11,736	23,942
3	14,48	13,386	40,222

PD

TT0	T0	T5	T20
3	0,001667	0	0,002
3	0	-0,001	0,000667
3	-0,00067	-0,00167	-0,00133

3	0,002	-0,00067	0,001
3	-0,001	-0,002	-0,00067
3	-0,00167	0,001333	-0,001
3	0,005	-0,002	0
3	-0,00367	-0,009	-0,00033
3	-0,001	-0,00167	-0,00333
3	0,000667	-0,00433	0,000333

FREQUÊNCIA

TT0	T0	T5	T20
3	16,34333	12,80667	13,68667
3	10,75667	15,17667	12,65333
3	10,20667	10,45333	11,32
3	13,32667	12,98	17,59667
3	11,23333	10,88667	10,6
3	11,46	12,13	10,91667
3	13,46333	16,52667	10,42667
3	15,84333	15,7333	9,903333
3	16,08667	15,97667	13,23
3	13,35	12,93	11,9

TRANSPORTE

TT0	T0	T5	T20
4	11,154	79	107
4	17,476	14,846	339,902
4	14,858	10,47	
4	9,52	16,436	23,94
4	19,614	20,992	52,434
4	24,63	20,508	82,486
4	33,25	16,83	34,68
4	12,938	17,19	27,578
4	17,49	9,92	19,788
4	7,34	14,696	62,442

PD

TT0	T0	T5	T20
4	0,003333	0,004	0,003
4	-0,00267	-0,00233	0,002
4	-0,002	-0,00067	0,002
4	-0,002	-0,002	0,002333
4	-0,003	-0,001	0,000667
4	-0,002	-0,002	0,00067
4	-0,001	0,001	0,000333
4			
4	-0,00167	-0,00233	-0,00233
4	-0,002	-0,003	-0,001

FREQUÊNCIA

TT0	T0	T5	T20
4	12,61333	16,34333	
4	10,58333	18,44	19,84667
4	14,15667	15,38333	16,32333
4	12,85667	20,72333	13,57
4	13,21333	13,86667	17,50667
4	12,64	17,75667	11,5
4		11,43333	
4	12,10667	16,84667	9,95
4	13,13667	15,22667	16,02667
4	13,09	13,07	13,10667

TRANSPORTE

TTO	T0	T5	T20
5	11,898	29,49	66,3
5	13,576	15,07	237,738
5	15,604	12,614	16,284
5	8,91	11,048	13,826
5	14,776	14,08	19,05
5	16,68	16,086	21,124

PD

TT0	T0	T5	T20
5	-0,00067	-0,00067	0,002667
5	0,00067	-0,00233	0,001667
5	-0,006	-0,00333	0
5	-0,00033	0,00267	-0,003
5	-0,00133	-0,00033	0,001667
5	0,005	0,004	0,004667

FREQUÊNCIA

TT0	T0	T5	T20
5	13,44	11,28667	19,12333
5	15,24667	14,15333	14,78333
5	13,35333	14,62	15,38667
5	16,33667	15,17333	15,27667
5	13,68667	12,35333	14,74667
5	13,64333	13,08	15,24667

Anexo 3

Estatística

PROGRAMA SPSS – versão 10.0 para Windows

Tese: Efeitos da infusão de *Luffa operculata* sobre o epitélio e a atividade mucociliar do palato isolado de rã

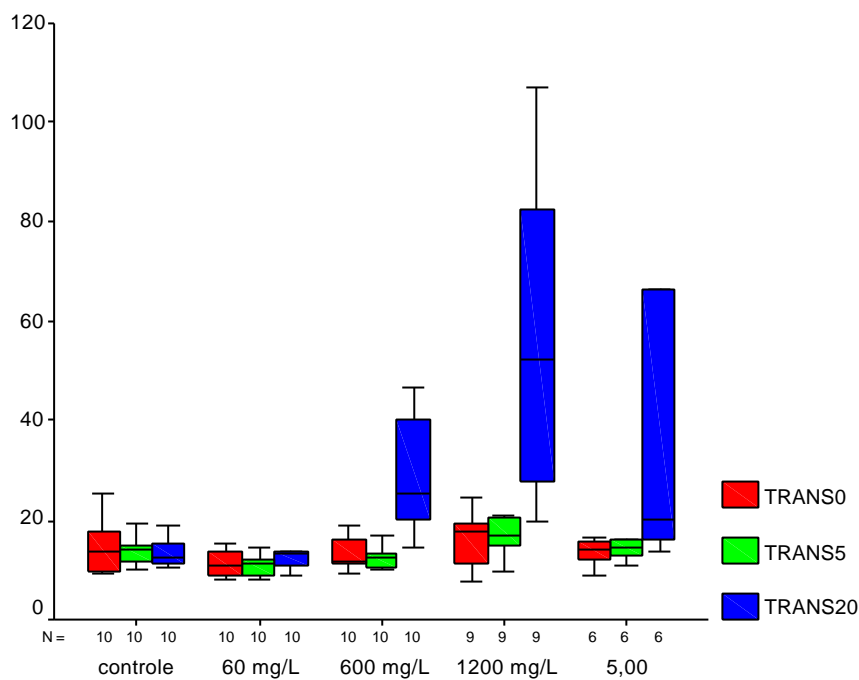
MÔNICA AIDAR MENON MIYAKE

Explore

TRAT – VELOCIDADE DE TRANSPORTE MUCOCILIAR

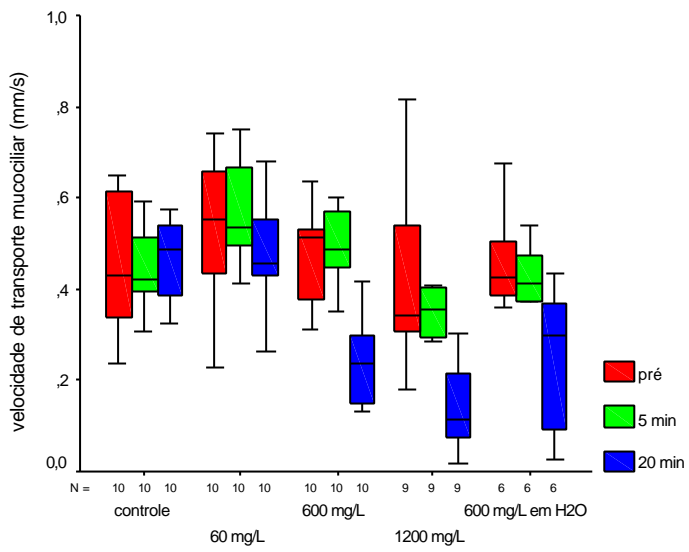
Case Processing Summary

TRAT	Cases						
	Valid		Missing		Total		
	N	Percent	N	Percent	N	Percent	
TRANS0	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	5,00	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
TRANS5	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	5,00	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
TRANS20	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	5,00	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%



Case Processing Summary

TRAT		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
VEL0	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
VEL5	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
VEL20	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%



General Linear Model

Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE_1

TEMPO	Dependent Variable
1	VEL0
2	VEL5
3	VEL20

Between-Subjects Factors

	Value Label	N	
TRAT	1,00	controle	10
	2,00	60 mg/L	10
	3,00	600 mg/L	10
	4,00	1200 mg/L	9
	5,00	600 mg/L em H2O	6

Descriptive Statistics

TRAT		Mean	Std. Deviation	N
VEL0	controle	,4593	,1458	10
	60 mg/L	,5359	,1517	10
	600 mg/L	,4752	,1109	10
	1200 mg/L	,4295	,2032	9
	600 mg/L em H2O	,4617	,1153	6
	Total	,4742	,1481	45
VEL5	controle	,4413	8,748E-02	10
	60 mg/L	,5596	,1057	10
	600 mg/L	,4719	,1249	10
	1200 mg/L	,3491	,1388	9
	600 mg/L em H2O	,4032	,1150	6
	Total	,4509	,1314	45
VEL20	controle	,4610	9,428E-02	10
	60 mg/L	,4670	,1491	10
	600 mg/L	,2422	9,975E-02	10
	1200 mg/L	,1446	9,677E-02	9
	600 mg/L em H2O	,2529	,1607	6
	Total	,3227	,1753	45

Multivariate Test^d

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
TEMPO	Pillai's Trace	,636	34,089 ^b	2,000	39,000	,000	,636	68,178	1,000
	Wilks' Lambda	,364	34,089 ^b	2,000	39,000	,000	,636	68,178	1,000
	Hotelling's Trace	1,748	34,089 ^b	2,000	39,000	,000	,636	68,178	1,000
	Roy's Largest Root	1,748	34,089 ^b	2,000	39,000	,000	,636	68,178	1,000
TEMPO * TRAT	Pillai's Trace	,508	3,408	8,000	80,000	,002	,254	27,262	,967
	Wilks' Lambda	,511	3,887 ^b	8,000	78,000	,001	,285	31,096	,984
	Hotelling's Trace	,918	4,361	8,000	76,000	,000	,315	34,889	,992
	Roy's Largest Root	,874	8,745 ^c	4,000	40,000	,000	,467	34,980	,998

a. Computed using alpha = ,05

b. Exact statistic

c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

d.

Design: Intercept+TRAT

Within Subjects Design: TEMPO

Mauchly's Test of Sphericity^b

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
TEMPO	,850	6,316	2	,043	,870	,997	,500

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

b.

Design: Intercept+TRAT

Within Subjects Design: TEMPO

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	TEMPO	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
TEMPO	Linear	,546	1	,546	40,230	,000	,501	40,230	1,000
	Quadratic	7,830E-02	1	7,830E-02	7,579	,009	,159	7,579	,766
TEMPO * TRAT	Linear	,275	4	6,865E-02	5,062	,002	,336	20,249	,943
	Quadratic	5,933E-02	4	1,483E-02	1,436	,240	,126	5,743	,405
Error(TEMPO)	Linear	,542	40	1,356E-02					
	Quadratic	,413	40	1,033E-02					

a. Computed using alpha = ,05

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
Intercept	21,852	1	21,852	829,379	,000	,954	829,379	1,000
TRAT	,735	4	,184	6,970	,000	,411	27,878	,989
Error	1,054	40	2,635E-02					

a. Computed using alpha = ,05

Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent. Parameter	Observ. Power
						Lower Bound	Upper Bound			
VEL0	Intercept	,462	,061	7,514	,000	,337	,586	,585	7,514	1,0
	[TRAT=1,00]	-2,32E-03	,078	-,030	,976	-,159	,155	,000	,030	,0
	[TRAT=2,00]	7,424E-02	,078	,955	,345	-8,283E-02	,231	,022	,955	,1
	[TRAT=3,00]	1,359E-02	,078	,175	,862	-,143	,171	,001	,175	,0
	[TRAT=4,00]	-3,21E-02	,079	-,405	,688	-,192	,128	,004	,405	,0
	[TRAT=5,00]	0 ^b	,	,	,	,	,	,	,	,
VEL5	Intercept	,403	,047	8,581	,000	,308	,498	,648	8,581	1,0
	[TRAT=1,00]	3,810E-02	,059	,641	,525	-8,203E-02	,158	,010	,641	,0
	[TRAT=2,00]	,156	,059	2,630	,012	3,619E-02	,276	,147	2,630	,7
	[TRAT=3,00]	6,860E-02	,059	1,154	,255	-5,153E-02	,189	,032	1,154	,2
	[TRAT=4,00]	-5,41E-02	,061	-,892	,378	-,177	6,850E-02	,020	,892	,1
	[TRAT=5,00]	0 ^b	,	,	,	,	,	,	,	,
VEL20	Intercept	,253	,049	5,172	,000	,154	,352	,401	5,172	,9
	[TRAT=1,00]	,208	,062	3,365	,002	8,313E-02	,333	,221	3,365	,9
	[TRAT=2,00]	,214	,062	3,463	,001	8,918E-02	,339	,231	3,463	,9
	[TRAT=3,00]	-1,07E-02	,062	-,172	,864	-,136	,114	,001	,172	,0
	[TRAT=4,00]	-,108	,063	-1,715	,094	-,236	1,930E-02	,069	1,715	,3
	[TRAT=5,00]	0 ^b	,	,	,	,	,	,	,	,

a. Computed using alpha = ,05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.

Lack of Fit

Multivariate Tests

Dependent Variables		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
VEL0, VEL5, VEL20	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	39,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	3,000	37,000	1,000	,000	,000	,050
VEL0, VEL5	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	39,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	38,000	1,000	,000	,000	,050
VEL0, VEL20	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	39,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	38,000	1,000	,000	,000	,050
VEL5, VEL20	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	39,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	38,000	1,000	,000	,000	,050
VEL0	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	40,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	39,000	1,000	,000	,000	,050
VEL5	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	40,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	39,000	1,000	,000	,000	,050
VEL20	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	40,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	39,000	1,000	,000	,000	,050

a. Computed using alpha = ,05

b. Exact statistic

Univariate Tests

Dependent Variable	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
VEL0	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	,906	40	2,265E-02	,	,	,	,	,
VEL5	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	,530	40	1,325E-02	,	,	,	,	,
VEL20	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	,574	40	1,434E-02	,	,	,	,	,

a. Computed using alpha = ,05

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Measure: MEASURE_1

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
,410	,014	,382	,439

Post Hoc Tests

TRAT

Multiple Comparisons

Measure: MEASURE_1

	(I) TRAT	(J) TRAT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	controle	60 mg/L	-6,6949E-02	4,191E-02	,118	-,1517	1,776E-02
		600 mg/L	5,745E-02	4,191E-02	,178	-2,7254E-02	,1422
		1200 mg/L	,1461*	4,306E-02	,002	5,910E-02	,2332
		600 mg/L em H2O	8,130E-02	4,839E-02	,101	-1,6514E-02	,1791
	60 mg/L	controle	6,695E-02	4,191E-02	,118	-1,7756E-02	,1517
		600 mg/L	,1244*	4,191E-02	,005	3,969E-02	,2091
		1200 mg/L	,2131*	4,306E-02	,000	,1261	,3001
		600 mg/L em H2O	,1482*	4,839E-02	,004	5,044E-02	,2461
	600 mg/L	controle	-5,7451E-02	4,191E-02	,178	-,1422	2,725E-02
		60 mg/L	-,1244*	4,191E-02	,005	-,2091	-3,9695E-02
		1200 mg/L	8,868E-02*	4,306E-02	,046	1,654E-03	,1757
		600 mg/L em H2O	2,384E-02	4,839E-02	,625	-7,3964E-02	,1217
	1200 mg/L	controle	-,1461*	4,306E-02	,002	-,2332	-5,9104E-02
		60 mg/L	-,2131*	4,306E-02	,000	-,3001	-,1261
		600 mg/L	-8,8680E-02*	4,306E-02	,046	-,1757	-1,6536E-03
		600 mg/L em H2O	-6,4835E-02	4,939E-02	,197	-,1647	3,499E-02
600 mg/L em H2O	controle	-8,1295E-02	4,839E-02	,101	-,1791	1,651E-02	
	60 mg/L	-,1482*	4,839E-02	,004	-,2461	-5,0435E-02	
	600 mg/L	-2,3845E-02	4,839E-02	,625	-,1217	7,396E-02	
	1200 mg/L	6,484E-02	4,939E-02	,197	-3,4991E-02	,1647	

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

MEASURE_1

TRAT	N	Subset		
		1	2	3
Student-Newman-Keuls ^{a,t} 1200 mg/L	9	,3078		
600 mg/L em H2O	6	,3726	,3726	
600 mg/L	10	,3964	,3964	
controle	10		,4539	,4539
60 mg/L	10			,5208
Sig.		,133	,181	,145

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

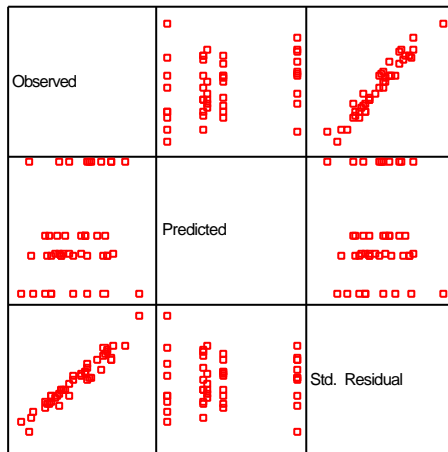
Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 8,783E-03.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,654.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

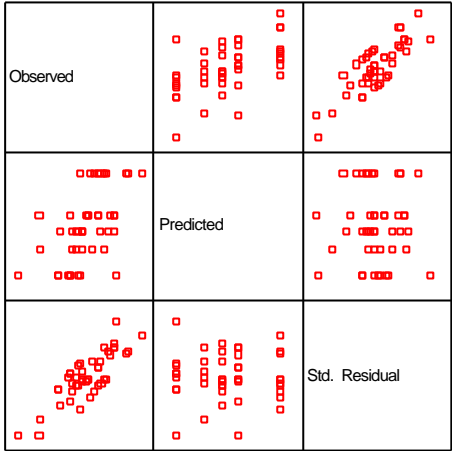
Observed * Predicted * Std. Residual Plots

Dependent Variable: VELO



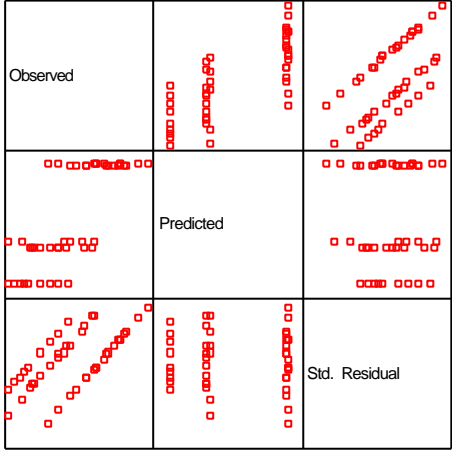
Model: Intercept + TRAT

Dependent Variable: VEL5



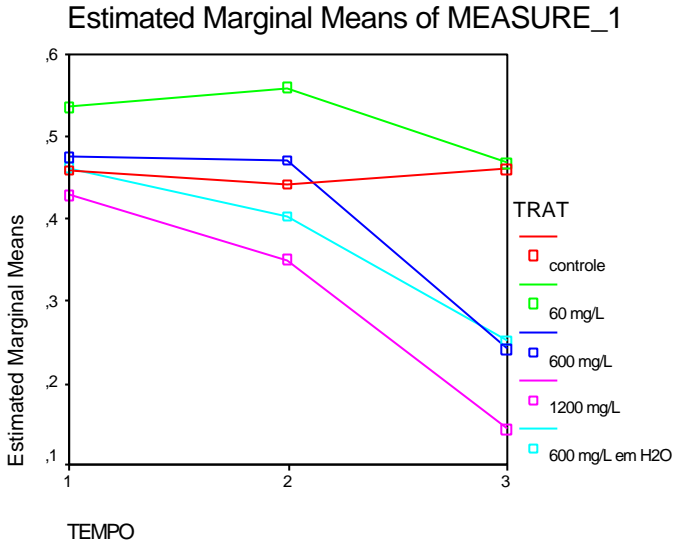
Model: Intercept + TRAT

Dependent Variable: VEL20



Model: Intercept + TRAT

Profile Plots

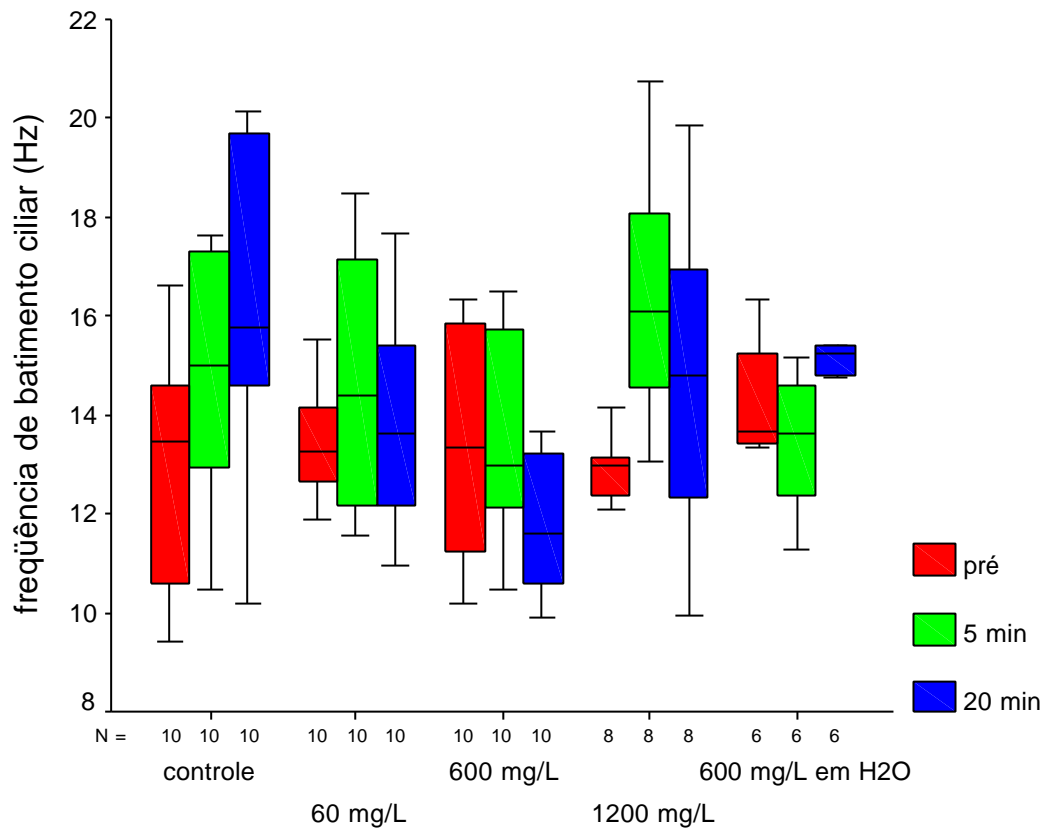


Explore

TRAT – FREQUÊNCIA DE BATIMENTO CILIAR

Case Processing Summary

TRAT		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
FREQ0	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	8	80,0%	2	20,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
FREQ5	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	8	80,0%	2	20,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
FREQ20	controle	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	8	80,0%	2	20,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%



General Linear Model

Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE_1

TEMPO	Dependent Variable
1	FREQ0
2	FREQ5
3	FREQ20

Between-Subjects Factors

TRAT	Value Label	N
1,00	controle	10
2,00	60 mg/L	10
3,00	600 mg/L	10
4,00	1200 mg/L	8
5,00	600 mg/L em H2O	6

Descriptive Statistics

TRAT		Mean	Std. Deviation	N
FREQ0	controle	13,0677	2,3543	10
	60 mg/L	13,4800	1,2071	10
	600 mg/L	13,2070	2,2885	10
	1200 mg/L	12,7229	1,0409	8
	600 mg/L em H2O	14,2844	1,2236	6
	Total	13,2963	1,7694	44
FREQ5	controle	14,6740	2,5550	10
	60 mg/L	14,5920	2,4402	10
	600 mg/L	13,5600	2,1634	10
	1200 mg/L	16,4142	2,5301	8
	600 mg/L em H2O	13,4444	1,4733	6
	Total	14,5509	2,4363	44
FREQ20	controle	16,3367	3,1575	10
	60 mg/L	14,0337	2,3006	10
	600 mg/L	12,2233	2,2629	10
	1200 mg/L	14,7288	3,2814	8
	600 mg/L em H2O	15,7606	1,6691	6
	Total	14,5075	2,9351	44

Multivariate Tests^d

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
TEMPO	Pillai's Trace	,231	5,713 ^b	2,000	38,000	,007	,231	11,426	,837
	Wilks' Lambda	,769	5,713 ^b	2,000	38,000	,007	,231	11,426	,837
	Hotelling's Trace	,301	5,713 ^b	2,000	38,000	,007	,231	11,426	,837
	Roy's Largest Root	,301	5,713 ^b	2,000	38,000	,007	,231	11,426	,837
TEMPO * TRAT	Pillai's Trace	,453	2,858	8,000	78,000	,008	,227	22,861	,926
	Wilks' Lambda	,597	2,791 ^b	8,000	76,000	,009	,227	22,327	,919
	Hotelling's Trace	,589	2,724	8,000	74,000	,011	,227	21,790	,910
	Roy's Largest Root	,337	3,281 ^c	4,000	39,000	,021	,252	13,124	,788

a. Computed using alpha = ,05

b. Exact statistic

c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

d.

Design: Intercept+TRAT

Within Subjects Design: TEMPO

Mauchly's Test of Sphericity

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
TEMPO	,929	2,800	2	,247	,934	1,000	,500

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in Tests of Within-Subjects Effects table.

b.

Design: Intercept+TRAT

Within Subjects Design: TEMPO

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
TEMPO	Sphericity Assumed	42,361	2	21,180	4,890	,010	,111	9,779	,79
	Greenhouse-Geisser	42,361	1,867	22,685	4,890	,012	,111	9,131	,76
	Huynh-Feldt	42,361	2,000	21,180	4,890	,010	,111	9,779	,79
	Lower-bound	42,361	1,000	42,361	4,890	,033	,111	4,890	,57
TEMPO * TRAT	Sphericity Assumed	95,722	8	11,965	2,762	,010	,221	22,098	,91
	Greenhouse-Geisser	95,722	7,469	12,815	2,762	,012	,221	20,633	,90
	Huynh-Feldt	95,722	8,000	11,965	2,762	,010	,221	22,098	,91
	Lower-bound	95,722	4,000	23,930	2,762	,041	,221	11,049	,70
Error(TEMPO)	Sphericity Assumed	337,870	78	4,332					
	Greenhouse-Geisser	337,870	72,827	4,639					
	Huynh-Feldt	337,870	78,000	4,332					
	Lower-bound	337,870	39,000	8,663					

a. Computed using alpha = ,05

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	TEMPO	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
TEMPO	Linear	33,764	1	33,764	6,922	,012	,151	6,922	,728
	Quadratic	8,596	1	8,596	2,271	,140	,055	2,271	,312
TEMPO * TRAT	Linear	50,158	4	12,539	2,571	,053	,209	10,283	,670
	Quadratic	45,564	4	11,391	3,009	,030	,236	12,036	,748
Error(TEMPO)	Linear	190,233	39	4,878					
	Quadratic	147,637	39	3,786					

a. Computed using alpha = ,05

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
Intercept	25447,232	1	25447,232	3672,886	,000	,989	3672,886	1,000
TRAT	56,504	4	14,126	2,039	,108	,173	8,155	,556
Error	270,208	39	6,928					

a. Computed using alpha = ,05

Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
						Lower Bound	Upper Bound			
FREQ0	Intercept	14,284	,731	19,528	,000	12,805	15,764	,907	19,528	1,000
	[TRAT=1,00]	-1,217	,925	-1,315	,196	-3,088	,655	,042	1,315	,250
	[TRAT=2,00]	-,804	,925	-,869	,390	-2,676	1,067	,019	,869	,136
	[TRAT=3,00]	-1,077	,925	-1,164	,251	-2,949	,794	,034	1,164	,206
	[TRAT=4,00]	-1,562	,968	-1,614	,115	-3,519	,396	,063	1,614	,350
	[TRAT=5,00]	0 ^b	,	,	,	,	,	,	,	,
FREQ5	Intercept	13,444	,948	14,188	,000	11,528	15,361	,838	14,188	1,000
	[TRAT=1,00]	1,230	1,199	1,026	,311	-1,195	3,654	,026	1,026	,170
	[TRAT=2,00]	1,148	1,199	,957	,344	-1,277	3,572	,023	,957	,154
	[TRAT=3,00]	,116	1,199	,096	,924	-2,309	2,540	,000	,096	,051
	[TRAT=4,00]	2,970	1,254	2,369	,023	,434	5,505	,126	2,369	,637
	[TRAT=5,00]	0 ^b	,	,	,	,	,	,	,	,
FREQ20	Intercept	15,761	1,080	14,598	,000	13,577	17,944	,845	14,598	1,000
	[TRAT=1,00]	,576	1,366	,422	,675	-2,186	3,338	,005	,422	,070
	[TRAT=2,00]	-1,727	1,366	-1,265	,214	-4,489	1,035	,039	1,265	,234
	[TRAT=3,00]	-3,537	1,366	-2,590	,013	-6,299	-,775	,147	2,590	,714
	[TRAT=4,00]	-1,032	1,428	-,722	,474	-3,921	1,857	,013	,722	,109
	[TRAT=5,00]	0 ^b	,	,	,	,	,	,	,	,

a. Computed using alpha = ,05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.

Lack of Fit

Multivariate Tests

Dependent Variables	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
FREQ0, FREQ5, FREQ20	Pillai's Trace	,000	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,000	38,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	3,000	36,000	1,000	,000	,000
FREQ0, FREQ5	Pillai's Trace	,000	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,000	38,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	37,000	1,000	,000	,000
FREQ0, FREQ20	Pillai's Trace	,000	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,000	38,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	37,000	1,000	,000	,000
FREQ5, FREQ20	Pillai's Trace	,000	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,000	38,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	37,000	1,000	,000	,000
FREQ0	Pillai's Trace	,000	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,000	39,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	38,000	1,000	,000	,000
FREQ5	Pillai's Trace	,000	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,000	39,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	38,000	1,000	,000	,000
FREQ20	Pillai's Trace	,000	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,000	39,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	38,000	1,000	,000	,000

a. Computed using alpha = ,05

b. Exact statistic

Univariate Tests

Dependent Variable	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
FREQ0	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	125,201	39	3,210	,	,	,	,	,
FREQ5	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	210,127	39	5,388	,	,	,	,	,
FREQ20	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	272,749	39	6,994	,	,	,	,	,

a. Computed using alpha = ,05

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Measure: MEASURE_1

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
14,169	,234	13,696	14,642

Post Hoc Tests

TRAT

Multiple Comparisons

Measure: MEASURE_1

	(I) TRAT	(J) TRAT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	controle	60 mg/L	,6576	,6796	,339	-,7171	2,0322
		600 mg/L	1,6960*	,6796	,017	,3213	3,0707
		1200 mg/L	7,083E-02	,7209	,922	-1,3872	1,5289
		600 mg/L em H2O	,1963	,7848	,804	-1,3910	1,7836
	60 mg/L	controle	-,6576	,6796	,339	-2,0322	,7171
		600 mg/L	1,0384	,6796	,135	-,3362	2,4131
		1200 mg/L	-,5867	,7209	,421	-2,0448	,8713
		600 mg/L em H2O	-,4613	,7848	,560	-2,0486	1,1261
	600 mg/L	controle	-1,6960*	,6796	,017	-3,0707	-,3213
		60 mg/L	-1,0384	,6796	,135	-2,4131	,3362
		1200 mg/L	-1,6252*	,7209	,030	-3,0832	-,1671
		600 mg/L em H2O	-1,4997	,7848	,063	-3,0870	8,764E-02
	1200 mg/L	controle	-7,0832E-02	,7209	,922	-1,5289	1,3872
		60 mg/L	,5867	,7209	,421	-,8713	2,0448
		600 mg/L	1,6252*	,7209	,030	,1671	3,0832
		600 mg/L em H2O	,1255	,8207	,879	-1,5346	1,7855
600 mg/L em H2O	controle	-,1963	,7848	,804	-1,7836	1,3910	
	60 mg/L	,4613	,7848	,560	-1,1261	2,0486	
	600 mg/L	1,4997	,7848	,063	-8,7635E-02	3,0870	
	1200 mg/L	-,1255	,8207	,879	-1,7855	1,5346	

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

MEASURE_1

TRAT	N	Subset
		1
Student-Newman-Keuls ^{a,t} 600 mg/L	10	12,9968
60 mg/L	10	14,0352
600 mg/L em H2O	6	14,4965
1200 mg/L	8	14,6219
controle	10	14,6928
Sig.		,169

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

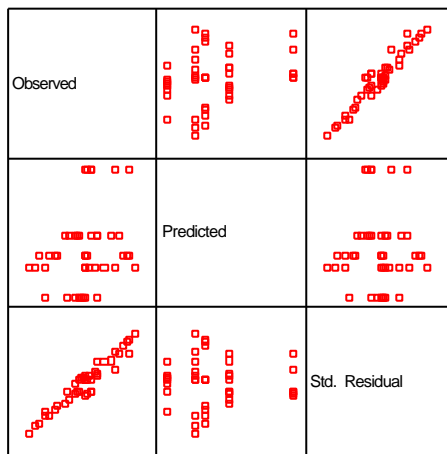
Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2,309.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,451.
- b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- c. Alpha = ,05.

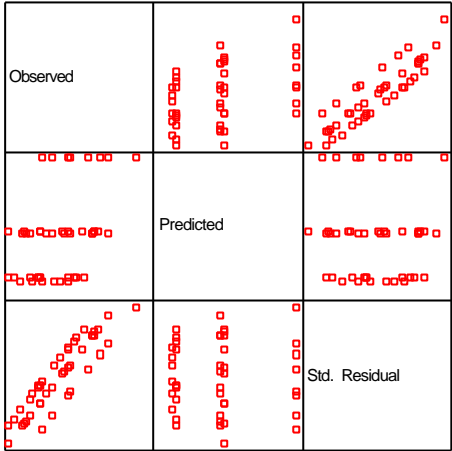
Observed * Predicted * Std. Residual Plots

Dependent Variable: FREQ0



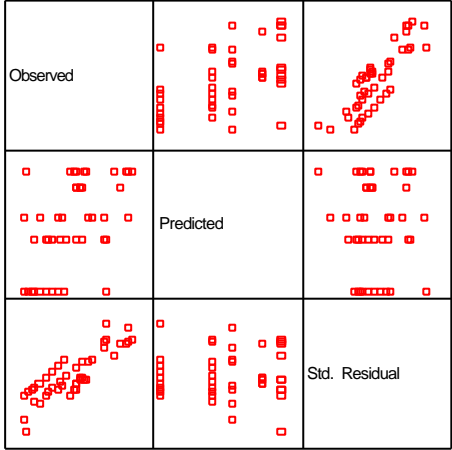
Model: Intercept + TRAT

Dependent Variable: FREQ5



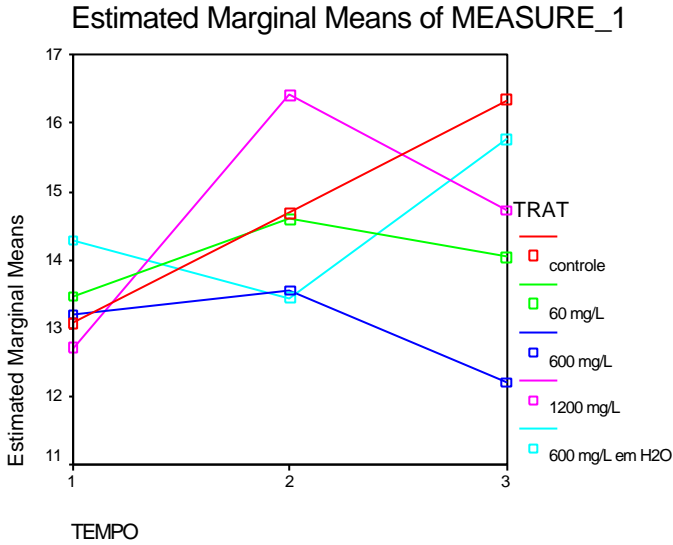
Model: Intercept + TRAT

Dependent Variable: FREQ20



Model: Intercept + TRAT

Profile Plots

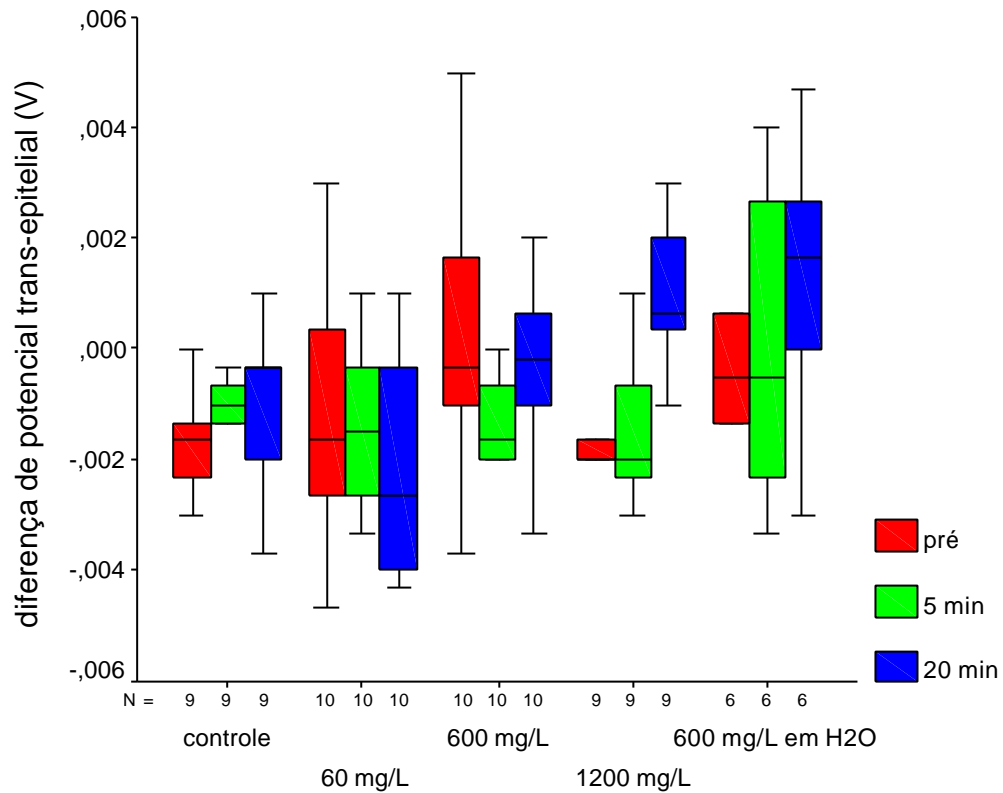


Explore

TRAT – DIFERENÇA DE POTENCIAL TRANSEPITELIAL

Case Processing Summary

TRAT		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
PD0	controle	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
PD5	controle	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%
PD20	controle	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	60 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	600 mg/L	10	100,0%	0	,0%	10	100,0%
	1200 mg/L	9	90,0%	1	10,0%	10	100,0%
	600 mg/L em H2O	6	100,0%	0	,0%	6	100,0%



General Linear Model

Within-Subjects Factors

Measure: MEASURE_1

TEMPO	Dependent Variable
1	PD0
2	PD5
3	PD20

Between-Subjects Factors

TRAT	Value Label	N
1,00	controle	9
2,00	60 mg/L	10
3,00	600 mg/L	10
4,00	1200 mg/L	9
5,00	600 mg/L em H2O	6

Descriptive Statistics

TRAT		Mean	Std. Deviation	N
PD0	controle	-1,63E-03	1,060E-03	9
	60 mg/L	-1,25E-03	2,196E-03	10
	600 mg/L	1,324E-04	2,375E-03	10
	1200 mg/L	-1,45E-03	1,878E-03	9
	600 mg/L em H2O	-4,43E-04	3,538E-03	6
	Total	-9,43E-04	2,234E-03	44
PD5	controle	-1,11E-03	1,131E-03	9
	60 mg/L	-1,43E-03	1,441E-03	10
	600 mg/L	-2,10E-03	2,837E-03	10
	1200 mg/L	-9,26E-04	2,196E-03	9
	600 mg/L em H2O	1,667E-06	2,836E-03	6
	Total	-1,22E-03	2,147E-03	44
PD20	controle	-9,99E-04	1,465E-03	9
	60 mg/L	-2,30E-03	1,895E-03	10
	600 mg/L	-2,66E-04	1,463E-03	10
	1200 mg/L	8,526E-04	1,708E-03	9
	600 mg/L em H2O	1,278E-03	2,594E-03	6
	Total	-4,39E-04	2,136E-03	44

Multivariate Tests^d

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
TEMPO	Pillai's Trace	,120	2,599 ^b	2,000	38,000	,088	,120	5,197	,487
	Wilks' Lambda	,880	2,599 ^b	2,000	38,000	,088	,120	5,197	,487
	Hotelling's Trace	,137	2,599 ^b	2,000	38,000	,088	,120	5,197	,487
	Roy's Largest Root	,137	2,599 ^b	2,000	38,000	,088	,120	5,197	,487
TEMPO * TRAT	Pillai's Trace	,468	2,979	8,000	78,000	,006	,234	23,833	,938
	Wilks' Lambda	,584	2,934 ^b	8,000	76,000	,007	,236	23,475	,933
	Hotelling's Trace	,624	2,888	8,000	74,000	,007	,238	23,105	,928
	Roy's Largest Root	,406	3,957 ^c	4,000	39,000	,009	,289	15,826	,867

a. Computed using alpha = ,05

b. Exact statistic

c. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

d.

Design: Intercept+TRAT

Within Subjects Design: TEMPO

Mauchly's Test of Sphericity

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
TEMPO	,961	1,510	2	,470	,963	1,000	,500

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in Tests of Within-Subjects Effects table.

b.

Design: Intercept+TRAT

Within Subjects Design: TEMPO

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
TEMPO	Sphericity Assumed	1,597E-05	2	7,986E-06	3,166	,048	,075	6,333	,591
	Greenhouse-Geisser	1,597E-05	1,925	8,297E-06	3,166	,050	,075	6,095	,579
	Huynh-Feldt	1,597E-05	2,000	7,986E-06	3,166	,048	,075	6,333	,591
	Lower-bound	1,597E-05	1,000	1,597E-05	3,166	,083	,075	3,166	,411
TEMPO * TRAT	Sphericity Assumed	5,861E-05	8	7,327E-06	2,905	,007	,230	23,240	,931
	Greenhouse-Geisser	5,861E-05	7,700	7,612E-06	2,905	,008	,230	22,368	,923
	Huynh-Feldt	5,861E-05	8,000	7,327E-06	2,905	,007	,230	23,240	,931
	Lower-bound	5,861E-05	4,000	1,465E-05	2,905	,034	,230	11,620	,730
Error(TEMPO)	Sphericity Assumed	1,967E-04	78	2,522E-06					
	Greenhouse-Geisser	1,967E-04	75,075	2,620E-06					
	Huynh-Feldt	1,967E-04	78,000	2,522E-06					
	Lower-bound	1,967E-04	39,000	5,044E-06					

a. Computed using alpha = ,05

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: MEASURE_1

Source	TEMPO	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
TEMPO	Linear	8,708E-06	1	8,708E-06	3,574	,066	,084	3,574	,454
	Quadratic	7,264E-06	1	7,264E-06	2,785	,103	,067	2,785	,370
TEMPO * TRAT	Linear	3,512E-05	4	8,781E-06	3,604	,014	,270	14,418	,830
	Quadratic	2,349E-05	4	5,873E-06	2,252	,081	,188	9,007	,604
Error(TEMPO)	Linear	9,501E-05	39	2,436E-06					
	Quadratic	1,017E-04	39	2,608E-06					

a. Computed using alpha = ,05

Tests of Between-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

Transformed Variable: Average

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
Intercept	7,665E-05	1	7,665E-05	9,861	,003	,202	9,861	,865
TRAT	5,038E-05	4	1,259E-05	1,620	,189	,142	6,481	,452
Error	3,032E-04	39	7,773E-06					

a. Computed using alpha = ,05

Parameter Estimates

Dependent Variable	Parameter	B	Std. Error	t	Sig.	95% Confidence Interval		Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
						Lower Bound	Upper Bound			
PD0	Intercept	-4,43E-04	,001	-,486	,629	-2,284E-03	1,399E-03	,006	,486	,076
	[TRAT=1,00]	-1,19E-03	,001	-1,010	,319	-3,565E-03	1,190E-03	,025	1,010	,166
	[TRAT=2,00]	-8,07E-04	,001	-,701	,488	-3,137E-03	1,522E-03	,012	,701	,105
	[TRAT=3,00]	,752E-04	,001	,499	,620	-1,754E-03	2,905E-03	,006	,499	,078
	[TRAT=4,00]	-1,00E-03	,001	-,853	,399	-3,380E-03	1,375E-03	,018	,853	,132
	[TRAT=5,00]	0 ^b								
PD5	Intercept	,667E-06	,001	,002	,998	-1,773E-03	1,776E-03	,000	,002	,050
	[TRAT=1,00]	-1,11E-03	,001	-,982	,332	-3,404E-03	1,178E-03	,024	,982	,160
	[TRAT=2,00]	-1,43E-03	,001	-1,292	,204	-3,679E-03	8,113E-04	,041	1,292	,243
	[TRAT=3,00]	-2,10E-03	,001	-1,894	,066	-4,347E-03	1,426E-04	,084	1,894	,455
	[TRAT=4,00]	-9,27E-04	,001	-,819	,418	-3,218E-03	1,364E-03	,017	,819	,126
	[TRAT=5,00]	0 ^b								
PD20	Intercept	,278E-03	,001	1,743	,089	-2,047E-04	2,761E-03	,072	1,743	,398
	[TRAT=1,00]	-2,28E-03	,001	-2,406	,021	-4,191E-03	-3,627E-04	,129	2,406	,650
	[TRAT=2,00]	-3,58E-03	,001	-3,858	,000	-5,453E-03	-1,701E-03	,276	3,858	,964
	[TRAT=3,00]	-1,54E-03	,001	-1,665	,104	-3,420E-03	3,315E-04	,066	1,665	,369
	[TRAT=4,00]	-4,25E-04	,001	-,450	,656	-2,340E-03	1,489E-03	,005	,450	,072
	[TRAT=5,00]	0 ^b								

a. Computed using alpha = ,05

b. This parameter is set to zero because it is redundant.

Lack of Fit

Multivariate Tests

Dependent Variables		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
PD0, PD5, PD20	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	38,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	3,000	36,000	1,000	,000	,000	,050
PD0, PD5	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	38,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	37,000	1,000	,000	,000	,050
PD0, PD20	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	38,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	37,000	1,000	,000	,000	,050
PD5, PD20	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	38,500	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	2,000	37,000	1,000	,000	,000	,050
PD0	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	39,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	38,000	1,000	,000	,000	,050
PD5	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	39,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	38,000	1,000	,000	,000	,050
PD20	Pillai's Trace	,000	,	,000	,000	,	,	,	,
	Wilks' Lambda	1,000	,	,000	39,000	,	,	,	,
	Hotelling's Trace	,000	,	,000	2,000	,	,	,	,
	Roy's Largest Root	,000	,000 ^b	1,000	38,000	1,000	,000	,000	,050

a. Computed using alpha = ,05

b. Exact statistic

Univariate Tests

Dependent Variable	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power ^a
PD0	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	1,940E-04	39	4,974E-06					
PD5	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	1,802E-04	39	4,619E-06					
PD20	Lack of Fit	,000	0	,	,	,	,000	,000	,
	Pure Error	1,257E-04	39	3,224E-06					

a. Computed using alpha = ,05

Estimated Marginal Means

Grand Mean

Measure: MEASURE_1

Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
-7,76E-04	,000	-1,275E-03	-2,761E-04

Post Hoc Tests

TRAT

Multiple Comparisons

Measure: MEASURE_1

(I) TRAT	(J) TRAT	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
LSD	controle	60 mg/L	4,137E-04	7,396E-04	,579	-1,0823E-03	1,910E-03
		600 mg/L	-5,0190E-04	7,396E-04	,501	-1,9979E-03	9,941E-04
		1200 mg/L	-7,4059E-04	7,588E-04	,335	-2,2754E-03	7,942E-04
		600 mg/L em H2O	-1,5256E-03	8,484E-04	,080	-3,2416E-03	1,904E-04
60 mg/L	controle	600 mg/L	-4,1370E-04	7,396E-04	,579	-1,9097E-03	1,082E-03
		600 mg/L	-9,1560E-04	7,199E-04	,211	-2,3717E-03	5,405E-04
		1200 mg/L	-1,1543E-03	7,396E-04	,127	-2,6503E-03	3,417E-04
		600 mg/L em H2O	-1,9393E-03*	8,312E-04	,025	-3,6206E-03	-2,5799E-04
600 mg/L	controle	600 mg/L em H2O	5,019E-04	7,396E-04	,501	-9,9407E-04	1,998E-03
		60 mg/L	9,156E-04	7,199E-04	,211	-5,4047E-04	2,372E-03
		1200 mg/L	-2,3869E-04	7,396E-04	,749	-1,7347E-03	1,257E-03
		600 mg/L em H2O	-1,0237E-03	8,312E-04	,225	-2,7050E-03	6,576E-04
1200 mg/L	controle	600 mg/L em H2O	7,406E-04	7,588E-04	,335	-7,9424E-04	2,275E-03
		60 mg/L	1,154E-03	7,396E-04	,127	-3,4168E-04	2,650E-03
		600 mg/L	2,387E-04	7,396E-04	,749	-1,2573E-03	1,735E-03
		600 mg/L em H2O	-7,8502E-04	8,484E-04	,360	-2,5010E-03	9,310E-04
600 mg/L em H2O	controle	1200 mg/L	1,526E-03	8,484E-04	,080	-1,9038E-04	3,242E-03
		60 mg/L	1,939E-03*	8,312E-04	,025	2,580E-04	3,621E-03
		600 mg/L	1,024E-03	8,312E-04	,225	-6,5761E-04	2,705E-03
		1200 mg/L	7,850E-04	8,484E-04	,360	-9,3098E-04	2,501E-03

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Homogeneous Subsets

MEASURE_1

TRAT	N	Subset
		1
Student-Newman-Keuls ^{a,t} 60 mg/L	10	-1,66E-03
controle	9	-1,25E-03
600 mg/L	10	-7,45E-04
1200 mg/L	9	-5,06E-04
600 mg/L em H2O	6	2,789E-04
Sig.		,116

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

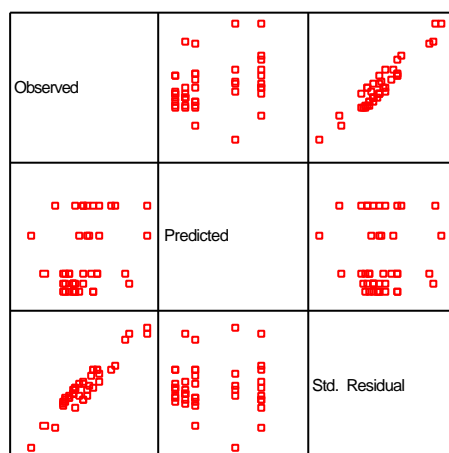
Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 2,591E-06.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,491.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
- Alpha = ,05.

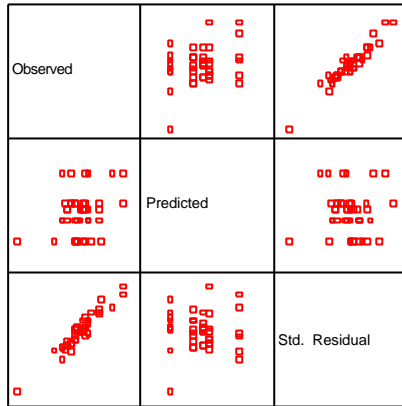
Observed * Predicted * Std. Residual Plots

Dependent Variable: PD0



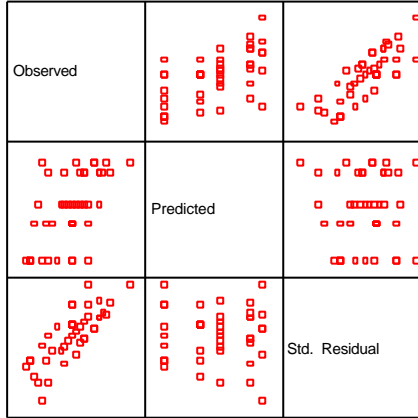
Model: Intercept + TRAT

Dependent Variable: PD5



Model: Intercept + TRAT

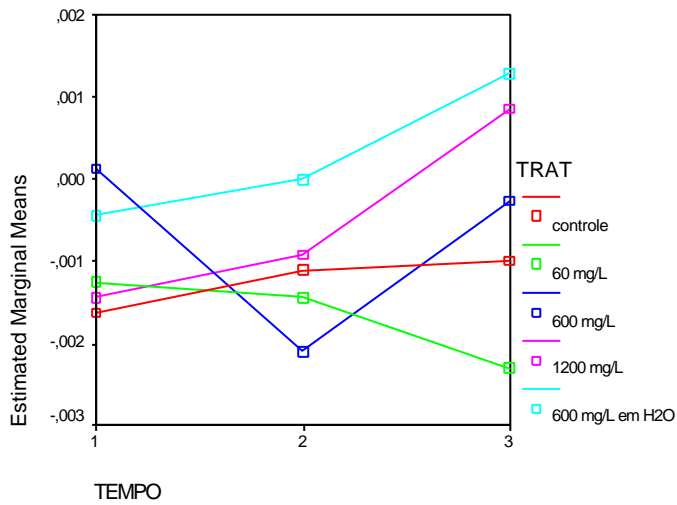
Dependent Variable: PD20



Model: Intercept + TRAT

Profile Plots

Estimated Marginal Means of MEASURE_1



***Luffa operculata* infusion affects mucociliary function of the isolated frog palate**

Mônica Aidar **Menon-Miyake**, MD ^a; Regiani Carvalho de **Oliveira**, BSc ^b; Geraldo **Lorenzi-Filho**, MD, PhD ^b; Paulo Hilário Nascimento **Saldiva**, MD, PhD ^b, Ossamu **Butugan**, MD, PhD ^a

^a Otorhinolaryngology Department

^b Laboratory of Experimental Air Pollution, Pathology Department
University of São Paulo, São Paulo, SP, BRAZIL

Key words: complementary therapies; *Luffa operculata*; medicine, herbal; mucociliary clearance; nasal mucosa; rhinitis; sinusitis; tight junctions.

Correspondence Address

Dra. Mônica Aidar Menon-Miyake
Otorhinolaryngology Department
University of São Paulo
Rua Afonso Brás, 525, cj 21
04511-011 - São Paulo - SP - BRAZIL
Phone - (55) (11) 3842-4288
Mobile phone - (55) (11) 9963-3572
FAX - (55) (11) 3842-0861
monica.menon@br2001.com.br

Abstract

Background: *Luffa operculata* is a medicinal plant found in many European remedies used for treatment of allergic rhinitis and rhinosinusitis. In Latin America, a homemade *Luffa operculata* dry fruit infusion (*LopDFI*) is popularly used into the nose, delivering profuse mucous secretion and relieving nasal symptoms. Nevertheless, this may cause nasal mucosa irritation, epistaxis or anosmia.

Methods: We evaluated the effects of *LopDFI* on mucociliary transport velocity (MTV); ciliary beat frequency (CBF) and transepithelial potential difference (PD) in isolated frog palate preparation. We tested 46 palates immediately before, 5 and 20 minutes after immersion. Four groups (n=10) were tested into frog Ringer (=control) *LopDFI* 60mg/L, 600mg/L and 1200mg/l, and also a group of *LopDFI* in water (600mg/L H₂O, n=6). Epithelial samples were harvested for ultrastructural study.

Results: In treated palates, MTV significantly decreased (p<0.001), CBF was affected (p<0.008) and PD was altered in a dose-dependent manner (p<0.007). PD findings pointed towards ion-fluid transport abnormalities, which were confirmed by transmission electron microscopy that showed enlargement of interepithelial spaces.

Conclusions: *LopDFI* promoted significant changes on mucociliary epithelium function of this *ex vivo* model, suggesting that is potentially noxious to human nasal mucosa.

Introduction

Nowadays, patients with all sorts of diseases search for cure in Complementary Medicine such as homeopathy, acupuncture or phytotherapy. Phytotherapy is the most ancient and spread among these practices. Mankind has been using medicinal plants for 60.000 years now (1). A recent survey demonstrated, for example, that about US\$17.8 billion were spent on herbs, botanical remedies and dietary supplements in the United States in 2001 (2).

Many patients do not tell their doctors they are using medicinal plants (7,8). On the other hand, many doctors do not know the real impact of this practice on health, nor the possible interaction among herbs and allopathic drugs (9,10, 11, 12, 13, 14). Patients with chronic respiratory diseases - as allergic rhinitis, rhinosinusitis, asthma - or repeated upper airways infections are prone to resort to phytotherapy so as to avoid treatments with antibiotics or corticosteroids (3, 4, 5, 6). That is the reason why more research is needed on the effects of medicinal plants on the respiratory system.

Alternative medicine can no longer be ignored by academia (15).

Luffa operculata (*Lop*) is a very popular medicinal plant used for the treatment of rhinitis and rhinosinusitis. Linnaeus firstly described the plant in XVIII century as *Momordica operculata*, and Cogniaux moved it to the *Luffa* gender in 1978. In Europe, especially in Germany, there are many homeopathic medicines with this plant. In Latin America its dry fruit, which is available from informal sellers, is commonly used for preparing an infusion that is either inhaled or instilled into the nose, instantly delivering profuse mucous secretion and thus alleviating nasal symptoms.

Nevertheless, the "natural" treatment with *Luffa operculata* dry fruit infusion (*LopDFI*) may cause severe nasal mucosa irritation, epistaxis or anosmia. Its chemical features include saponin, which breaks the superficial tension of the mucosa, and isocucurbitacin, which seems to be the most important active principle and is easily absorbed after saponin action (16). It has an irritating effect on every mucosae, so it is popularly used also as laxative and abortive. It shows high *in vitro* and *in vivo* toxicity: the LD₅₀, the lethal dosis for half of laboratory mice, is around 170 mg/kg, corresponding to 1g of *Lop* extract for a 70 kg adult human. (17, 18)

Considering the widespread usage and the lack of scientific data about the action of *Lop* on the nasal mucosa, we carried out a study to evaluate the effects of *Lop*DFI on the epithelium and mucociliary activity. We used the *ex vivo* model of the isolated frog palate, which is very useful and convenient, and whose pseudostratified columnar ciliated epithelium is virtually identical to human respiratory mucosa. In this model mucus secretion and ciliary beating are maintained until 14 days after animal death (19, 20, 21).

Material and Methods - The experiment was carried out with 46 palates, subdivided in five groups, as follows in Table 1.

GROUP	n	INFUSION	CONCENTRATION	SOLVENT
1	10	Control	frog Ringer	frog Ringer
2	10	Diluted	60mg/L = 0.3g/500mL	frog Ringer
3	10	Basic	600mg/L = 0.3g/500mL	frog Ringer
4	10	Concentrated	1200mg/L = 0.3g/250mL	frog Ringer
5	6	Watery	600mg/L H ₂ O = 0.3g/500mL H ₂ O	mineral water

We weighted ten dry fruits that ranged from 1.0 to 1.5g. The average was 1.2g, which we considered the standard fruit weight. Therefore, 1/4 of the fruit is 0.3g, diluted in 500mL of frog Ringer (group 3) and in water (group 5), which is the empirical recommended solution by hawkers (herbal medicine

sellers). Group 2 was supposed to be similar to diluted medications and group 4, to repeat a double dosis medication. We used parts of the peel, the inner fiber and seeds to prepare the infusion.

Three measures were performed for each palate: immediately before, 5 minutes after and 20 minutes after immersion into the infusion, simulating the effects of direct instillation of medications into the nose.

We studied the mucociliary function with three different parameters: the mucociliary transport velocity (MTV)(19, 20, 21), the ciliary beat frequency (CBF)(19, 20, 21) and the transepithelial potential difference (PD)(20, 22), plus the qualitative histological aspects of epithelial samples in the tested palates. In addition, histological samples were drawn for ultrastructural study.

MTV was measured in millimeters per second (mm/s) and assessed by measuring the displacement of an autologous mucus sample through the frog palate with a charcoal particle placed on it, under a microscope (ZEISS). CBF was determined by observing ciliary movement of the epithelium under stroboscopic flashlight in a light microscope (Olympus BX 50), and measured in Hertz (Hz) in a computerized system, in which the images were captured and recorded. TPD was measured in volts (V) and assessed by positioning agar

bridges microelectrodes in the epithelium and the lamina propria of the palate (PROCYON voltmeter). Two samples of each group were collected to study histological features of the epithelium under electron transmission microscopy.

Statistical analysis was performed using generalized linear models for repeated measures with the aid of the program SPSS version 10 for Windows, adopting the level of significance of 5% ($p < 0,05$).

Results - After 5 and 20 minutes, *Luffa operculata* dry fruit infusion (LopDFI) at 600mg/L and 1200 mg/L in frog Ringer, plus 600mg/L in water significantly decreased MTV ($p < 0.001$) (Figure 1).

CBF suffered interaction time/treatment ($p < 0.008$), that is, the time effect was not similar to all of the treatments. LopDFI inhibited the increase of CBF observed in the control group, which was tested in isotonic solution (Figure 2).

PD alterations were observed at the higher concentrations (600 mg/l and 1200 mg/l) and in watery infusion, after 20 minutes of immersion ($p < 0.007$). This points to augmented permeability of the frog palate mucosal epithelium, due to epithelial damage, thus results in lower resistance to fluid transport (Figure 3).

This finding was confirmed by the electron transmission microscopy, in which we found intercellular spaces frequently widened in the epithelium of the treated frog palates, related to tight junctions disruption due to epithelial damage. (Figure 1)

Discussion - Regarding the widespread usage of *LoDFI* and the frequent informal referrals of its side effects, it is alarming the lack of studies about it. The observed profuse mucous releasing is a sign of its activity on mucociliary function, and therefore was the central aim of this study. We observed consistent alterations in the three tested parameters of mucociliary activity: 1- MTV, that indicates the integrity of the mucus, cilia and their interaction; 2 - CBF, that evaluates the motor of the system, and 3 - PD, which reflects the integrity of ions and fluids transport. These alterations were dose-dependent and further corroborated by the ultrastructural findings of the tested palates.

Epithelium electrical gradient tends to negative. The observed positivation of voltage in PD (figure 3) is due to epithelial damage and results in disruption of tight junctions, protein structures that serve as a barrier between the lumen and the interstitium. Tight junctions encircle the

lateral portion of each cell just beneath the apical surface. They are recognized functionally by inhibiting the movement of solute (ion) and water across the epithelium (23), even though recent studies attribute them other possible functions (24). Therefore, the findings of enlargement of intercellular spaces, as in figure 4, are caused by epithelial leakage and can be attributed to changes in ions and fluid transport, because of tight junctions damage.

The ciliary beat has two components: the effective and the recovery stroke (25). If there is an inadequate quantity or quality of mucus, mucociliary transport decreases or even ceases. Macroscopically, we observed increased mucus production after the immersion of treated palates into *LopDFI*. We suppose the enhance of periciliary fluid due to epithelial leakage, which was observed in this experiment, leaded to decreased MTV (figure 1) because of an uncoupling between the top of the cilia and the gel upper layer of the mucus.

We found important features related to the direct irritating effects of *LopDFI* on the mucosa. Although the most important described active principium are cucurbitacins, the observed irritant reactions may be due to saponin, which acts on the superficial tension of the epithelial mucosa (18). Even though, this *ex vivo* model did not allow us to assess

the effects of cholinergic system nor the inflammatory process.

We could not infer the toxicity or the therapeutical effects of the European medicines with *Luffa operculata*, because most of them are homeopathic dilutions (26,27,28,29). Nevertheless, we remind that *Luffa operculata* is not even included in Commission E German monographs, the official therapeutic guide to herbal medicines which describes the indications and risks of the available medicinal plants in that Country (30).

In this study, *LopDFI* was prepared in different concentrations with frog Ringer, the isotonic solution for the frog. One group was studied with watery infusion, exactly as the homemade infusion, and its behavior was as noxious as the observed in the more concentrated infusion group. We observed significant changes induced by *LopDFI* in a virtually normal respiratory epithelium model. Considering *LopDFI* is intended to be used in pathological epithelium damaged by the illness condition itself (31), further by the ethiologic agents toxins (32) or medication compounds as vasoconstrictors and topical conservatives (33), we may conclude that the homemade preparation may cause adverse reactions by aggravating the pre-existing disease in the nasal mucosa.

This study explains the profuse mucus release observed for decades with this *LopDFI* "natural treatment" for rhinitis and rhinosinusitis. *Luffa operculata* need further studies in order to be better elucidated, and physicians should be aware of the possible negative effects of *LopDFI* to the mucociliary function, in order to orientate their patients.

References

1. Alonso JR. [Fitomedicine: clinical basis and pharmacology.] Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires, Isis Ediciones SRL, 1998.
2. Marcus DM, Grollman AP. Botanical medicines - the need for new regulations. *N Engl J Med* 2002;**347** (25):2073-2076.
3. Hughes EF. Overview of complementary, alternative and integrative medicine. *Clin Obstetrics Gynecol* 2001;**44**(4): 774-779.
4. Blanc PD, Trupin L, Earnest G, Katz P, Yelin EH, Eisner M. Alternative therapies among adults with a reported diagnosis of asthma or rhinosinusitis: data from a population-based survey. *Chest* 2001;**120**:1461-1467.
5. Angell M, Kassirer JP. Alternative medicine - the risks of untested and unregulated remedies. *N Engl J Med* 1998;**339**(12):839-841.
6. O'hara MA, Kiefer D, Farrel K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Fam Med* 1998;**7**:523-536.
7. Senna G, Passalacqua G, Crivellaro M, Bonadonna P, Gani F, Dorizzi R, Dama A, Canonica GW, Lombardi C. Unconventional medicine: a risk of undertreatment of allergic patients. **Allergy** 1999;**54**:1117-1118.
8. Senna G, Passalacqua G, Bonadonna P, Agostinis F, Lombardi C, Cocco G, Zanon P, Canonica GW. Is alternative medicine acceptable in allergology? **Allergy** 2000;**55**:1200.

9. Tsen LC, Segal S, Pothier M, Bader AM. Alternative medicine use in presurgical patients. *Anesthesiology* 2000;**93**(1): 148-151.
10. De Smet PAGM. Herbal remedies. *N Engl J Med* 2002;**347**(25):2046-2056.
11. Krouse JH, Krouse HJ. Patient use of traditional and complementary therapies in treating rhinosinusitis before consulting an otolaryngologist. *Laryngoscope* 1999;**109**:1223-1227.
12. Raghavan U, Jones NS. Complementary and alternative therapy for nasal conditions. *J Laryngol Otol* 2000;**114**:919-924.
13. Frieri M. Herbal therapies: what allergist-immunologists should know regarding patient use of complementary and alternative medicine. *Allergy Asthma Proc* 2001;**22**: 209-215.
14. Asher BF, Seidman, M, Snyderman C. Complementary and alternative medicine in otolaryngology. *Laryngoscope* 2001;**111**:1383-1389.
15. Niggemann B, Grüber C. Side-effects of complementary and alternative medicine. **Allergy** 2003;**58**:707-716.
16. Matos FJA. [Farmacognosy of *Luffa operculata* cogn.] Farmacognosia de *Luffa operculata* cogn. *Rev Bras Farm* 1979;**60**(7/9): 69-76.
17. Lorenzi H, Matos FJA. [Medicinal plants of Brazil]. *Plantas medicinais do Brasil*. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002.
18. Champney R, Ferguson NM, Ferguson GG. Selected pharmacological studies of *Luffa operculata*. *J Pharm Sci* 1974;**63**(6):942-943.
19. Puchelle E, Zahm JM, Sadoul P. Mucociliary frequency of frog palate epithelium. *Am J Physiol* 1982;**242**(11): C31-C35.
20. Macchione M, Guimarães ET, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Methods for studying respiratory mucus and mucus clearance. *Braz J Med Biol Res* 1995;**28**:1347-1355.
21. Macchione M, Lorenzi-Filho G, Guimarães ET, Junqueira VBC, Saldiva PHN. The use of the frog palate preparation to assess the effects of oxidants on ciliated epithelium. *Free Radic Biol Med* 1998;**24**(5):714-721.
22. Knauf H, Haag R, Lubcke R, Berger E, Gerok W. Determination of short-circuit current in the in vivo perfused rat colon. *Am J Physiol* 1984;**246**:151-158.
23. Basbaum C, Welsh MJ. Mucous secretion and ion transport in airways. In: Murray JF, Nadel JA. editors

Textbook of respiratory medicine. Philadelphia: WB Saunders, 1994;**1**: 323-344.

24. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. Prog Biophys Mol Biol 2003;**81**:1-44.
25. Quraishi MS, Jones NS, Mason J. The rheology of nasal mucus: a review. Clin Otolaryngol 1998;**23**(5): 403-413.
26. Wiesenauer M, Gaus W, Bohnacker U, Häussler S. [Efficiency of homeopathic drug combinations for the treatment of sinusitis / results of a randomized double-blind study with general practitioners]. Wirksamkeitsprüfung von homöopathischen Kombinationspräparaten bei Sinusitis. Ergebnisse einer randomisierten Doppelblindstudie unter Praxisbedingungen. Arzneim-Forsch / Drug Res 1989;**39**(5): 620-625.
27. Weiser M, Gegenheimer LH, Klein P. A randomized equivalence trial comparing the efficacy and safety of Luffa comp.- Heel nasal spray with cromolyn sodium spray in the treatment of seasonal allergic rhinitis. Försch Komplementärmed 1999;**6**(3):142-148.
28. Adler M. Efficacy and safety of a fixed-combination homeopathic therapy for sinusitis. Adv Ther 1999;**16**(2):103-111.
29. Glatthaar-Saalmüller B, Fallier-Becker P. Antiviral action of Euforbium compositum and its components. Försch Komplementärmed Klass Naturheilkd 2001;**8**(4):207-212.
30. American Botanical Council. The complete German commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines. (CD-ROOM) Austin, IntegrativMedicine, 1999.
31. Jeffery PK, Li D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. Eur Respir J 1997;**10**:1655-1662.
32. Yun YS, Min YG, Rhee CS, Jung IH, Koh YY, Jang TY, Jung DH. Effects of toxin of *Staphylococcus aureus* on the ciliary activity and ultrastructure of human nasal ciliated epithelial cells. Laryngoscope 1999;**109**:2021-2024.
33. Merkus P, Romeijn SG, Verhoef JC, Merkus FWHM, Schouwenburg PF. Classification of cilio-inhibiting effects of nasal drugs. Laryngoscope 2001;**111**:595-602.

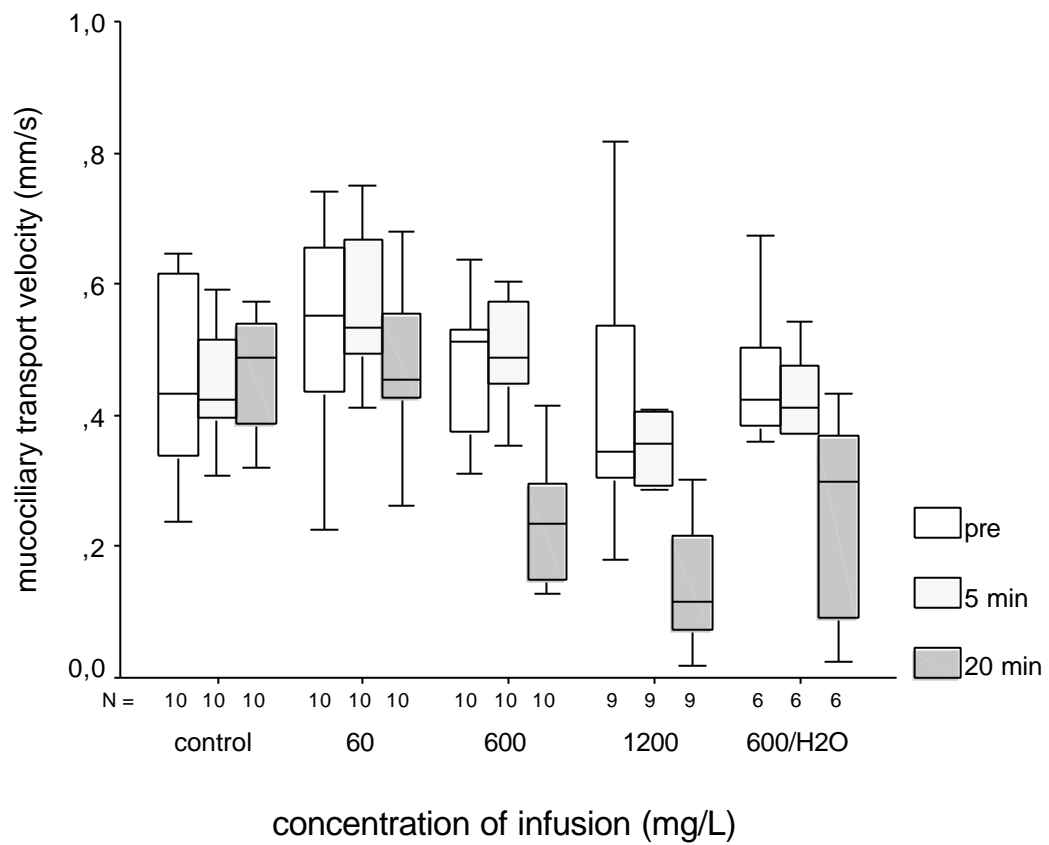


Figure 1 - Measures of mucociliary transport velocity (MTV)

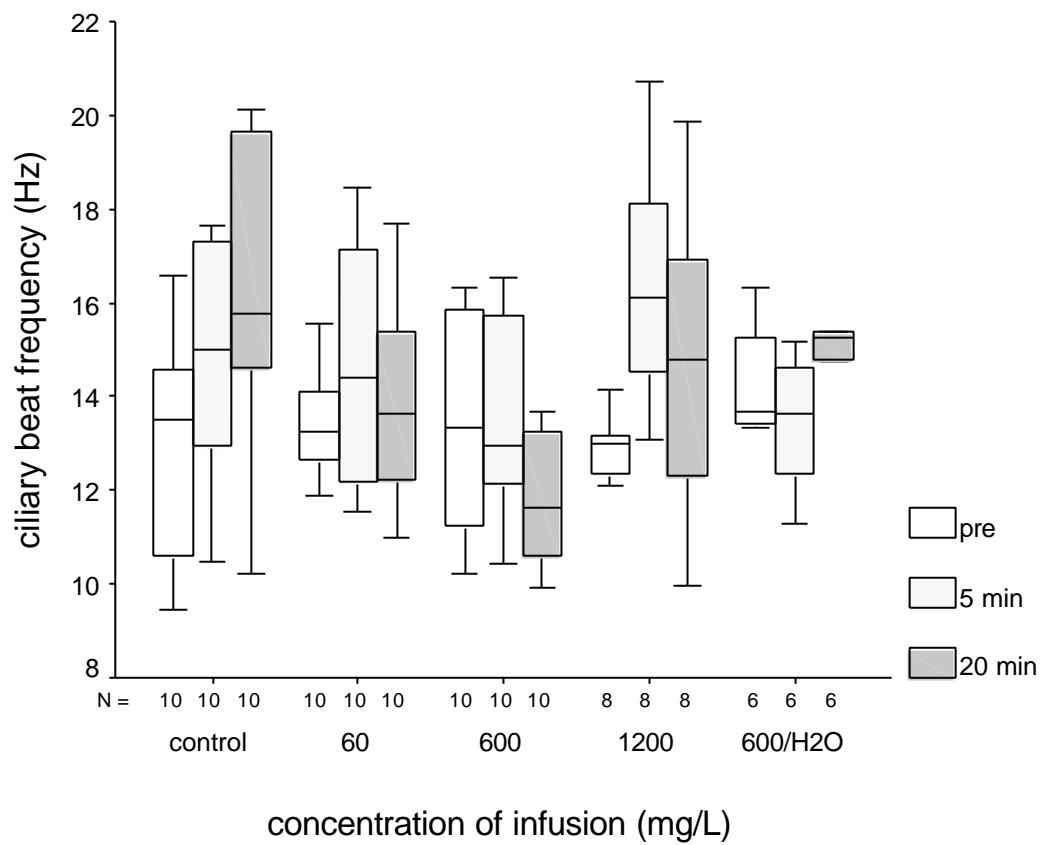


Figure 2 - Measures of ciliary beat frequency (CBF)

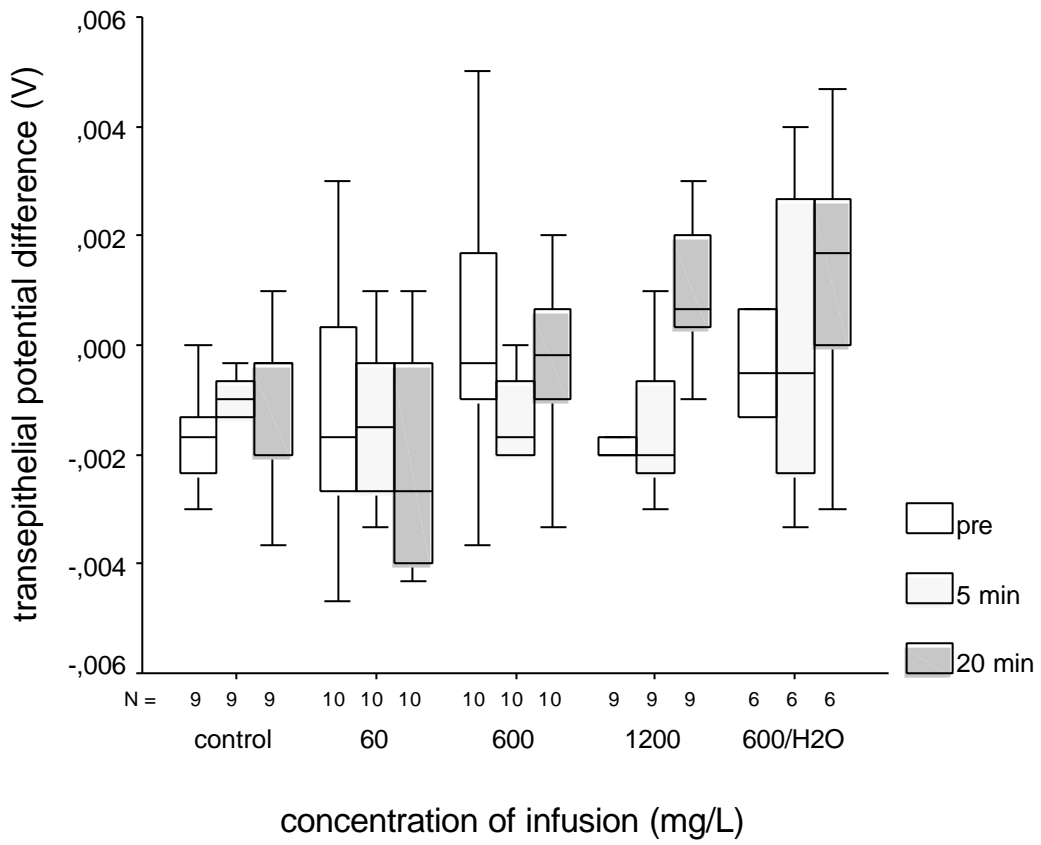


Figure 3 - Measures of transepithelial potential difference (PD)

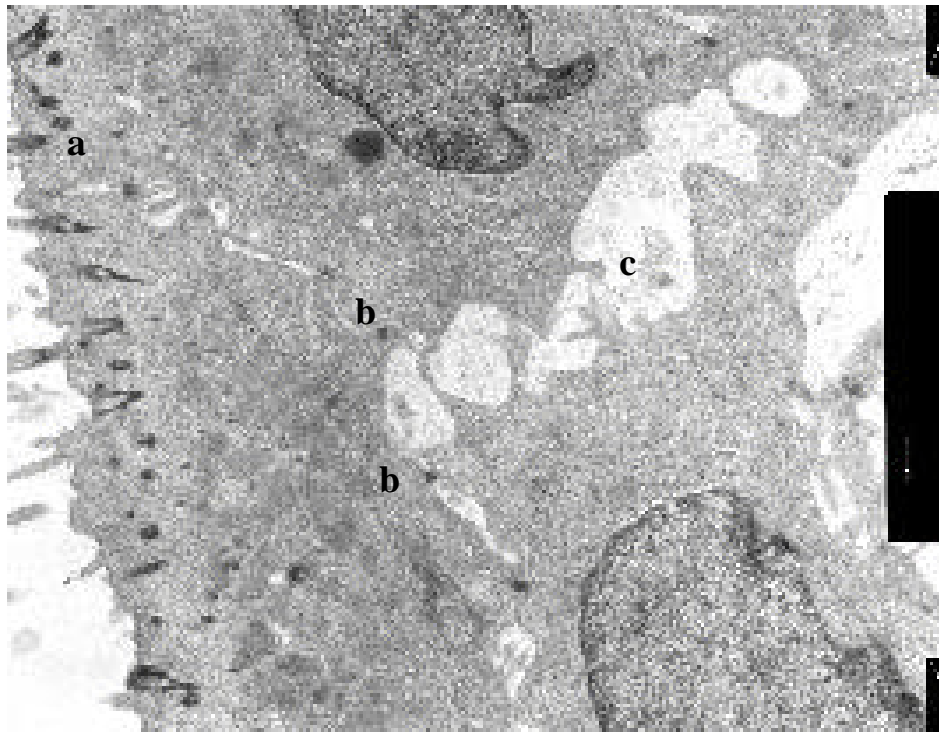


Figure 4 - Frog palate epithelium (group 5) showing tight junction (a), desmosomes (b) and widened intercellular spaces (c). (Electron transmission microscopy, 40.000 X)

<http://www.blackwellpublishing.com/submit.asp?ref=0105-4538>

Allergy

European Journal of Allergy and Clinical Immunology

Published with the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)

Edited by:

J. Bousquet, Montpellier, France

Print ISSN: 0105-4538

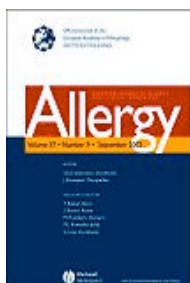
Online ISSN: 1398-9995

Issues per Volume: Monthly

Current Volume: 59

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2002: 3/15 (Allergy); 24/119 (Immunol)

Impact Factor: 3.666



Author Guidelines

Original articles are limited to **6 printed pages**. Authors must pay GBP 80 for each added page. Every article must be submitted as a file (not in ASCII format) on a newly formatted, 3.5-inch floppy disk, together with 4 manuscript (MS) copies (A-4 size, double-spaced, with wide margins and printed on 1 side only) and 4 originals of all tables and figures. The MS and the file on the disk must be identical, and the disk should contain no other files. The disk label must list title of the journal, name(s) of the author(s) (not exceeding 8 authors), title of the article, and computer operating system and word processor used. To guard against loss, authors should retain copies of all materials submitted.

Editorial Office
J. Bousquet, Montpellier, France
Allergy Editorial Office
Service des Maladies Respiratoires
Hôpital Arnaud de Villeneuve
371, avenue Doyen Gaston Giraud
34295 Montpellier Cedex 5
France
Fax: +33 467 042 708
e-mail: bousquet@montp.inserm.fr

Articles must be written in correct **scientific English** suitable for publication. Although articles are subject to review and editing, the journal does not hold itself responsible for all statements made by contributors. **The first page** should contain only the title of the article, the authors' names and institutions, and the full postal address of the author to whom communications and proofs are to be sent, and from whom offprints are to be requested. If **the title is longer than about 40 letters** and spaces, authors must supply a short title for a running head. Titles must be concise and precise, as the indexing and abstracting services depend on their accuracy. Acknowledgements should be given on a separate page and any major sponsorship should be mentioned.

Authors submitting a paper do so on the understanding **that the work has not been published before**, is not being considered for publication elsewhere, and has been read and approved by all authors. The submission of the manuscript by the authors means that they automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Munksgaard if and when the manuscript is accepted for publication. On acceptance, the corresponding author will receive a Copyright Assignment Form from the Editorial Office, which is to be signed on behalf of all co-authors and returned. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic databases or retrieval systems without the written permission of the publisher.

[Copyright Assignment Form](#)

Abstract - The abstract, the author's summary that appears at the beginning of the article, is to be structured under the headings Background, Methods, Results, and Conclusions. The opening sentence should indicate the subject of the investigation. The abstract should emphasise any new information that the article contains, and indicate its relevance. It should give the generic names of new compounds. For experimental results, the abstract should indicate the method used; for new methods, the basic principle should be given. The abstract should be intelligible in itself without reference to the article and should not exceed **200 words**.

Introduction - This should briefly outline the problem with particular emphasis on the present state of knowledge, followed by a short statement on the aim of the investigation.

Material and methods - This section should contain a brief description of the equipment and material employed and an explanation of how the work was done. Sufficient details should be given to enable a competent worker in the field to repeat the experiments. Detailed descriptions of **standard laboratory procedures are not required**; literature references will usually suffice.

Results - This section **briefly describes the results obtained**. As far as possible, data should be presented in tables or graphs; double documentation in text, tables, or figures should be avoided.

Discussion -The author should discuss, and not just recapitulate, the results, emphasizing unsettled and controversial points, and reaching some conclusion.

References - The style of citations and references must conform to that of the "[Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals](#)" as stated by the International Committee of Medical Journal Editors (BMJ 1991;**302**:338-341). References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. References are to be indicated in text, tables, and legends by Arabic numerals in parentheses. All references cited, and only these, are to appear consecutively in the list at the end of the paper. List all authors when 6 or fewer; when 7 or more, list the first 6 and add et al. Authors should consult a recent issue of *Allergy* and note the following examples:

Journals. Swanson MC, Campbell AR, Klauck MJ, Reed CE. Correlation between levels of mite and cat allergens in settled and airborne dust. *J Allergy Clin Immunol* 1989;**83**:776-783.

Books. Czametzky BN. *Urticaria*. Berlin: Springer, 1986.

Chapter in book. Clissold SP. Rhinitis. In: Barnes PJ, Mygind N, editors. *Budesonide: clinical experience in asthma and rhinitis*. Manchester: ADIS Press, 1988;51-64.

Illustrations - Submit 4 originals of each illustration. Each graph, drawing, or photograph must be numbered in sequence with Arabic numerals. The approximate location in the text should be indicated by a marginal note. Legends to illustrations should be listed on a separate page, identified by the name of the journal, the authors' names, and the figure number. Lettering should be stenciled in black India ink, large enough for the necessary reduction. Line drawings should be drawn with black India ink on white transparent, or blue graph paper. For line drawings to be reasonably consistent within the journal, they should be at least double their intended finished size and, as such, their width should be one of the following standard sizes: 125 mm for single-column width, or 260 mm for - double-column width. Lettering on the figures should be 3.8-4 mm high. Helvetica Light, 14°, obtainable as transfer letters, is recommended. Graphs may be plotted on plain white or blue squared paper; grid lines that are to show in the engraving should be in black ink. Photographs must be submitted as unmounted glossy enlargements showing good detail and contrast, and indicating "up" and "down". Mark each photograph with figure number, authors' names, and, if desirable, the magnification of the print. Never use paper clips on a glossy print or write so firmly on the back that the face is damaged. Send photographs flat and protect them with stout cardboard backing. Color illustrations will be accepted if considered necessary by the editor but must be paid for by the author, with some exceptions at the editor's discretion. Current rates will be quoted by the publisher. Original color transparencies as well as two sets of color prints should be submitted. Electronic files should be submitted as 300 dpi TIFF or EPS files.

Tables - The layout must allow the tables to be read in the same direction as the text. They should be numbered consecutively with Arabic numerals, each typed on a separate page, due regard being paid to the proportion of the printed pages, and provided with self-explanatory legends.

Proofs - Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the [Adobe Web site](#). This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available.

Key words - From 4 to 9 key words for indexing should be supplied together with the abstract. They should be placed in alphabetical order and adjusted to the Medical Subject Headings of

Index Medicus.

Abbreviations and symbols - Only abbreviations and symbols that are generally accepted should be used. Unfamiliar ones must be defined when first used.

Case reports; short communications - This material should not exceed 4 printed pages in length including references and no more than 3 tables or figures.

Letters to the editor - Letters, which do not undergo editorial revision except for language correction, are normally accepted as stimulating comment on current issues, especially relating to material recently published in the journal. They should not exceed 300 words.

AllergyNet- This section features brief papers, including letters to the editor, clinical and scientific observations, hypotheses, failure to reproduce published data, etc. Contributions should not exceed 600 words including references. With a figure or a table included, it should not exceed 400 words. Authors must supply a summary statement of no more than 15 words and key words as for an original article. A major criterion for the acceptance of this material is that it deal with questions or problems of general interest. Contributions to this section will not undergo peer review but will be reviewed by the associate editors. They may undergo minor editorial revision, such as necessary correction of language, and authors will not normally read the proofs. Emphasis will be on rapid publication of new material. AllergyNet is not indexed in MEDLINE.

Offprints - Offprints without covers can be ordered on the form accompanying the proofs.

Supplements- These are papers exceeding 20 printed pages whose publication is paid for entirely by the author. Although supplements must be accepted by the editorial office, the journal does not hold itself responsible for all statements made by contributors. After acceptance, supplements do not undergo editorial revision, but should be as similar as possible in style (especially citation style) and format to original articles. It is Blackwell Munksgaard's policy to acknowledge in supplements any major sponsorship.

Observações:

1 printed page = 750 palavras em fonte Courier, espaço duplo
= aproximadamente 3 páginas em A4.

25 referências - meia página.

1 gráfico ou figura = um quarto de página.