



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCO ANTONIO BOTELHO

**ESTUDO DO EFEITO DO GEL DE ALECRIM PIMENTA (*Lippia
sidoides*) ROEIRA (*Myracrodruon urundeuva*) E SEUS PRINCÍPIOS
ATIVOS ISOLADOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

FORTALEZA

2007

MARCO ANTONIO BOTELHO

**ESTUDO DO EFEITO DO GEL DE
ALECRIM PIMENTA (*Lippia sidoides*) E AROEIRA (*Myracrodruon urundeuva*)
E SEUS PRINCÍPIOS ATIVOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

FORTALEZA

2007

MARCO ANTONIO BOTELHO

ESTUDO DO EFEITO DO GEL DE ALECRIM PIMENTA (*Lippia sidoides*) e aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) E SEUS PRINCÍPIOS ATIVOS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas

Defesa em 29 / 08 / 2007

Conceito: _____

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Mariana Lima Vale
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Monica Studart Mendes Moreira
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará
Universidade de São Paulo-USP

Prof. Dr. Carlile Campos Lavor
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Aos meus pais, por tudo.

A minha Tia Lilian, pelo apoio na minha vida estudantil.

Aos amigos, pela compreensão.

Aos Nordestinos gênios naquilo que fazem quase nunca lembrados:

Aos Brasileiros Patativa do Assaré, Belchior, Ariano Suassuna a minha homenagem.

AGRADECIMENTOS

À Professora Gerly Anne de Castro Brito, por ter me orientado com toda a paciência, dedicação e amizade na realização deste trabalho.

À Professora Mariana Lima Vale, pelo empenho na minha co-orientação.

Ao Professor Ronaldo Albuquerque Ribeiro, por ter me proporcionado a oportunidade de continuar na pesquisa, pela generosa acolhida em seu laboratório.

Ao Professor Vietla S. Rao por ter me ensinado a ser paciente e como escrever artigos, me mostrando como um pai a beleza em ser pesquisador.

Aos Professores Jörg Heukelbach, José Gomes, Luciano Correia do Departamento de Saúde Comunitária por toda sua ajuda e cooperação.

Ao Secretário de Saúde Dr. Odorico Monteiro pela sua ajuda, colaboração e disposição de meios para os futuros ensaios clínicos.

Às Professoras Cibele Carvalho e Nadia Accioly Nogueira, pela colaboração na pesquisa (Microbiologia).

À amiga Profa. Hellíada Vasconcelos, pela sua contribuição na minha tese.

Ao Professor Said G. C Fonseca, pela sua ajuda na confecção dos géis.

Ao Professor Fernando Cunha, da Faculdade de Ribeirão Preto – USP, pela gentileza na realização da dosagem de citocinas.

Aos colegas, Luana Pinheiro, Tadeu Rodrigues, Márcia Rayane (LAFICA) e Danusa Montenegro pela inestimável colaboração na execução da tese.

À Maria Silvandira, pela sua atenção e ajuda no laboratório (LAFICA).

Ao José Ivan, pela sua competência na confecção das lâminas histológicas.

Aos funcionários do Departamento de Patologia José Olavo, Clínica médica (Ivone), Saúde Comunitária (Zenaide e Dominique Fontes), Química Orgânica e Inorgânica, Farmacologia e Fisiologia sempre dispostos a ajudar.

A FUNCAP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A periodontite se configura como um grave problema de saúde pública no mundo, sendo um importante fator de risco para doenças cardiovasculares contribuindo de sobremaneira na perda de dentes em adultos. Bactérias periodontopatogênicas e fatores do hospedeiro são necessários para o desenvolvimento e progressão desta patologia. Os produtos naturais podem constituir uma nova alternativa de tratamento, sendo descrito a eficácia de colutórios a base de óleo essencial pelo nosso grupo. O objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos envolvidos no efeito de géis a base de produtos naturais e seus derivados na doença periodontal experimental (DPE): gel elaborado a partir do óleo essencial de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* 0,5%) (GAI), associado (GAA) ou não ao gel do extrato da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* 5%); (GAR), gel elaborado a partir de carvacrol 300µg/g (GCa), associado (GCC) ou não ao gel de Chalconas Diméricas 600µg/g (GCh); comparando seus efeitos com a doxiciclina, controle positivo (GDX). A DPE foi induzida passando-se fio de náilon 3.0 em torno do segundo molar superior esquerdo de ratos *Wistar* machos, permanecendo durante 11 dias. Os géis foram aplicados topicamente na região gengival imediatamente após a indução da doença e três vezes ao dia durante 11 dias. Os parâmetros avaliados foram: índice de perda óssea (IPO), análise microbiológica, histopatológica, dosagem de citocinas (TNF- α ; IL-1 β), mieloperoxidase (MPO) por ELISA e variação da massa corpórea. Tanto o GAA e o GCC reduziram o IPO comparavelmente à doxiciclina. Na análise histopatológica, o periodonto dos animais tratados com GAA e GCC mostrou a preservação do osso alveolar, cemento e das fibras colágeno, além de mostrar a redução do infiltrado inflamatório gengival. A inibição da infiltração neutrofílica foi confirmada através da MPO. A dosagem de citocinas mostrou que o GAA reduziu os níveis de TNF- α e IL-1 β no tecido gengival no 11º dia. Todos os géis inibiram o crescimento de bactérias características da periodontite e promoveram um aumento na massa corpórea em relação ao grupo veículo. Esses resultados mostram que os géis testados possuem importante atividade na DPE, sugerindo a relevância de testes clínicos destes fitofármacos no tratamento da doença periodontal.

Palavras-chave: Óleo essencial. Alecrim pimenta. *Lippia sidoides*. Gel dental. Aroeira *Myracrodruon urundeuva*.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease in which alveolar bone resorption and cementum associated with collagen fibers destruction are important events. It configures as a serious problem of public health in the world, being an important risk factor for cardiovascular diseases and to teeth loss in adults. Bacteria and host factors are necessary to the development of this pathology. The natural products can constitute a new alternative of treatment, being described to be effective as a natural mouthrinse by our research group. The objective of the present study was to investigate the mechanisms involved on the effect of gels based on natural products and its derivatives in the experimental periodontal disease (EPD): gel elaborated from the essential oil of Alecrim pimenta 0.5% (GAl) (*Lippia sidoides*), associated (GAA) or not to the gel of the extract of the Aroeira 5% (GAr) (*Myracrodruon urundeuva*); gel elaborated from carvacrol 300 μ g/g (GCa), associate (GCC) or not to the gel of Dimeric Chalcones 600 μ g/g (GCh); comparing its effects with the doxycycline, used as positive control (GDX). Periodontitis was induced by a nylon thread ligature surgically placed around the cervix of the second left maxillary molars of male *Wistar* rats. Animals were treated with locally applied gels in the gingival region immediately after the EPD induction three times a day during 11 days. The parameters analysed were alveolar bone loss, histopathologic and microbiological analysis, myeloperoxidase (MPO); levels of TNF- α and IL-1 β (by ELISA) and body mass variation. GAA and GCC reduced the alveolar bone loss similar to GDX. Histopatologically, the periodontium of animals treated with GAA and GCC showed preservation of alveolar bone, cementum and collagen fibers of periodontal ligament and reduced neutrophilic and mononuclear cell infiltrate. The effect on neutrophilic infiltrate was confirmed by MPO. There was a significant reduction of TNF- α and IL-1 β levels in the group treated with GAA compared to the vehicle group. All natural gels inhibited the growth of bacteria involved in periodontitis and were able to increased body mass compared to vehicle group. These results support clinical trials of these phytochemicals in the treatment of periodontal disease.

Key words: Essential oil. *Lippia sidoides*. Dental gel. *Myracrodruon urundeuva*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição Química do Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>	54
Tabela 2 -	Atividade antimicrobiana expressa pela medida da zona de inibição em milímetros do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> , timol e carvacrol pelo método de difusão em ágar (NCCLS, 1998).....	55
Tabela 3 -	Atividade antimicrobiana expressa como Concentração Inibitória Mínima (MIC) (mg/mL) e Concentração Bactericida Mínima do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> , timol e carvacrol contra bactérias cariogênicas (NCCLS, 2000).....	56
Tabela 4 -	Atividade Antimicrobiana expressa como Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) e Concentração Bactericida Mínima (mg/mL) do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> , timol e carvacrol contra <i>C.albicans</i> (NCCLS, 2000).....	57
Tabela 5 -	Análise histopatológica do efeito do gel de Alecrim (GAl), gel de Aroeira (GAr) ou de sua associação (GAA) na DPE.....	61
Tabela 6 -	Efeito do gel de Carvacrol + Chalconas (GCC) sobre as alterações histopatológicas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratos.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático do dente humano e fotomicrografia do periodonto de dente de rato. G: gengiva; LP: ligamento periodontal; Ce: cemento radicular; Oa: osso alveolar propriamente dito; Pa: processo alveolar.....	15
Figura 2 -	Desenho Esquemático e aspecto clínico mostrando o processo de mobilidade dental pela perda óssea e conseqüente perda dentária.....	17
Figura 3 -	Os sinais clínicos e patológicos das doenças periodontais definidos pela resposta do hospedeiro perante o desafio bacteriano (KORNMAN, 2001).....	18
Figura 4 -	Uma paciente com apenas 35 anos de idade com aparência estética prejudicada pela perda precoce de dentes e osso alveolar, devido à doença periodontal.....	22
Figura 5 -	Os sinais clínicos e patológicos das doenças periodontais.....	23
Figura 6 -	A árvore da Aroeira do Sertão.....	26
Figura 7 -	O Alecrim-pimenta.....	30
Figura 8 -	Estruturas químicas dos compostos isolados do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> : A) Timol e B) Carvacrol.....	32
Figura 9 -	Estruturas químicas das frações enriquecidas de chalconas (FEC) <i>urundevinas</i> A, B and C isoladas da entrecasca da aroeira do sertão (<i>M. urundeuva</i>) utilizadas para preparar o gel de chalconas.....	39
Figura 10 -	Placas e tubos mostrando a MIC e MBC.....	42
Figura 11 -	Géis Confeccionados no Laboratório de Farmacotécnica da UFC.....	43
Figura 12 -	Indução da Doença Periodontal Experimental (DPE).....	44
Figura 13 -	Metodologia da aplicação do gel três vezes ao dia durante um minuto.....	45
Figura 14 -	Desenho esquemático das medidas da reabsorção óssea: as diferenças (setas vermelhas, Δ) foram obtidas a partir das medidas feitas nas hemiarcadas com DPE (seta azul), subtraídas daquelas realizadas nas hemiarcadas contra laterais (seta verde, controle). A soma das sete variações correspondeu ao índice de perda óssea (IPO), expresso em mm.....	49
Figura 15 -	Placa de análise da atividade de Mieloperoxidase no tecido periodontal.....	51
Figura 16 -	Cromatograma dos elementos do óleo Essencial do Alecrim Pimenta.....	53
Figura 17a e 17b -	Placas petri apresentando os halos de inibição do carvacrol em relação aos <i>S.mutans</i> (A) e <i>C.albicans</i> (B).....	54

Figura 18 -	Efeito do gel de Alecrim (GAl) e/ou Aroeira (GAR) no índice de perda óssea alveolar na doença periodontal experimental (DPE) em ratos.....	58
Figura 19 -	Aspecto macroscópico de maxilas de ratos normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com gel veículo ou gel de alecrim + aroeira (GAA). Os animais foram submetidos à indução da DPE e receberam de forma tópica gel veículo (V) ou gel de alecrim (0,5%) + aroeira (5%) (GAA), imediatamente após a cirurgia da indução da DPE.....	59
Figura 20 -	Aspectos histopatológicos do efeito do gel de Alecrim + Aroeira (GAA) na (DPE).....	60
Figura 21 -	Detalhes de reabsorção óssea (A) e de reabsorção óssea na região da raiz dentária (B).....	61
Figura 22 -	Efeito do gel de Alecrim + Aroeira (GAA), gel de Alecrim (GAl) e gel de Aroeira (GAR) na produção de TNF - α e interleucina-1 β na gengiva de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE).....	62
Figura 23 -	O efeito do GAA, gel de Alecrim (GAl) e Aroeira (GAR) na atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival das maxilas de ratos submetidos à DPE.....	63
Figura 24 -	Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias em Ágar sangue.....	64
Figura 25 -	Efeito antibacteriano do gel de Alecrim (GAl), gel de Aroeira (GAR) e gel de Alecrim+Aroeira (GAA) nos microrganismos envolvidos na DPE em ratos.....	64
Figura 26 -	O efeito do GAA, gel de Alecrim (GAl) e Aroeira (GAR) na variação da massa corpórea de ratos submetidos à DPE.....	65
Figura 27 -	Efeito do gel de Carvacrol (GCa) e/ou Chalconas (GCh) no índice de perda óssea alveolar na (DPE) em ratos.....	67
Figura 28 -	Aspecto macroscópico de maxilas de ratos normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com gel veículo ou gel de carvacrol + chalconas (GCC).....	68
Figura 29 -	Aspectos histopatológicos do efeito do gel de carvacrol+chalconas (GCC) na (DPE).....	69
Figura 30 -	O efeito do GCC, gel de carvacrol (GCa) e chalconas (GCh) na atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival das maxilas de ratos submetidos à DPE.....	71
Figura 31 -	Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias em Ágar sangue.....	72
Figura 32 -	Efeito antibacteriano do gel de Carvacrol (GCa), gel de Chalconas (GCh) e gel de Carvacrol e Chalconas (GCC) nos microrganismos envolvidos na DPE em ratos.....	72
Figura 33 -	Efeito do gel de carvacrol+chalconas na variação da massa corpórea de ratos submetidos à doença experimental (DPE) induzida por fator retentivo de placa.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	As principais bactérias relacionadas com a periodontite (KORNMAN, 2001).....	16
------------	--	----

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1	O Periodonto	13
1.2	Doença Periodontal	14
1.3	Antimicrobianos na Terapia Periodontal.....	20
1.4	Aroeira do Sertão (<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All)	25
1.5	Alecrim-pimenta (<i>Lippia sidoides</i> Cham)	27
1.6	Doxiciclina.....	31
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.....	35
4.2	Plantas Medicinais	37
4.3	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana do alecrim pimenta (OELS) e seus princípios ativos	38
4.4	Preparação dos Géis	41
4.5	Animais.....	42
4.6	Protocolo Experimental.....	43
4.6.1	Modelo de Doença Periodontal Experimental.....	43
4.6.2	Grupos Experimentais	44
4.6.3	Parâmetros avaliados.....	47
4.7	Análise estatística.....	51
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Teste do Contato Direto (Difusão em Ágar).....	52
5.2	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	53
5.3	Atividade Antimicrobiana (<i>in vitro</i>) MIC e MBC	55
5.4	Efeito do gel de Alecrim (GA1) , gel de Aroeira (GAR) ou a combinação de ambos (GAA) na DPE induzida em ratos.....	56
5.4.1	Efeito do gel (GAA) sobre o índice de perda óssea na DPE	56
5.4.2	Efeito do gel (GAA) sobre as alterações histopatológicas	58
5.4.3	Efeito do gel (GAA) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β na DPE.....	61
5.4.4	Efeito do gel (GAA) sobre a dosagem de mieloperoxidase	62

5.4.5 Efeito do gel (GAA) sobre a flora microbiana na DPE.....	63
5.4.6 Efeito do gel (GAA) sobre a variação da massa corpórea na DPE.....	65
5.5 Efeito do gel de Carvacrol (300µg/g), Chalconas (600 µg/g) e a combinação de ambos (GCC) na DPE induzida em ratos.	66
5.5.1 Efeito do gel (GCC) sobre o índice de perda óssea na DPE.....	66
5.5.2 Efeito do gel (GCC) sobre as alterações histopatológicas na DPE.....	68
5.5.3 Efeito do gel (GCC) sobre a dosagem de mieloperoxidase.....	71
5.5.4 Efeito do gel (GCC) sobre a flora microbiana na DPE.....	72
5.5.5 Efeito do gel (GCC) sobre a variação da massa corpórea na DPE.....	73
6 DISCUSSÃO.....	74
7 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE.....	96
ANEXO.....	96

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O Periodonto

O periodonto é uma estrutura dinâmica, composta por gengiva (**G**), ligamento periodontal (**Lp**), cemento radicular (**Ce**) e osso alveolar (**Oa**) (Figura 1). Este conjunto de elementos é de fundamental importância para a inserção do dente no tecido ósseo da maxila e mandíbula, mantendo a integridade da superfície da mucosa da cavidade oral. O periodonto (peri = em torno de, odonto = dente) se subdivide em periodonto de proteção (gengiva) e de inserção (ligamento periodontal, osso alveolar e cemento) estes são mutuamente dependentes, sendo responsáveis por manter a função e estética dental. (LINDHE, 1999).

A gengiva é o elemento do periodonto que se sobrepõe ao osso alveolar e envolve toda a porção cervical do dente. Constitui o único dos tecidos periodontais que é diretamente visível à inspeção sob condições normais. O tecido conjuntivo gengival é composto principalmente por densas redes de fibras colágenas que funcionam de forma interdependente, fornecendo firmeza à gengiva e, também, promovendo a inserção desta ao cemento e ao osso alveolar subjacente (LINDHE, 1999).

O ligamento periodontal é constituído de tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, bastante vascularizado, contendo células, substância fundamental amorfa, nervos e ilhas epiteliais. As fibras do ligamento periodontal ligam o cemento radicular ao osso alveolar e situam-se no estreito espaço entre estes dois, promovendo, assim, a ancoragem do dente. O colágeno tipo I representa aproximadamente 80% dos componentes das fibras do ligamento periodontal. Além destas, existem também fibras elásticas, as quais estão incorporadas nas paredes dos vasos sanguíneos arteriais (LINDHE, 1999).

O cemento radicular consiste em um tecido calcificado especializado que recobre a raiz dos dentes, cuja função é prender as fibras do ligamento periodontal à superfície radicular. Cerca de 50% do cemento é constituído por material orgânico, tais como proteoglicanas, glicoproteínas e colágenos, sendo que este último a grande maioria. O cemento não contém vasos (sanguíneos e linfáticos) nem nervos, contudo, sofre deposição contínua ao longo da vida (LINDHE, 1999).

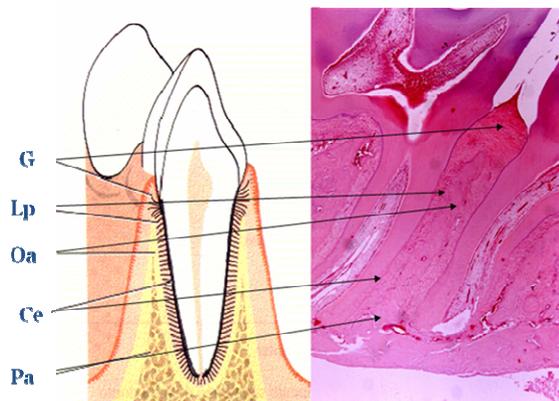


Figura 1 - Desenho esquemático do dente humano e fotomicrografia do periodonto de dente de rato. G: gengiva; LP: ligamento periodontal; Ce: cimento radicular; Oa: osso alveolar propriamente dito; Pa: processo alveolar.

O processo alveolar é um tecido mineralizado innervado e vascularizado, compreendendo a parte da maxila e da mandíbula que proporciona suporte para as raízes dos dentes. Esses processos são dependentes da presença dos dentes e estão sujeitos à reabsorção quando a unidade dental é perdida. (LINDHE, 1999).

1.2 Doença Periodontal

Reconhecida como um dos principais problemas de saúde pública no mundo as doenças periodontais configuram um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares (JAIN et al., 2003; DEMMER; DESVARIEUX, 2006). Segundo dados do Ministério da Saúde as doenças periodontais apresentam elevada incidência e prevalência na população brasileira com destaque especial no Nordeste do Brasil onde apenas 22% dos adultos e 8% dos idosos apresentam saúde periodontal (BRASIL, 2004). Apesar dos avanços da odontologia atual, a periodontite permanece uma importante causa de perda de dentes em adultos (PETERSEN, 2005).

A colonização bacteriana das superfícies dentais forma a placa dental, esta, representa uma película que interage com o meio bucal dando início a formação do biofilme. A deficiência da higiene oral leva a um aumento de microrganismos, ocorrendo mudanças locais, o que leva ao aparecimento de novas espécies. Além das bactérias, outros microrganismos podem compor o biofilme, tais como micoplasma, fungos, protozoários e vírus. (RODRIGUES; NEWMAN, 2002).

Pessoas periodontalmente saudáveis podem formar placa dental, composta de aproximadamente 75% de bactérias gram-positivas facultativas. A periodontite está associada a uma placa cuja composição é caracterizada por bactérias gram-negativas e anaeróbicas (TANNER; TAUBMAN, 1999; RODRIGUES; NEWMAN, 2002). As bactérias mais frequentemente encontradas em pacientes com periodontite são anaeróbios Gram negativos pigmentados (GNPA), *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces* sp. (MORENO et al., 1999). Trabalho do nosso grupo demonstrou que na periodontite experimental em ratos, induzida pelo mesmo modelo utilizado aqui, foram identificados em 100% dos animais o *Fusobacterium nucleatum* e bacilos Gram negativos pigmentados (MENEZES et al., 2005).

Quadro 1 - As principais bactérias relacionadas com a periodontite (KORNMAN, 2001).

Espécies predominantes associadas à periodontite	
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Bacteróides forsythus</i>	<i>Prevotella intermédia</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Selenomonas sputigena</i>
<i>Espécies Eubacterium</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>

Com o desenvolvimento da microbiota da placa, tanto o aumento a quantidade de bactérias já existentes como o aparecimento de novas espécies, levam a alterações inflamatórias começam manifestar-se clinicamente, caracterizando a gengivite. Quando o processo inflamatório progride em direção ao ligamento periodontal, ocorrendo perda do osso alveolar e migração apical das fibras do próprio ligamento periodontal com formação de bolsas periodontais, este processo é denominado periodontite (RODRIGUES; NEWMAN, 2002).

O objetivo principal do tratamento periodontal constitui na alteração da microbiota presente nos sítios comprometidos pela doença, uma vez que a presença destes pode resultar na destruição progressiva do periodonto (GARRETT et al., 1999). As bactérias são agentes essenciais para a ocorrência da periodontite, entretanto apenas sua presença não é suficiente. Sendo necessários fatores do hospedeiro para o desenvolvimento e progressão desta patologia (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

Vários métodos de tratamento periodontal têm sido estudados, a raspagem e alisamento radicular são mecanismos eficazes no combate à doença periodontal (KALDAHL et al., 1988). Entretanto, a preocupação com a eliminação de patógenos tem conduzido estudos a respeito do uso de antimicrobianos no tratamento da doença periodontal, uma vez que bactérias desenvolvem mecanismos que neutralizam a resposta imune do hospedeiro, dentre os quais podemos citar enzimas e toxinas. Sabe-se que a permanência de patógenos e seus subprodutos nos tecidos bucais do hospedeiro desencadearão resposta do hospedeiro, a qual tem o potencial de limitar, assim como agravar a doença periodontal (GOLUB et al., 1998).

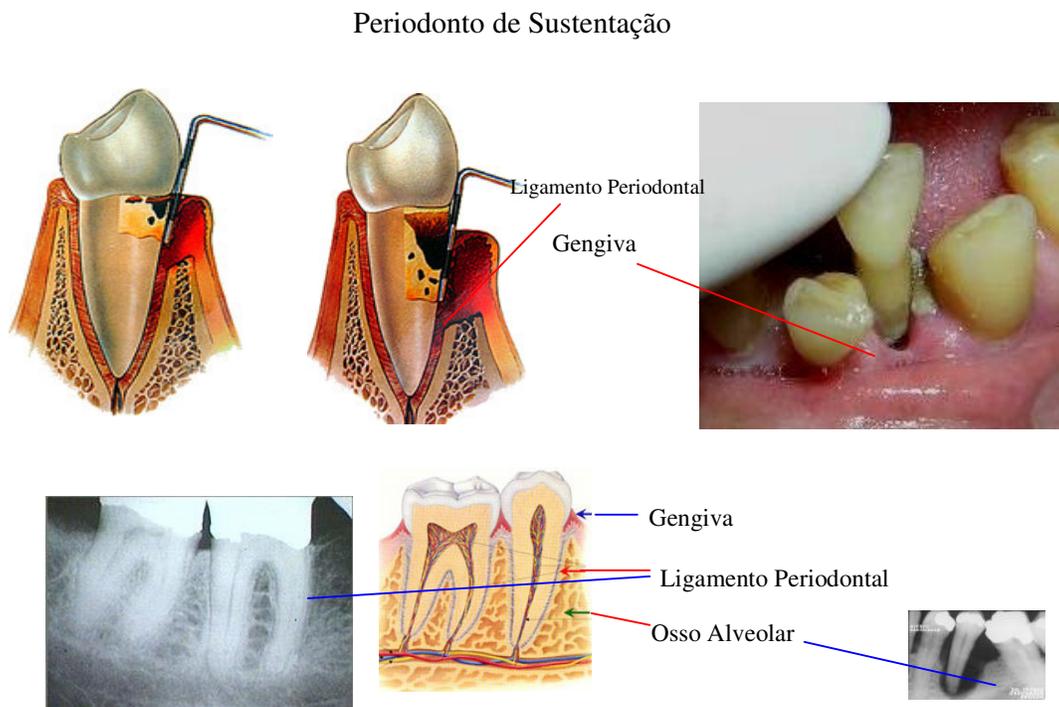


Figura 2 - Desenho Esquemático e aspecto clínico mostrando o processo de mobilidade dental pela perda óssea e conseqüente perda dentária.

Atualmente, sabe-se que as bactérias são agentes essenciais, porém apenas sua presença não é suficiente. São necessários fatores provenientes do hospedeiro para o desenvolvimento e progressão desta patologia (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

O evento inicial da resposta do hospedeiro corresponde ao recrutamento e migração de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) para o local da infecção

periodontal. Os neutrófilos são importantes na proteção do periodonto contra infecções bacterianas liberando substâncias como lisozima, lactoferrina, fosfatase alcalina, hidrolases ácidas, proteínas catiônicas e, também, mieloperoxidase (MPO) capazes de eliminar os microrganismos (ÖVER et al., 1993). Contudo, a liberação das enzimas lisossomais e de radicais de oxigênio pode promover destruição tecidual (LIU et al., 2001).

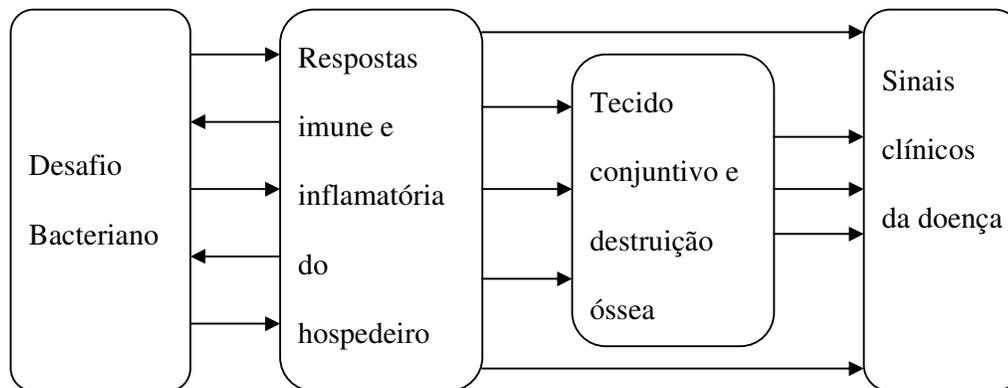


Figura 3 - Os sinais clínicos e patológicos das doenças periodontais definidos pela resposta do hospedeiro perante o desafio bacteriano (KORNMAN, 2001).

O evento inicial da resposta do hospedeiro corresponde ao recrutamento e migração de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) para o local da infecção periodontal. Os neutrófilos são importantes na proteção do periodonto contra infecções bacterianas liberando substâncias como lisozima, lactoferrina, fosfatase alcalina, hidrolases ácidas, proteínas catiônicas e, também, mieloperoxidase (MPO) capazes de eliminar os microrganismos (ÖVER et al., 1993). Contudo, a liberação das enzimas lisossomais e de radicais de oxigênio pode promover destruição tecidual (LIU et al., 2001).

A infiltração dos PMN e sua ativação nos tecidos inflamados são mediadas por quimiocinas, moléculas de adesão e citocinas, tais como: IL-8, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM -1), IL-1 β e TNF. Em contrapartida, os neutrófilos ativados podem produzir mais destes mediadores levando a uma auto-amplificação do recrutamento e da ativação dos PMN, perpetuando a resposta inflamatória e a destruição tecidual (LIU et al., 2001).

Os metabólitos do ácido araquidônico são importantes mediadores inflamatórios e desempenham papel fundamental na doença periodontal. Estes metabólitos incluem uma variedade de compostos derivados dos ácidos graxos que são enzimaticamente produzidos,

através da ação da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase, e liberados em resposta à lesão tecidual local. Como exemplo destes metabólitos, podemos citar prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI₂), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) e outros ácidos hidroxieicosatetraenóico (HETE). Tais compostos têm sido considerados os principais mediadores catabólicos da doença periodontal uma vez que são potentes estimuladores da reabsorção óssea, presentes em níveis elevados em indivíduos com esta patologia (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

Em nosso laboratório, Bezerra et al. (2000) observaram que a inibição da COX, promovida por fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), foi capaz de prevenir a perda óssea alveolar na doença periodontal experimental. Posteriormente, também trabalho do nosso grupo demonstrou o tratamento com um inibidor seletivo de ciclooxigenase-2 (etoricoxib), foi capaz de reduzir a inflamação e a reabsorção do cemento e osso alveolar, quando comparado com a indometacina (AZOUBEL et al., 2007).

As citocinas desempenham importante papel na patogênese da doença periodontal (GALBRAITH et al., 1997). São proteínas solúveis, que transmitem informações de uma célula à outra através de mecanismos específicos, tendo como um de seus objetivos, eliminar patógenos promovendo a reparação do dano tecidual (GENCO, 1992). Contudo, as citocinas pró-inflamatórias desencadeiam eventos de sinalização intracelular e comportamentos celulares catabólicos através de ligações específicas a seus receptores (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000), desempenhando importante papel na gênese da doença periodontal (GALBRAITH et al., 1997).

As principais citocinas envolvidas na periodontite são a IL-1 β e TNF- α , as quais atuam direta e sinergisticamente estimulando a degradação da matriz de tecido conjuntivo, ativação dos osteoclastos e a reabsorção óssea (LIU et al., 2001). Estas compartilham propriedades biológicas em virtude de estimularem mensageiros intracelulares, por diferentes mecanismos, ativando a mesma cascata de metabolismo intracelular (KOBAYASHI et al., 1999).

A IL-1 é uma citocina sintetizada predominantemente pelos macrófagos e linfócitos, contudo, pode ser produzida por outras células, tais como neutrófilos, fibroblastos, ceratinócitos e células epiteliais. A IL-1 desempenha um importante papel na patogênese da doença periodontal destrutiva (ALEXANDER et al., 1996; KOBAYASHI et al., 1999). Esta

citocina induz a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) e de metaloproteinases, contribuindo, assim, para a perpetuação da degradação do tecido conjuntivo e da reabsorção óssea (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000). A IL-1 também promove a ativação de linfócitos T, proliferação de linfócitos B e estimulação da produção de anticorpos, modulação da função da célula endotelial, o qual inclui a liberação de fator estimulador de colônias granulócito-macrófago (GM-CSF), prostaciclina (PGI₂) e síntese do fator ativador de plaquetas (PAF) (PREISS; MEYLE, 1994). A IL-1 consiste de pelo menos dois subtipos, IL-1 α e IL-1 β , os quais têm homologia limitada ao nível de peptídeos e nucleotídeos, mas possuem atividade biológica comum e, também, ligam-se aos mesmos receptores celulares (KOBAYASHI et al., 1999).

TNF é uma proteína trimérica, secretada por monócitos e macrófagos, a qual desempenha um papel fundamental na doença periodontal (EBERSOLE; CAPPELLI, 2000). TNF está presente tanto no sulco gengival, como também nos tecidos gengivais inflamados. Este achado sustenta a hipótese de que citocinas como TNF, poderiam representar uma ponte entre o processo inflamatório e a destruição tecidual (ROSSOMANDO; WHITE, 1993). Para tal, mostrou-se que TNF induz à reabsorção da cartilagem e do osso, através da secreção de colagenase pelos fibroblastos (SANDROS et al., 2000). Recentemente nosso laboratório demonstrou a importância do TNF na doença periodontal experimental, através de estudos com inibidores da síntese de TNF (clorpromazina, pentoxifilina e talidomida), mostrando que estes reduziram de forma significativa o índice de perda óssea, as alterações histológicas e a leucocitose 11 dias após a indução da doença (LIMA et al., 2000; LIMA et al., 2004). Experimentos *in vitro* mostraram que esta citocina também é capaz de modular a função dos leucócitos polimorfonucleares (MEYLE, 1993). Contudo, Fredriksson et al. (2002) encontraram uma menor liberação *in vitro* de TNF por neutrófilos periféricos em pacientes com periodontite em comparação a pacientes saudáveis, sem a doença. Rossomando et al. (1990) também mostraram existir uma relação inversa entre a presença da inflamação gengival e TNF.

O óxido nítrico (NO), outro mediador inflamatório, também aparece na cascata inflamatória que ocorre na doença periodontal. O NO é um radical livre com importantes funções fisiológicas em baixa concentração. Contudo, em resposta a citocinas inflamatórias, são sintetizadas altas concentrações de NO, as quais são citotóxicas para bactérias, fungos, protozoários e células tumorais. Essas altas concentrações de NO também produzem efeitos

prejudiciais ao próprio hospedeiro, tais como dano ao DNA, peroxidação lipídica, dano protéico e estimulação da liberação de citocinas inflamatórias (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000). Também em nosso laboratório, foi demonstrada a participação do NO na doença periodontal experimental (DPE) em ratos e que, no entanto, gel contendo NO em maiores concentrações era capaz de inibir a reabsorção óssea induzida pela DPE (LEITÃO, 2002; LEITÃO et al., 2005). A determinação da presença de produtos inflamatórios no fluido gengival é de grande valia na avaliação do estado da doença periodontal e, com isso, do resultado esperado após a terapia (ALEXANDER et al., 1996).

Durante o processo inflamatório citocinas como a IL-1 β ativam enzimas como as metaloproteinases de matriz (NAKAYA et al., 2000). As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem uma família de enzimas proteolíticas, as quais promovem a degradação de macromoléculas que compõem a matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, laminina e proteoglicanos. O colágeno constitui a proteína estrutural básica de todos os tecidos periodontais, compreendendo cerca de 60% das proteínas da gengiva e do ligamento periodontal e mais de 90% da matriz orgânica do osso alveolar. A liberação de osteocalcina e citocinas promove a migração dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea (GOLUB et al., 1985).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima que se encontra presente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos é considerada uma enzima antibacteriana (BRADLEY et al., 1982) e pode ser considerado um indicador do acúmulo de neutrófilos no tecido. Menezes et al. (2005) demonstraram que a indução da DPE em ratos induzia aumento da atividade de MPO no tecido gengival do animal na sexta hora após a passagem do fio. Dados da literatura também mostram que a atividade da MPO é significativamente menor após terapia periodontal ou em pacientes sem comprometimento destes tecidos (CAO; SMITH, 1989).

1.3 Antimicrobianos na Terapia Periodontal

Medidas de higiene oral baseada em produtos naturais são praticadas por populações e culturas diferentes em torno do mundo desde a antiguidade (PAI et al., 2004). Segundo a OMS, 80% da população mundial, usam a medicina popular, principalmente através do uso de plantas medicinais, para suprir as necessidades de assistência médica primária (ELIZABETSKY, 1999). No interior do Ceará populações utilizam cigarros feitos

com folhas de alecrim-pimenta para aliviar a dor de dente (BOTELHO, 2005). A remoção mecânica regular do biofilme dental é a medida primária para prevenir a progressão da doença periodontal, consistindo na remoção também de cálculo, cimento contaminado e tecido de granulação, fatores que determinam a doença periodontal (LINDHE, 1999).

A terapia mecânica periodontal reduz a quantidade de bactérias supra e subgingivais nos sítios comprometidos, entretanto, estudos demonstram que a completa remoção do biofilme e de depósitos de cálculo subgingivais é difícil e que depósitos residuais são freqüentes, principalmente em sítios profundos (CAFFESSE et al., 1986). Alguns patógenos permanecem nos sítios tratados devido a sua habilidade de invadir os tecidos periodontais (CHRISTERSSON et al., 1987). Estes achados têm suportado o uso de agentes antimicrobianos, tanto locais quanto sistêmicos, na terapia periodontal, associado à instrumentação mecânica, podendo suprimir ou reduzir significativamente sua quantidade promovendo benefícios adicionais à terapia mecânica convencional (RAMS; SLOTS, 1996).

Seqüelas psico-sociais da doença



Figura 4 - Uma paciente com apenas 35 anos de idade com aparência estética prejudicada pela perda precoce de dentes e osso alveolar, devido à doença periodontal

A terapia mecânica periodontal reduz a quantidade de bactérias supra e subgingivais nos sítios comprometidos, entretanto, estudos demonstram que a completa remoção do biofilme e de depósitos de cálculo subgingivais é difícil e que depósitos residuais são freqüentes, principalmente em sítios profundos (CAFFESSE et al., 1986). Alguns patógenos permanecem nos sítios tratados devido a sua habilidade de invadir os tecidos periodontais (CHRISTERSSON et al., 1987). Estes achados têm suportado o uso de agentes

antimicrobianos, tanto locais quanto sistêmicos, na terapia periodontal, associado à instrumentação mecânica, podendo suprimir ou reduzir significativamente sua quantidade promovendo benefícios adicionais à terapia mecânica convencional (RAMS; SLOTS, 1996).



Figura 5 - Os sinais clínicos e patológicos das doenças periodontais

O uso de antibióticos sistêmicos pode ser usado como forma de terapia adjunta à raspagem e alisamento radicular, especialmente em casos de recidivas. Entretanto, algumas desvantagens são observadas na sua utilização (SLOTS; RAMS, 1990). A via local de aplicação permite o alcance de concentrações subgingivais de drogas antimicrobianas até 100 vezes maiores do que a atingida com drogas via sistêmica (STOLLER et al., 1998) permite ainda a utilização de antimicrobianos que não podem ser utilizados sistemicamente. Assim, o interesse pelo conhecimento e avaliação da efetividade de drogas locais vem conduzindo estudos envolvendo diferentes dispositivos de aplicação e agentes antimicrobianos. Um sistema de liberação local deve liberar a droga na base da bolsa periodontal em concentrações microbiologicamente efetivas; e manter uma concentração efetiva da droga no interior da bolsa periodontal por um período de tempo suficiente (GOODSON et al., 1985).

As substâncias antimicrobianas locais têm sido preconizadas no tratamento da doença periodontal com o intuito de combater os efeitos indesejáveis dos agentes sistêmicos e promover ação antibacteriana nos sítios comprometidos pela doença. Foram inicialmente utilizadas como irrigantes subgingivais, aplicadas tanto pelo profissional como pelo próprio paciente. A clorexidina foi uma das substâncias estudadas em geral, os irrigantes locais não têm demonstrado benefícios adicionais à terapia mecânica convencional. Este fato pode ser atribuído à incapacidade destes agentes em manter concentrações efetivas da droga no local

de ação por tempo suficiente atribuída à constante renovação do fluido crevicular (WENNSTROM et al., 1987). Pesquisas recentes mostram que em uma bolsa periodontal de 5 mm de profundidade, a troca de fluido crevicular é feita cerca de 40 vezes por hora. Estes autores estimaram que a meia vida de um agente farmacológico no sulco gengival é de aproximadamente 1 minuto (GOODSON et al., 1989). Assim, um importante fator a ser considerado no tratamento com drogas locais é o tempo de contato da droga com a microbiota subgengival para atividade efetiva de uma droga aplicada localmente, é necessário um sistema de liberação lenta, o que proporcionando concentrações para a inativação de patógenos periodontais.

Os primeiros estudos que avaliaram a efetividade da tetraciclina em dispositivo de liberação local foram conduzidos por Goodson et al. (1979) utilizando fibras preenchidas com tetraciclina aplicadas subgengivalmente, e verificaram efeitos sobre a microbiota subgengival e sinais clínicos da doença com uma dose 1/1000 da dose sistêmica usual. Posteriormente em outro estudo foi observada uma maior redução na contagem de espiroquetas e bastonetes quando comparado ao grupo controle em um período de 10 dias (GOODSON et al., 1985).

Estudos prévios confirmaram a efetividade do sistema de liberação controlada através da redução dos níveis de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e ganhos em inserção clínica maior do que os obtidos no grupo de raspagem e alisamento radicular (GOODSON et al., 1991; NEWMAN et al., 1994). A minociclina tem apresentado resultados satisfatórios como dispositivo de liberação sustentada, sob forma de gel e de micro esferas. Os estudos demonstraram a diminuição do número de bactérias e mudanças clínicas favoráveis e composição bacteriana subgengival (ISOSHIMA et al., 1987).

Patógenos periodontais apresentam susceptibilidade a concentrações de 0,1 a 2.0 µg/mL de doxiciclina. Para que a droga local exerça sua ação, é necessária uma concentração inibitória mínima e que esta se mantenha por um período adequado no sítio de ação (SLOTS; RAMS, 1990).

Stoller et al. (1998), estudaram as concentrações encontradas no fluido crevicular, após aplicação local de doxiciclina a 8,5%. Os autores encontraram uma concentração de 1493µg/mL (700 vezes maior que a concentração inibitória mínima) no fluido crevicular em 2 horas. Esta concentração permanecia alta (acima de 1000µg/mL) após 18 horas, e caía para

309µg/mL ao sétimo dia, sendo esta última concentração ainda 150 vezes maior que a concentração inibitória mínima.

Em um estudo com aplicação local de tetraciclina, Goodson et al. (1985), demonstraram que 85% dos sítios tratados apresentavam contagem de menos de 10.000 espiroquetas, o que é considerado similar à zero. Estes resultados se mantiveram por nove meses. Apesar de 12 % de a microbiota normal apresentar, resistência às tetraciclina (LACROIX; WALKER, 1995), a terapia local reduz significativamente os níveis de bactérias subgingivais anaeróbias proporcionando aumentos transitórios na proporção de microorganismos resistentes, porém não em número total de microorganismos (WALKER et al., 2000). A maior parte dos estudos com doxiciclina tem revelado atividade anti-proteinases, e anti-colagenases deste medicamento (GRENIER et al., 2002).

O primeiro estudo que demonstrou a efetividade e biocompatibilidade do dispositivo de aplicação local de doxiciclina foi o estudo em animais. Os pesquisadores avaliaram o efeito do gel contendo hialato de doxiciclina a 8,5%, como terapia isolada, em periodontite experimental em cães. Como resultados, encontraram reduções médias de 2.5 mm para profundidade de sondagem e 2 mm em ganho de inserção clínica ao final de 4 meses de avaliação. Este estudo foi o precursor para os estudos clínicos (POLSON et al., 1997). Em um estudo clínico com aplicação local do gel de doxiciclina pesquisadores, mostraram ser este procedimento um importante apoio para o tratamento de fumantes quanto à profundidade de sondagem e nível de inserção clínica (MACHION et al., 2006).

De acordo com Genco (1981) o antibiótico metronidazol mostrou-se efetivo contra anaeróbios, mas não demonstrou efeito contra bactérias facultativas, tais como *Eikenella corrodens*, *Actinomyces*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e espécie *Capnocytophaga*. Através do uso local do gel de doxiciclina, a terapia de aplicação local parece ser um recurso viável para o tratamento de pacientes periodontalmente comprometidos, uma vez que estes respondem de maneira desfavorável à terapia mecânica convencional (KALDAHL et al., 1988).

1.4 Aroeira do Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All)

A medicina popular no Nordeste do Brasil, mais especificamente no Estado do Ceará, utiliza-se da entrecasca da Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) (Figura 6), sob a forma de extratos aquosos, hidroalcoólico ou apenas de cocção da casca, como antiinflamatório para várias afecções principalmente ginecológicas, e mais recentemente orais. (MENEZES et al., 1985; MENEZES, 1986; MENEZES; RAO, 1988). A aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) é uma árvore da família *Anacardiaceae*, árvore de tronco alto, podendo chegar a ter mais de 1 m de diâmetro, larga copa, formada de ramos flácidos. Estes, quando novos, são revestidos de pêlos. Madeira de cerne roxo-escuro, sendo muito dura, é difícil de ser lavrada.



Figura 6 - A árvore da Aroeira do Sertão

É utilizada para construção civil, esteios, dormentes, vigamentos, postes, obras hidráulicas, quase imputrescíveis ao contato do solo. A casca é balsâmica e hemostática, usada entre os sertanejos, como tônico e contra as doenças das vias respiratórias, do aparelho urinário, nas hemoptises e metrorragias. Cresce em sopés e quebradas das serras e nos tabuleiros vindo daí a denominação de aroeira do sertão (MATOS, 2000).

O interesse pelo estudo da aroeira levou à realização de pesquisas com vistas à comprovação de sua eficácia terapêutica. Assim, os extratos hidroalcoólico e aquoso da entrecasca da aroeira-do-sertão foram paralelamente submetidos a estudos químicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos tendo mostrado evidentes efeitos antiinflamatórios, cicatrizantes, antiulcerogênicos, anti-histamínicos, antibradicininas e analgésicos, aliados à

ausência de efeitos tóxicos e teratogênicos, nas doses utilizadas (RAO et al., 1987; BANDEIRA, 1993; VIANA et al., 1997; 2003).

Menezes (1986) estudou as propriedades farmacológicas da entrecasca da aroeira, sua toxicidade e seu potencial anti-inflamatório e antiulcerogênico, numa série de modelos experimentais. Observou-se que o extrato hidroalcoólico da entrecasca da aroeira apresentava potente atividade antiinflamatória em modelos de inflamação aguda e subaguda. Apresentando ainda potente ação antiulcerogênica em modelos experimentais de úlcera por histamina e nas úlceras de Shay em ratos.

Recentemente, duas frações foram isoladas da entrecasca da aroeira-do-sertão por meio de fracionamento químico: uma fração rica em tanino e outra rica em chalconas diméricas (VIANA et al., 1997, 2003). O fracionamento cromatográfico do extrato resultou na separação de sete frações úteis, das quais, duas, codificadas como F(8-13) e F(18), apresentaram atividade antiinflamatória. A análise da primeira permitiu concluir tratar-se de uma mistura com predominância de duas substâncias de natureza chalcônica. A segunda mostrou-se constituída predominantemente de taninos catéquicos. (VIANA et al., 1997). (Figura 9).

Rao et al. (1987) estudaram os efeitos do extrato aquoso da entrecasca da aroeira sobre úlceras, induzidas em ratos por ácido acetilsalicílico e histamina, e observaram que o extrato inibiu significativamente a indução das lesões gástricas.

Bandeira (1993) fez estudo químico com monitorização farmacológica da entrecasca da aroeira-do-sertão. Para isso, realizou o fracionamento do extrato acetato de etila, também com ação antiinflamatória comprovada, que forneceu duas frações com atividade antiinflamatória, F(8-13) e F(18). Da fração F(8-13) foram isoladas e identificadas duas chalconas inéditas, denominadas *urundevina A B e C* (Figura 9).

Rodrigues (1999) estudou o efeito antiinflamatório e antiulcerogênico do extrato aquoso da aroeira-do-sertão na colite difusa experimental em ratos e verificou que o extrato teve ação terapêutica na colite.

Albuquerque (2003) estudou o efeito das chalconas na conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina em cobaias, analisando os efeitos clínicos, morfológicos e

morfométricos. O estudo concluiu que as chalconas têm efeito terapêutico na conjuntivite induzida por ovalbumina em cobaias. Tendo em vista que o tecido da conjuntiva ocular é nobre e não houve lesões ao tecido ou processos alérgicos com o uso da aroeira na sua forma fracionada, a chalcona, e que os anti-sépticos à base de ácidos carbólicos causam danos aos tecidos. O extrato aquoso da aroeira-do-sertão em uma concentração de 10% apresentou atividade cicatrizante na colite induzida por ácido acético, melhorando a resistência à tensão (CAVALCANTE et al., 2005; GOES et al., 2005). O uso das chalconas foi pesquisado em fraturas expostas em ratos não apresentando efeito na consolidação da fratura, porém se mostrou benéfica na cicatrização da ferida provavelmente devido aos possíveis efeitos anti-séptico e cicatrizante (MOTA, 2006). O gel de aroeira do sertão se mostrou eficaz no controle e tratamento da mucosite oral induzida em hamsters, no entanto como agente inibidor da destruição do colágeno nos tecidos periodontais ainda não foi estudado (SANT'ANA, 2006).

Menezes (1986) e Viana et al. (1995) estudaram o efeito do extrato hidroalcoólico da entrecasca da aroeira-do-sertão na degranulação dos mastócitos. O estudo concluiu uma redução na degranulação dos mastócitos nos animais tratados com o extrato em comparação ao controle. Os resultados sugerem que as propriedades de estabilização da membrana celular, anti-histamínica e antibradicínica, poderiam estar envolvidas na medição da ação antiinflamatória da aroeira-do-sertão. Alguns fitoterápicos que normalmente são usados em patologias não infecciosas têm mostrado alguma atividade antimicrobiana *in vitro*. Recentemente foi demonstrado que entre estas drogas, encontram-se o extrato da aroeira (VIANA et al., 2003). De acordo com estudos conduzidos por Amorim e Santos (2003) os autores citados o gel vaginal de aroeira da praia foi capaz de inibir o crescimento de bactérias relacionadas com a vaginose bacteriana. Além disso, este fitoterápico como também outros, parecem ser bioativos, tanto *in vivo* como *in vitro*, contra o microrganismo anaeróbio *Gardnerella vaginalis*.

1.5 Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham)

O gênero *Lippia* (*Verbenaceae*) tem fornecido um grande número de espécies que são usadas frequentemente na medicina brasileira. A *Lippia sidoides* é um arbusto, encontrado no semi-árido sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. A ocorrência comum é na caatinga entre Mossoró (RN) e Tabuleiro do Norte - Ce (Figura 7). O arbusto é conhecido vulgarmente como "alecrim-pimenta" ou "estrepá cavalo". O alecrim

pimenta é uma planta aromática, de uso medicinal popular. O óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELS) é rico em timol e carvacrol, apresentando propriedade bactericida e fungicida. Em virtude destas, este vegetal é cultivado em hortos de plantas medicinais e faz parte do elenco de plantas selecionadas pelo Governo do Estado, como fitoterápico. Muito utilizada na medicina popular como anti-séptico geral o alecrim (*L. sidoides* Cham), é uma planta de uso tópico indicado na pele, boca, nariz e garganta, infecções intestinal e como vermífugo, principalmente contra Platelmintos. Atualmente o extrato hidroetanólico do alecrim pimenta é usado em diversas prefeituras do interior do estado para os mais diversos fins (MATOS, 2000). Isto respaldado por resultados obtidos de vários ensaios farmacológicos que vieram validar cientificamente seu uso como agente antimicrobiano. O uso do mesmo ainda não ocasionou nenhum efeito colateral ou mesmo de irritações ou processos de hipersensibilidade em uma concentração de 1% de acordo com os estudos de toxicidade e alergenicidade conduzidos por (MENDONÇA et al., 1989), sendo confirmado por (FONTENELLE et al., 2007) demonstrado outras atividades antimicrobiana contra fungos e ainda recentemente se mostrando como um excelente anti-oxidante bem como gastroprotetor (MONTEIRO et al., 2006).

Lemos et al. (1990) através do estudo fitoquímico das partes aéreas de *L. sidoides*, levou ao isolamento de vários constituintes químicos pertencentes a diferentes classes de compostos químicos sendo os majoritários o timol e carvacrol. Costa et al. (2001) isolaram do extrato hidroetanólico seis quinonas, quatro flavonóides, dentre os flavonóides isolados a quercitina foi avaliada no modelo experimental de doença periodontal em ratos *Wistar* mostrando uma significativa redução na perda óssea alveolar quando administrado por via intra peritoneal (TEIXEIRA, 2002). O Timol e Carvacrol são componentes de diversos óleos essenciais e foi demonstrado exercerem uma forte atividade antimicrobiana. As exigências estruturais para a atividade do carvacrol foram determinadas pela comparação com compostos estruturais relacionados do óleo, recentemente foi possível demonstrar que o carvacrol apresenta uma atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas e *Candida albicans* maior quando comparado ao timol e ao óleo essencial (VELDHUIZEN et al., 2006; BOTELHO et al., 2007a). Atualmente na Faculdade de Farmácia – UFC foi desenvolvido um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) elaborado pelo setor de Farmacotécnica com o objetivo de validar seu uso em programas alternativos na prevenção da cárie dental (BOTELHO; SOARES, 1994; BOTELHO, 2005). O enxagüatório bucal apresenta excelentes propriedades anti-cariogênicas, efetivo contra os principais

sorotipos de estreptococos acidogênicos responsáveis pelo início do processo de cárie dental e de gengivite (BOTELHO, 2005). Estudos recentes indicam um poder inseticida contra o mosquito transmissor da dengue e que o mesmo possa ajudar no combate ao dengue e ao mal de Chagas (CAVALCANTE, 2003).

Alecrim pimenta (*Lippia sidoides*)

Planta Típica da Região Nordeste



Lemos TLG
Antimicrobial Activity of Essential Oil of Brazilian Plants
Phytother Res 1990

Figura 7 - O Alecrim-pimenta

A partir da primeira investigação *in vitro* contra bactérias orais, o óleo essencial se mostrou efetivo na inibição do crescimento das principais bactérias cariogênicas (BOTELHO, 1994). Sendo rico em timol e carvacrol, o óleo essencial de alecrim-pimenta é um dos melhores anti-sépticos naturais. Na indústria farmacêutica, por exemplo, o óleo é utilizado em remédios destinados a combater pano branco, caspa, espinha, sarna, impingem, ferimentos, mau cheiro nos pés e axilas (LACOSTE et al., 1996). Um estudo realizado em uma favela típica de Fortaleza, no bairro do Serviluz, indicou que o anti-séptico bucal sem adição de álcool na sua composição é altamente eficaz na redução da placa bacteriana e sangramento gengival. A redução de gengivite bacteriana e placa dental foram da ordem de 69% em comparação com o padrão ouro a clorexidina que obteve uma redução da ordem de 72%, entretanto não apresentando diferenças estatisticamente significante (BOTELHO et al., 2007b), o anti-séptico desenvolvido não mostrou efeitos colaterais consideráveis e foi muito bem aceito pela comunidade.

Em um estudo com animais da raça pastor alemão Girão et al. (2003) demonstraram um potente efeito inibidor deste anti-séptico bucal na prevenção da gengivite nestes animais. Outros pesquisadores demonstraram a atividade antiinflamatória do óleo essencial em modelos experimentais (MONTEIRO et al., 2006), enquanto que outro estudo avaliou o óleo essencial como proposta de terapia alternativa no controle do biofilme de *Enterococcus faecalis*, bactérias multirresistentes que frequentemente são relatadas como causadoras de infecções persistentes no tratamento de canal dentário (CARVALHO et al., 2007). É provável que esse efeito inseticida também funcione contra os patógenos orais que causam a cárie e doenças periodontais bem como contra fungos do trato genito urinário feminino a exemplo do gel de aroeira.

Os principais componentes do óleo essencial do alecrim pimenta estão descritos abaixo eles representam um total de aproximadamente 70% do óleo investigado neste estudo. (Figura 8).

É provável que esse o mecanismo de ação pelo quais os componentes do óleo essencial apresentam sejam em decorrência devido à formação de uma lesão na membrana citoplasmática com ênfase na sua porção de ácidos graxos (VELDHUIZEN et al., 2006) e na membrana lipídica, com uma redução considerável do índice do ergosterol. (PINTO et al., 2006).

O mecanismo de ação antimicrobiana do óleo *Lippia sidoides* não foi relatado em detalhe. Desde que os compostos antimicrobianos ativos no óleo essencial são de natureza fenólica, muitos estudos direcionam o mecanismo de ação com relação a seus efeitos nas membranas celulares, alterando sua função e estrutura, aumentando sua permeabilidade causando o inchamento no interior da célula microbiana. (RADONIĆ; MILOŠ, 2003). A atividade anticolinesterásica também já foi bastante estudada e bem esclarecida sendo merecedor de destaque o efeito inibitório da acetilcolinesterase (AChE) exercido pelo carvacrol foi 10 vezes maior do que aquele exercido pelo seu isômero timol (JUKIC et al., 2006).

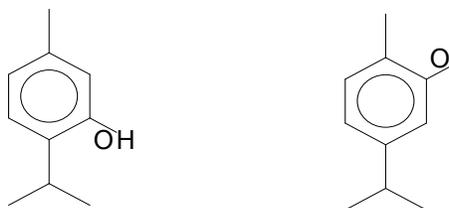


Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos isolados do óleo essencial de *Lippia sidoides*:
A) Timol e **B)** Carvacrol.

Foi demonstrado recentemente que o carvacrol apresenta propriedades anticarcinogênica, antiproliferativa and anti-agregação plaquetária (KARKABOUNAS et al., 2006). Pesquisas recentes demonstraram ser o carvacrol um inibidor de HNE (Human Neutrophil Elastase) e poderia ser considerado como um agente natural antielastase e um candidato possível para fitoterapia no tratamento dos casos patológicos tais como as doenças inflamatórias crônicas como a doença pulmonar obstrutiva crônica e o enfisema. (KACEM et al., 2006)

Vários trabalhos mostram a versatilidade de uso de compostos fenólicos como o timol e o carvacrol na sua atividade antimicrobiana. O carvacrol se mostrou eficaz inibir em todas as concentrações quatro linhagens de *Listeria monocytogenes* assim como as cepas de *E. coli* em superfícies de contato do alimento, especulando a possibilidade de compostos provenientes de óleos essenciais poderem oferecer novos meios para controlar o crescimento de microorganismos não apenas no ser humano como em alimentos (PEREZ-CONESA et al., 2006). O recente estudo indica que o carvacrol proveniente do óleo essencial do *Thymus pulegioides* apresenta atividade antifúngica considerável contra *Candida albicans*, *Aspergillus* e linhagens de fungos dermatófitos (PINTO et al., 2006). Em outro estudo foi possível demonstrar que o carvacrol foi efetivo na diminuição significativa de fungos e bactérias em hospitais (SATO et al., 2006).

1.6 Doxiciclina

Derivado da tetraciclina, a doxiciclina, apresenta vantagens em relação a outros antibióticos como ação efetiva contra anaeróbios associados à doença periodontal (LISTGARTEN et al., 1978); substantividade às superfícies de dentina e cimento (Baker et

al., 1983), sendo liberada, após sua absorção, em concentrações bacteriostáticas (CHRISTERSSON et al., 1993); dificultando a aderência da película adquirida e a conseqüente formação do biofilme subgingival (BJORVATN et al., 1985).

Aplicada sob forma sistêmica em baixas concentrações, possui propriedades não-antibacterianas, porém apresenta capacidade de inibir metaloproteinases em tecido gengival humano inflamado (GOLUB et al., 1994). Associada ao tratamento mecânico convencional apresenta vantagens no tratamento clínico onde demonstra efetividade na redução dos parâmetros clínicos e inibição da atividade colagenolítica (CROUT et al., 1996). No modelo experimental tal fato também foi demonstrado por Bezerra et al. (2002). A doença periodontal tem respondido bem à terapia antimicrobiana, a razão para o uso destes compostos é o fato de que os microrganismos que representam os agentes causais têm sido susceptíveis quando do seu uso (GENCO, 1981).

A aplicação local antimicrobianos em sítios comprometidos tem apresentado resultados satisfatórios (STOLLER et al., 1998). A substância permanece em ação no local por maior tempo, em maiores concentrações, e a probabilidade de ocorrência de efeitos colaterais, freqüentemente associados com a medicação sistêmica, diminui (GOLUB et al., 1994; VAN STEENBERGHE et al., 1999). Este antimicrobiano é utilizado na forma de gel, o qual mantém a droga no sítio de ação em quantidade acima da concentração inibitória mínima (MIC_{90}) para inibição de patógenos periodontais (STOLLER et al., 1998). Estudos recentes têm indicado a utilização local deste gel antimicrobiano como forma definitiva de tratamento, eliminando o procedimento de raspagem e alisamento radicular, e apresentando resultados efetivos no combate à doença periodontal (POLSON et al., 1997; GARRETT et al., 1999).

2 JUSTIFICATIVA

As medicações de uso tópico podem ser de grande valor na terapia periodontal especialmente nos casos nos quais a tratamento mecânico sozinho não foi satisfatório. Vários benefícios têm sido associados a estas, tais como redução da profundidade de sondagem, recuperação do ligamento periodontal, redução dos patógenos periodontais e diminuição da necessidade de cirurgia periodontal (CIANCIO, 1992; POLSON et al., 1997; MACHION et al., 2006).

Estudos prévios mostram que o extrato da aroeira e óleo essencial de alecrim apresentam várias aplicações no tratamento de afecções inflamatórias e bacterianas (VIANA et al., 1997; 2003; RODRIGUES et al., 1999; GOES et al., 2005; BOTELHO; SOARES, 1994; TEIXEIRA, 2002; GIRÃO et al., 2003; BOTELHO, 2005; BOTELHO et al., 2007a, 2007b, 2007c, 2007d). Porém, o efeito do tratamento tópico com estes produtos naturais bem como de seus derivados na doença periodontal experimental ainda não havia sido demonstrado. Adicionalmente, os mecanismos pelos quais estes fitoterápicos e seus derivados atuam nesta doença ainda não estavam esclarecidos.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi estudar os mecanismos envolvidos na ação local do gel de alecrim + aroeira e de seus princípios ativos isolados, no modelo de periodontite experimental em ratos, desenvolvido por vários autores (CRAWFORD et al., 1978; SALLAY et al., 1992; SAMEJIMA et al., 1990; KOIDE et al., 1995) e modificado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA (BEZERRA et al., 2000; LIMA et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da aplicação local dos géis de alecrim pimenta, aroeira e seus princípios ativos isolados no modelo de periodontite experimental em ratos e estudar o mecanismo de ação destas substâncias.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial do Alecrim pimenta (*L.sidoides*), e seus princípios ativos: timol e carvacrol *in vitro* em difusão em Ágar; Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) contra *Estreptococos* cariogênicos e concentração fungicida mínima (MFC) contra *C. albicans*;
- Determinar o efeito dos géis de alecrim pimenta e aroeira e de seus princípios ativos isolados, no índice de perda óssea, na análise histopatológica, massa corpórea, atividade de mieloperoxidase, níveis de citocinas e análise microbiológica no modelo de periodontite experimental em ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

Durante o curso dos experimentos, foram utilizados diversos aparelhos e instrumentos, os quais são citados a seguir:

- Balança digital eletrônica para pesagem dos animais - Filizola;
- Balança analítica (Analytical Standard - Ohaus®);
- Centrífuga (Centrifuge 5804R – Eppendorf);
- Citocentrífuga Cito-Ciclo (Revan®);
- Cuba de ultra-som (Thornton);
- Escala de McFarland (Probac);
- Espectrofotômetro (Spectronic®20 Genesys);
- Estufa bacteriológica 37°C;
- Fio de náilon para sutura - 3.0;
- Geladeira e freezer (-70°C);
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc.)
- Jarra de anaerobiose (Oxoid);
- Micropipetas automáticas;
- Microscópio óptico binocular;
- Micrótomo (Olympus);
- Milli-Q (Millipore);
- Ultra Turrax T8.10 (IKA Labortechnik);
- Vortex.

4.1.1 Meios de Cultura

- BHI - Brain Heart Infusion (Ágar) – DIFCO Suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro e com hemina/menadione;
- Müller Hinton (Ágar) – DIFCO;
- BHI - Brain Heart Infusion – DIFCO – Caldo Suplementado;
- Sauboraud– DIFCO.

4.1.2 Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes Utilizados

- Gel de Alecrim e Aroeira;
- Gel de Carvacrol e Chalconas;
- Gel de Doxiciclina: (Pfizer; Germany);
- Albumina bovina 1% w/v;
- Ácido nítrico 7% v/v;
- Água destilada;
- Álcool etílico 70% v/v;
- Cloral hidratado 10%;
- Complexo Strepto-avidina peroxidase (SAP);
- Complexo DAB;
- Diidrocloreto de O-dianisidina;
- Éter sulfúrico;
- Formaldeído 40% v/v;
- Peróxido de hidrogênio 1% v/v;
- PBS;
- o-fenilenediamina diidrocloreto – dissolvido no tampão substrato descrito no protocolo de ELISA;
- Tampão de brometo de hexadecil-metil-amônio (HTAB);
- Tampão fosfato de potássio;
- Tampão citrato;
- Tween 80;
- Soro fisiológico 0,9% (NaCl 0,15M);
- Soro normal de carneiro;
- Sulfato de sódio 5% w/v;
- Xilol;
- Azul de metileno 1% w/v;
- Ácido fosfotungstico;
- Eosina;
- Fucsina ácida;
- Hematoxilina;
- Hematoxilina de Harris;
- Orange G.

4.2 Plantas Medicinais

Inicialmente, o comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Ceará (# 551/04; # 228/06) autorizou a coleção das plantas como segue: as folhas de *L. sidoides* foram coletadas em agosto 2005 no Horto de plantas medicinais prof. Francisco José Abreu Matos. A entrecasca da aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) foi coletada nos arredores da cidade de Fortaleza. Os comprovantes dos espécimes de números 25.149 e 14.999, respectivamente, estão depositados no Herbário Prisco Bezerra, através da autenticação por botânicos do Departamento de Biologia - Universidade Federal do Ceará.

4.2.1 A cromatografia gasosa do óleo essencial de *Lippia sidoides*

O óleo essencial da *Lippia sidoides* foi obtido através da hidro-destilação das folhas frescas (300 g) usando um instrumento de vidro tipo Clevenger (CRAVEIRO et al., 1976) por 2 horas. O óleo foi secado sobre o sulfato de sódio anidro, rendendo 1.0 %. Após a extração, o volume do óleo essencial foi acondicionado em recipientes de vidro hermeticamente selados com as tampas de borracha, cobertas com a folha de alumínio para proteger da luz e mantido sob refrigeração de 8°C até ser usado.

A composição química do óleo essencial foi determinada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) na Universidade Federal de Ceará, através da cromatografia de gás acoplada ao espectroscópio (GC-MS) SHIMADZU GCMS QP5050, sob as seguintes circunstâncias: A temperatura da coluna variou de 35 a 180°C/min, em 4°C V/min, os espectros foram obtidos pelo impacto eletrônico. A identificação dos constituintes foi executada pela busca de índices de retenção e interpretação visual dos espectros (ALENCAR et al., 1984).

4.2.2 A fração enriquecida da chalcona (FEC) da aroeira (*M. urundeuva*)

A fração enriquecida da chalcona (FEC) da *M. urundeuva* foi obtida do extrato do etil acetato foi preparado com 5 quilogramas da entrecasca da aroeira *M. urundeuva* como descrita previamente (VIANA et al., 2003). O extrato do acetato de etil foi submetido a um tratamento com hexano com a finalidade de remover os lipídios. O extrato então foi cromatografado em uma coluna do gel de silicone (diâmetro de 5.0 cm) e eluído com

clorofórmio e misturas de clorofórmio/acetona nas seguintes proporções: 9;1, 8:2, 7:3, 1:1, e finalmente pelo álcool metil. O isolamento de compostos do tipo fração de chalconas foi feita com amido de milho como sustentação e a eluição da coluna com uma mistura de diclorometano/metanol (95:5). Com o procedimento cromatográfico, três compostos foram isolados dessa Fração Enriquecida de Chalconas (FEC). O procedimento analítico usado para a identificação estrutural destes combina o H^1 envolvido de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a RMN ^{13}C , com a contribuição dos espectros bidimensionais de uma correlação homonuclear do hidrogênio com hidrogênio (1H , 1H -COSY), bem como uma correlação heteronuclear do hidrogênio e do carbono-H. A atribuição precisa de deslocamentos químicos de átomos do carbono e do hidrogênio revelou, que a Fração Enriquecida da Chalcona está composta de três chalconas diméricas, denominadas de urundeuvina A, B e C (Figura 9).

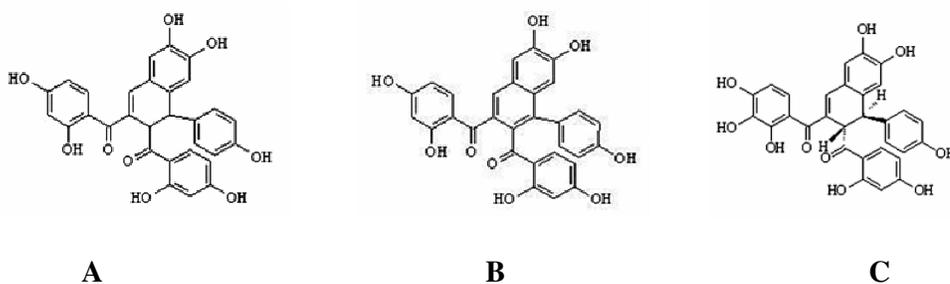


Figura 9 - Estruturas químicas das frações enriquecidas de chalconas (FEC) *urundeuvinas* A, B and C isoladas da entrecasca da aroeira do sertão (*M. urundeuva*) utilizadas para preparar o gel de chalconas

4.3 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do alecrim pimenta (OELS) e seus princípios ativos

Foram adquiridas duas cepas de referência: *Streptococcus Mutans* (ss-980) e *Candida Albicans* (ATCC 11203). As culturas foram recebidas do Instituto de Microbiologia do Rio de Janeiro e da Fundação Oswaldo Cruz, respectivamente, sendo liofilizadas e reativadas. Foram ainda isoladas de saliva de pacientes periodontalmente comprometidos bactérias cariogênicas classificadas como *S. sanguis*, *S. mitis* e *S. salivarius*, nesta e nas seqüências seguintes, os meios sempre foram confeccionados na véspera do uso e submetidos a teste de esterilidade; em todos os passos envolvendo semeadura foi feita a coloração pelo método de Gram, para verificar a pureza da cultura, e todo o trabalho de Bacteriologia foi

realizado em condições assépticas numa superfície previamente desinfetada com álcool 70% (v/v).

4.3.1 Diluições das drogas

Para cada espécie bacteriana testada foram feitas 8 diluições das substâncias testadas em *Eppendorf* estéril (CORNING, EUA.), onde inicialmente cada tubo recebeu 1000 μ L de cada solução sendo distribuído com micropipeta (SIGMA, EUA) com ponteiros esterilizados.

Em seguida, 10 μ L de cada substância foram adicionadas ao primeiro tubo, fazendo-se então a diluição seriada com fator 2, pipetando-se 10 μ L do casulo inicial, após homogeneização, para o segundo casulo e assim por diante.

Foram testadas as seguintes soluções antimicrobianas:

- **Solução de óleo Essencial de Alecrim pimenta**

Solução preparada em várias concentrações a partir da diluição em DMSO a 2% e em solução salina estéril em quantidade suficiente para se obter 1 mL da solução.

- **Solução de Timol**

Solução preparada em várias concentrações a partir da diluição em DMSO a 2% e em solução salina estéril em quantidade suficiente para se obter 1 mL da solução.

- **Solução de Carvacrol**

Solução preparada em várias concentrações a partir da diluição em DMSO a 2% e em solução salina estéril em quantidade suficiente para se obter 1 mL da solução.

4.3.2 Teste de difusão em ágar (teste do contato direto)

4.3.2.1 Preparo do inóculo

A atividade antimicrobiana do Óleo Essencial de *Lippia sidoides* (OELS), timol e de carvacrol foi determinada por testes padrão de susceptibilidade do disco (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 1998) no Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará.

O inóculo bacteriano e do fungo foi obtido a partir de colônias frescas crescidas em placas de ágar Mueller-Hinton. Cada cepa foi inoculada em 5 mL do caldo de Mueller-Hinton a fim obter uma concentração de 1.5×10^8 CFU/mL (0.5 MacFarland). O inóculo foi semeado com auxílio de um swab estéril no ágar de Mueller Hinton (Merck) e no ágar de Sabouraud (Merck), respectivamente.

Os discos de papel de filtro estéril com 6 milímetros de diâmetro (Schleicher, Schüll, Dassel, Germany) foram impregnados com 10 μ L de OELS, timol e carvacrol diluídos em DMSO a 2% em concentrações variando entre (OELS 435 – 6,79 mg/mL, timol 400-6,25 mg/mL, e carvacrol 400-6,25 mg/mL).

Após a incubação, todas as placas foram examinadas para todas as zonas de inibição do crescimento. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em milímetros usando um leitor de zona antibiótica de zonas “Fisher-Lilly” (Fisher Co. USA). As zonas de inibição em torno dos discos indicam a presença da atividade antimicrobiana. Todos os testes foram executados em triplicatas e os valores médios foram calculados. Como o DMSO a 2% não mostrou nenhuma inibição em estudos preliminares, foi usado como o controle negativo. Vancomicina (3 mg/mL) e o Cetoconazol (5 mg/mL) (OXOID, UK) foram usados como compostos antimicrobianos de referência a fim controlar a sensibilidade das bactérias e do fungo respectivamente.

4.3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (MBC/ MFC)

O método da diluição em caldo foi usado para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida e fungicida mínima (MBC/MFC) (NCCLS, 2000). Uma diluição de série de OELS (80-0,625 mg/mL), de timol (10-0,078 mg/mL) e de carvacrol (10-0,078 mg/mL) foi preparada. O caldo BHI (Merck) foi suplementado com o DMSO a 2% (Merck, Germany) a fim melhorar a solubilidade da amostra. O ensaio foi executado com diferentes concentrações de OELS, timol e de carvacrol. As culturas com a turvação visível foram ajustadas a aproximadamente 10^6 CFU/mL no caldo de BHI sendo suplementadas com diferentes concentrações dos compostos testados e incubados a 35°C/24 h. Para determinar MBC/MFC, alíquotas 100 μ L de cada inóculo foram removidas assepticamente dos tubos que não apresentaram turvação visível sendo estes valores usados

determinar a MIC, a seguir foram dispostos no ágar pelo método Pour-Plate para contagem de placa e incubados por 24 h no 37°C.

O MBC/MFC é definido pela concentração mais baixa de cada substância em que 99.99% ou mais do inóculo inicial foi eliminado. O número dos organismos que sobreviveram foram determinados pela contagem de colônias viáveis. As concentrações bactericidas mínimas observadas por este método serviram de base para se efetuar os cálculos das quantidades das drogas a serem utilizadas nos testes dos modelos experimentais.

Para avaliar a Concentração Bactericida Mínima, descrita como a menor concentração da droga que resulte em menos de 8 colônias (taxa de morte de 99,9%), foram pipetados 25 µL de cada tubo a partir da menor concentração da droga, e transferidos para placas de ágar Muller-Hinton para bactérias cariogênicas e Sauboraud para *C. albicans*. Essas placas foram incubadas em microaerofilia, a 37° C, por 24 horas.

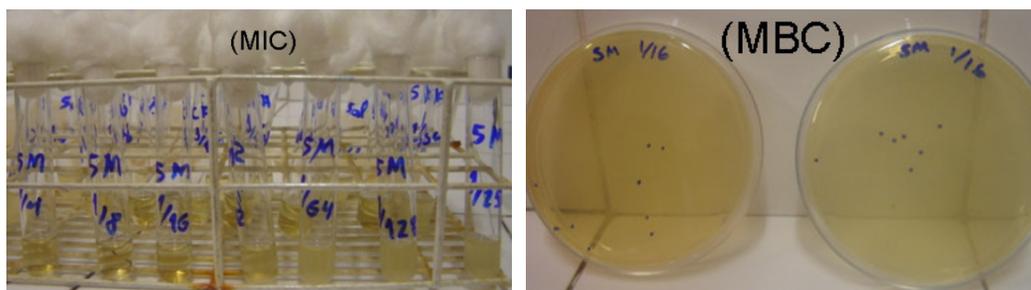


Figura 10 - Placas e tubos mostrando a MIC e MBC.

4.4 Elaboração dos Géis

Os géis utilizados no presente estudo foram preparados no laboratório de farmacotécnica da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Ceará, sob a supervisão do Professor Said Fonseca.

No primeiro estudo foram avaliados os géis que contêm o óleo essencial de alecrim-pimenta a 0.5% v/w (Gal), extrato fluido de Aroeira 5% w/w (GAR), ou a combinação de ambos (GAA); No segundo estudo foram elaborados géis a base de chalconas diméricas (600 µg/g - GCh) e o carvacrol (300 µg/g- GCa) ou a sua combinação (GCC) tendo como controle positivo o gel de doxiciclina e o gel veículo como controle negativo.

Os ingredientes ativos de ambas as plantas foram mantidos sob a obscuridade para evitar o efeito da luz. Para a preparação dos géis, carbopol-940 (BF Goodrich Co., Cleveland) 2% (w/v) foi usado pela dispersão mecânica na água destilada sob vigorosa o agitação, seguindo o que preconiza o manual de técnicas da farmacopéia Brasileira 2ª. Edição. Após a sua elaboração, os géis foram armazenados em recipientes brancos de polietileno mantidos selados hermeticamente sob a refrigeração de 8°C até ser usado. O estudo da estabilidade para avaliar a consistência do gel sobre um período de 2 meses foi conduzido mantendo a formulação em circunstâncias diferentes (4°C, 37°C e temperatura de ambiente) e medindo a viscosidade da formulação do gel em intervalos regulares. O estudo indicou que viscosidade, cor, sinérise e a consistência dos géis não mudaram significativamente durante todo o período da estabilidade nas circunstâncias especificadas.



Figura 11 - Géis Confeccionados no Laboratório de Farmacotécnica da UFC
Supervisão: Prof. Said G. C. Fonseca

4.5 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corpórea entre 150 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC e transferidas para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 6 animais por gaiola. Todos receberam água e alimentação *ad libitum* e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

O protocolo experimental sob Número de registro 10/05 foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sendo realizado de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Conselho da Sociedade de Psicologia Americana (1980) para o uso de animais experimentais.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC; no Laboratório de Anaeróbios, Setor de Microbiologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC; e, no Laboratório do Professor Fernando Cunha da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. As lamínas histológicas foram confeccionadas no laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da UFC.

4.6 Protocolo Experimental

4.6.1 Modelo de Doença Periodontal Experimental

Utilizou-se o modelo da Doença Periodontal Experimental (DPE), desenvolvido por vários autores (CRAWFORD et al., 1978; SAMEJIMA et al., 1990; KOIDE et al., 1995) e modificado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC (BEZERRA et al., 2000; LIMA et al., 2000). (Figura 12)

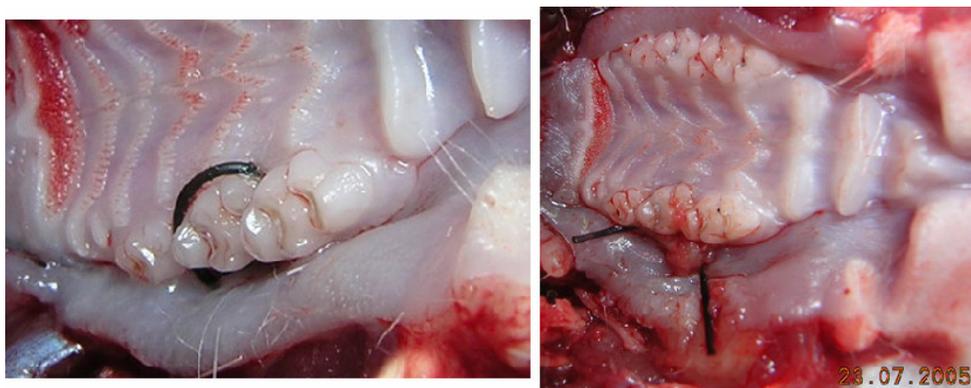
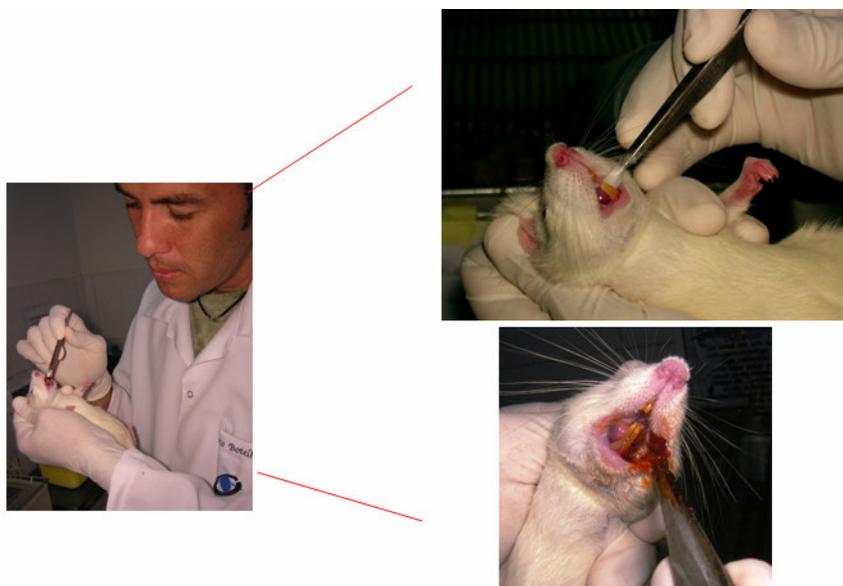


Figura 12 - Indução da Doença Periodontal Experimental (DPE).

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% w/v (400 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Procedeu-se à indução da Doença Periodontal Experimental (DPE)

através da inserção cirúrgica de um fio de sutura de náilon (3.0) ao redor do segundo molar superior esquerdo. Previamente à passagem do fio, utilizou-se uma guia nos espaços interproximais do dente supracitado, a fim de facilitar a colocação do fio. Este era adaptado de modo que o nó cirúrgico ficasse voltado para a face vestibular da boca do animal. Após 11 dias de aplicações com gel local (Figura 13), sacrificava-se o animal através de deslocamento cervical, sendo tal procedimento precedido por anestesia em câmara de éter.



Aplicação dos géis 3x ao dia

Figura 13 - Metodologia da aplicação do gel três vezes ao dia durante um minuto.

O dia escolhido para o sacrifício foi baseado em estudos prévios realizado no LAFICA, os quais constataram destruição total do processo alveolar e destruição importante do cimento no 11º dia de experimento (LIMA et al., 2000).

4.6.2 Grupos Experimentais

Foram utilizados duzentos e treze animais durante o decorrer desse estudo, os quais foram divididos nos diversos grupos experimentais a seguir:

Grupo normal (Naïve)

Esse grupo foi constituído por seis animais, que não foram submetidos à Doença Periodontal Experimental (DPE), a fim de verificar a existência de alguma alteração nos parâmetros analisados entre as duas hemiarcadas superiores.

Grupo DPE - Não Tratado (NT)

Esse grupo foi constituído por seis animais submetidos à doença periodontal experimental. Os animais não receberam qualquer tratamento após a cirurgia da indução da DPE, até o 11º dia, sendo, então, sacrificados.

Grupo DPE - gel veículo (V)

Esse grupo foi constituído por seis animais submetidos à doença periodontal experimental. Os animais receberam aplicações tópicas de gel veículo imediatamente após a cirurgia da indução da DPE, sendo realizadas aplicações tópicas de 1 min. na região gengival 3 vezes ao dia até o 11º dia, sendo, então, sacrificados.

Grupo DPE - Gel de Alecrim (GAI)

Esse grupo foi constituído por seis animais que receberam aplicações tópicas de gel de Alecrim na concentração de 0,5% v/w (de óleo essencial de Alecrim-pimenta), imediatamente após a cirurgia da indução da DPE, sendo realizadas aplicações tópicas de 1 min. na região gengival 3 vezes ao dia até o 11º dia, sendo, então, sacrificados.

Grupo DPE - Gel de Aroeira (GAR)

Esse grupo foi constituído por seis animais que receberam aplicações tópicas de gel de Aroeira na concentração de 5 % w/w de Extrato de Aroeira, imediatamente após a cirurgia da indução da DPE, sendo realizadas aplicações tópicas de 1 min. na região gengival 3 vezes ao dia até o 11º dia, sendo, então, sacrificados.

Grupo DPE - Gel de Alecrim + Aroeira (GAA)

Esse grupo foi constituído por seis animais que receberam aplicações tópicas de gel de Alecrim+Aroeira na concentração de 0,5% (de óleo essencial de Alecrim-pimenta) e 5 % de Extrato de Aroeira, imediatamente após a cirurgia da indução da DPE, sendo realizadas

aplicações tópicas de 1 min. na região gengival 3 vezes ao dia até o 11° dia, sendo, então, sacrificados.

Grupo DPE Gel de Carvacrol (GCa)

Esse grupo foi constituído por seis animais que receberam aplicações tópicas de gel de Carvacrol na concentração de 300µg/g, imediatamente após a cirurgia da indução da DPE, sendo realizadas aplicações tópicas de 1 min. na região gengival 3 vezes ao dia até o 11° dia, sendo, então, sacrificados.

Grupo DPE Gel de Chalconas (GCh)

Esse grupo foi constituído por seis animais que receberam aplicações tópicas de gel de Chalconas na concentração de 600µg/g, imediatamente após a cirurgia da indução da DPE, sendo realizadas aplicações tópicas de 1 min. na região gengival 3 vezes ao dia até o 11° dia, sendo, então, sacrificados.

Grupo DPE - Gel de Carvacrol + Chalconas (GCC)

Esse grupo foi constituído por seis animais que receberam aplicações tópicas de gel de Chalconas (600µg/g) + Carvacrol (300µg/g), imediatamente após a cirurgia da indução da DPE, sendo realizadas aplicações tópicas de 1 min. na região gengival 3 vezes ao dia até o 11° dia, sendo, então, sacrificados.

Grupo DPE - Gel de Doxiciclina (GDX)

Esse grupo foi constituído por 6 animais que receberam aplicações tópicas de gel de Doxiciclina na doses de 100 mg/g, imediatamente após a cirurgia da indução da DPE, sendo realizadas aplicações tópicas de 1 min. na região gengival 3 vezes ao dia até o 11° dia, sendo, então, sacrificados.

4.6.3 Parâmetros avaliados

4.6.3.1 Análise da Estrutura Óssea Alveolar

Para o estudo da estrutura óssea alveolar na doença periodontal experimental, foram realizadas análises morfométrica e histopatológica. As hemiarcadas contra-laterais, ou seja, sem doença periodontal foram utilizadas como controle.

4.6.3.2 Estudo Morfométrico do Tecido Ósseo na DPE

Os animais foram sacrificados no 11º dia após o procedimento cirúrgico. Suas maxilas foram removidas e fixadas no formol a 10% v/v, durante 24 horas. Após esse período, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas (direita e esquerda), dissecadas e coradas com azul de metileno a 1% w/v, a fim de distinguir o tecido ósseo dos dentes, os quais se coram com menos intensidade.

Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram acomodadas com massa de modelar em lâminas para posterior observação em microscópio óptico munido de ocular graduada (aumento de 4x). As medidas foram feitas em sete pontos diferentes, nas faces vestibulares dos três dentes molares: três no primeiro molar, visto que esse dente possui três raízes, denominadas mesial (m1), média (md) e distal (d1); dois pontos nos segundo (m2 e d2) e terceiro (m3 e d3) molares, respectivamente. As diferenças ou variações (Δ) foram obtidas a partir das medidas das hemiarcadas com DPE, subtraídas daquelas realizadas nas hemiarcadas contralaterais (controle) (SAMEJIMA et al., 1990). A soma das sete variações corresponde ao índice de perda óssea (IPO), expresso em mm (CRAWFORD et al., 1978) (Figura 14).

4.6.3.3 Índice de Perda Óssea

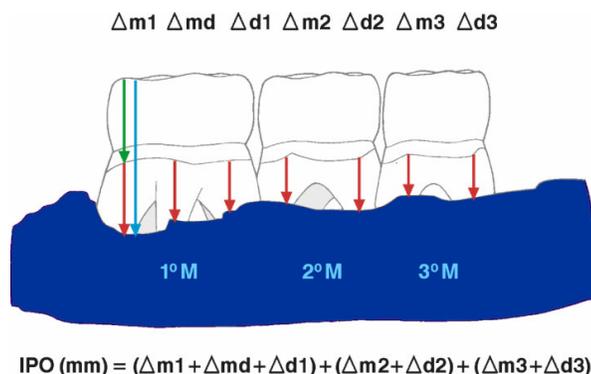


Figura 14 - Desenho esquemático das medidas da reabsorção óssea: as diferenças (setas vermelhas, Δ) foram obtidas a partir das medidas feitas nas hemiarcadas com DPE (seta azul), subtraídas daquelas realizadas nas hemiarcadas contra laterais (seta verde, controle). A soma das sete variações correspondeu ao índice de perda óssea (IPO), expresso em mm.

4.6.3.4 Análise histopatológica do osso alveolar

As análises histopatológicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada. Decorridos 11 dias após o procedimento cirúrgico (colocação do fio de náilon), os animais foram sacrificados e suas hemiarcadas, removidas. Estas foram fixadas em formol a 10% durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidas a tratamento com ácido nítrico a 7%, por aproximadamente 5 dias, para a desmineralização. A seguir, as hemiarcadas foram suspensas em sulfato de sódio a 5%, sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 5 μ m em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas pelos métodos HE.

Para a análise microscópica da hemiarcada com a coloração HE, foi considerada a região entre os 1º e 2º molares, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular, além do estado de preservação do processo alveolar e cimento. Tais achados foram classificados de acordo com os escores padronizados no Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer - LAFICA, citados a seguir:

- **Escore 0:** ausência ou apenas discreto infiltração celular (infiltração de células inflamatórias é esparsa e restrita a região marginal da gengiva).

- **Escore 1:** Infiltração celular moderada ausência ou apenas discreta infiltração celular (infiltração de células inflamatórias presentes em toda inserção gengival) pequena reabsorção do processo alveolar e cimento intacto.
- **Escore 2:** Infiltração celular acentuada (infiltração de células inflamatórias presentes tanto na gengiva como no ligamento periodontal) acentuada degradação do processo alveolar e destruição parcial do cimento.
- **Escore 3:** Infiltração celular acentuada (infiltração de células inflamatórias presentes tanto na gengiva como no ligamento periodontal) completa reabsorção do processo alveolar e intensa destruição do cimento. (LEITÃO et al., 2005)

4.6.3.5 Dosagem de Citocinas

Dosagem dos níveis de TNF- α e IL-1 β em gengiva de ratos submetidos à DPE

A produção de TNF- α e IL-1 β foram mensuradas através da determinação do conteúdo dessas citocinas no tecido gengival. Os tecidos foram colhidos estocados a -80°C para posterior homogeneização e coleta do sobrenadante para dosagem TNF- α , IL-1 β por ensaio imunoenzimático o qual obedeceu ao protocolo de ELISA descrito a seguir: (1) Incubação com 2 μ g/ml de anticorpo anti-TNF- α , anti IL-1 β (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8,2) - 100 μ l/poço (placa de 96 poços) por 16-24h a 4° C; (2) lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; (3) bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ l/poço por 2h à temperatura ambiente; (4) lavagem da placa (3x); (5) incubação com a curva padrão de TNF- α ou IL-1 β diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 μ l/poço por 16-24h à 4° C); (6) lavagem da placa (3x) (7) incubação com anticorpo biotilado (anticorpo de detecção) diluído 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1 h à temperatura ambiente; (8) lavagem da placa (3x); (9) incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ l/poço por 15 min à temperatura ambiente; (10) lavagem da placa (3x); (11) incubação com o-fenilenediamina diidrocloro (OPD) em tampão substrato, 100 μ l/poço, cobriu-se a placa e deixou-se no escuro por 5-20 min à temperatura ambiente; (12) a reação foi parada com 150 μ l/poço de H₂SO₄ 1M; (13) leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/ml como a curva padrão.

Dosagem de mieloperoxidase

A medida de MPO foi avaliada de acordo com o método de Kaplow descrito por Bradley et al. (1982). (Figura 15)

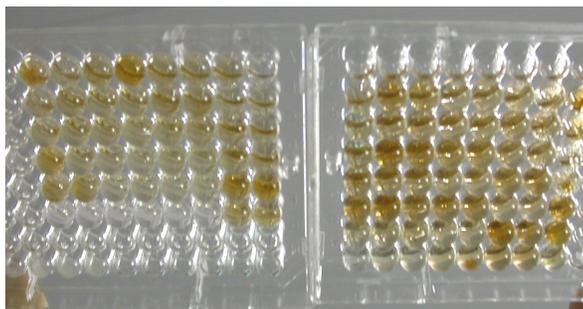


Figura 15 – Placa de análise da atividade de Mieloperoxidase no tecido periodontal.

Utilizou-se a gengiva da região de molares superiores para a dosagem de MPO. As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão de brometo de hexadecil-metil-amônio (HTAB). Neste momento, congelam-se as amostras. Em seguida, mais tampão HTAB é adicionado a fim de compor 400 μ l de tampão para 15 mg de tecido. Realiza-se nova homogeneização. Então, centrifugaram-se as amostras a 4.500 r.p.m. por 12 minutos. Terminada a centrifugação, 0,1 mL do sobrenadante é removido e a este é adicionado 2 mL da solução de o-dianosidina, tampão fosfato de sódio, peróxido de hidrogênio e água destilada. Esta mistura é colocada em um espectrofotômetro a fim de medir a absorbância em 460 nm nos tempos 0, 30 segundos, 1,3 e 5 minutos. Uma unidade de MPO equivale a uma mudança na absorbância de $1,13 \times 10^{-2}$ nm. Com os tempos acima descritos, foi feita uma curva e foi escolhido o tempo 1 minuto como mais representativo do evento.

4.6.3.6 Análise microbiológica

Realizou-se a análise microbiológica de animais normais (grupo *Naïve*) e de animais que foram submetidos à DPE e não foram tratados (NT), os que receberam gel veículo (V), gel de alecrim 0,5% (GAI), gel de Aroeira 5% (GAR), gel de Alecrim e Aroeira (0,5% e 5% mg/g - grupo GAA), gel de Carvacrol 300 μ g/g (GCa), gel de Chalconas 600 μ g/g (GCh), Carvacrol + Chalconas (300 e 600 μ g/g grupo GCC) e gel de Doxiciclina 10% (GDX). Após o sacrifício dos animais, a gengiva da região de molares superiores esquerdos

foi coletada, colocada assepticamente em 0,3 mL em meio de cultura líquido (BHI/DIFCO) e transportada imediatamente para o setor de Microbiologia.

O fragmento coletado foi colocado em placa estéril e com lâmina de bisturi estéril triturou-se o tecido. A amostra foi semeada com alça bacteriológica de Drigalsky em meio de cultura sólido (ágar sangue), as quais foram incubadas em jarras (OXOID) para obtenção da atmosfera de microaerofilia por 24hs a 37°C. Com a finalidade de verificar a ação inibitória do carvacrol sobre as bactérias da doença periodontal, foram isolados Estreptococos de pacientes com periodontite avançada, em seguida, foram realizados testes do contato direto por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura, a qual foi feita por inspeção visual, comparando os halos de inibição, tendo a Vancomicina como controle positivo (Figura 17).

4.6.3.7 Análise da variação da massa corpórea

Todos os animais tiveram a sua massa corpórea medida antes da cirurgia e nos 11 dias subseqüentes a esta (período experimental). Os valores encontrados foram expressos como a variação da porcentagem da massa corpórea (g) em relação à massa inicial.

4.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Para comparações entre os grupos foram utilizados: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni.

Nas análises histopatológicas, os dados obtidos foram expressos como mediana e o teste estatístico aplicado foi o de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância de pelo menos $p < 0,05$.

Na avaliação microbiológica das substâncias testadas, os resultados expressam os halos de inibição, concentração inibitória mínima (MIC), concentração bactericida mínima (MBC) e fungicida (MFC) de cada substância sobre as espécies de microrganismos testados, não havendo a necessidade de comparações matemáticas para se notar as diferenças existentes.

5 RESULTADOS

Para a verificação da atividade antimicrobiana do óleo essencial do Alecrim pimenta vários testes foram realizados.

Na figura 16 observa-se o cromatograma do óleo essencial de alecrim pimenta com as respectivas dosagens de seus componentes principais ilustrados na figura 8.

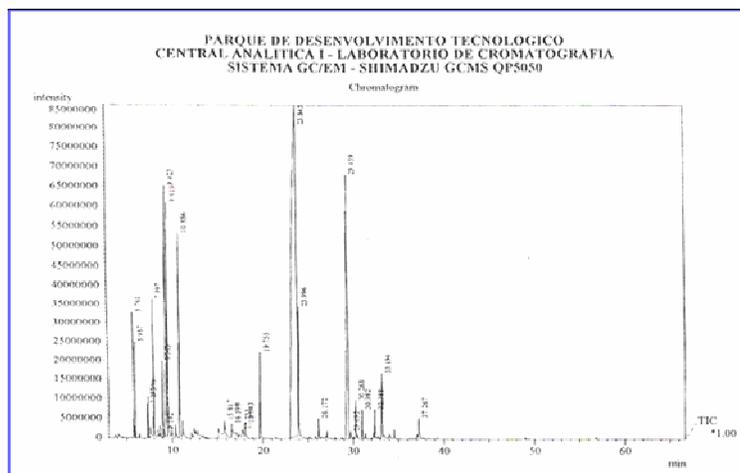


Figura 16 - Cromatograma dos elementos do óleo Essencial do Alecrim Pimenta.

5.1 Teste do Contato Direto (Difusão em ágar)

A composição química do óleo essencial pela análise de GC-MS permitiu a identificação de componentes do óleo (tabela 2). Os compostos principais identificados foram: timol (56,7%) e carvacrol (16,7%) (figura 8). Os outros compostos foram identificados como: *p*-cimeno (7,1%), α -terpineno (1,1%), β -mirceno (0,82%) 1,8-cineol (2,39%) e outros compostos (5,16%).

Na Tabela 1 observa-se a composição do óleo essencial testado com suas respectivas concentrações.

Tabela 1 - Composição Química do Óleo essencial de *Lippia sidoides*

Componentes ^a	Tr ^b	Concentração (%)
Timol	23,84	56,67
Carvacrol	29,45	16,73
<i>p</i> -cimeno	9,42	7,13
Timol metil-éter	9,61	5,06
Aromadendreno	10,88	2,79
1.8-cineol	23,99	2,39
Gama-elemeno	7,99	2,28
Gama-terpineno	19,75	1,42
α -terpineno	5,76	1,12
β -mirceno	5,95	0,86
α -tujeno	30,26	0,78
Octeno-3-ol	7,37	0,51

^a Compostos listados em ordem de eluição na coluna DB-1.

^b Tr: Tempo de retenção (min).

5.2 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Na figura 17A observam-se os halos de inibição do gel de carvacrol em várias diluições frente aos *S.mutans* medidos após 24 horas de incubação em microaerofilia. A figura 17B mostra o aspecto de placas de Ágar Muller-Hinton com as micro diluições do carvacrol frente a *C.albicans*, após 24 horas de incubação, os resultados estão expressos na tabela 2.



A



B

Figura 17A e 17B - Placas petri apresentando os halos de inibição do carvacrol em relação aos *S.mutans* (A) e *C.albicans* (B).

A atividade antibacteriana do OELS e dos compostos fenólicos (timol e carvacrol) foi avaliada inicialmente pelo método da difusão em ágar (teste do contato direto), usando quatro cepas de bactérias cariogênicas (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius* e *S. mitis*) e uma *Candida albicans*. Os três compostos exibiram atividade antibacteriana e antifúngica relativamente forte. Os resultados obtidos no ensaio da difusão do disco em zonas da inibição do crescimento dos micróbios testados são mostrados na tabela 2. As zonas de inibição de OELS e dos compostos fenólicos (timol e carvacrol) apresentaram a dependência da concentração de cada amostra, para todas as cepas testadas.

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana expressa pela medida da zona de inibição em milímetros do óleo essencial de *Lippia sidoides*, timol e carvacrol pelo método de difusão em ágar (NCCLS, 1998).

Microorganismos		<i>S.mutans</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.salivarius</i>	<i>S.sanguis</i>	<i>C.albicans</i>
Amostra	mg/mL	Zona de Inibição (mm) *				
OELS	217,5	18,7	10	8,5	12	34
Timol	50	7,8	15	7,7	16	10,6
Carvacrol	50	8,0	13	7,5	15	9
Vancomicina	3	20	17	22,7	16	-
Cetoconazol	5	-	-	-	-	27,2
DMSO 2%		0	0	0	0	0

Volume da amostra aplicada em cada disco: 10µL.

Diâmetro do Disco = 6 mm.

* valores de média foram calculados pela inibição da zona de crescimento para três replicatas.

-: teste não executado nesta concentração.

0: Sem zona de inibição de crescimento.

Os dados obtidos do método da difusão do disco para o Óleo Essencial de *Lippia sidoides* (OELS) indicaram que a *C.albicans* foi o microorganismo mais sensível com a zona maior da inibição (34 milímetros), seguida por *Streptococcus mutans* (18,7mm) e por *Streptococcus sanguis* (12 milímetros) (tabela 2). As zonas da inibição para as bactérias cariogênicas variaram entre (8,5-18,7 milímetros) para OELS, (7,7-16 milímetros) para o timol e (7,5-15 milímetros) para o carvacrol.

A zona da inibição para *C.albicans* variou entre 10.6 milímetros e 9 milímetros para o timol e o carvacrol respectivamente. O OELS não foi eficaz em inibir o crescimento bacteriano ou fúngico na mesma concentração dos monoterpenos fenólicos (4x mais diluídos).

5.3 Atividade Antimicrobiana (*in vitro*) MIC e MBC

Os resultados deste ensaio são esboçados na tabela 3 e 4. Embora o resultado de MICs e de MBCs variasse entre organismos do teste, na maioria dos casos o MIC era próximo do MBC, indicando uma ação antibacteriana considerável dos monoterpenos fenólicos. O timol e o carvacrol puros, foram mais ativos com (MIC=2,5 – 5,0 mg/mL), do que o OELS (MIC = 5,0 - 10mg/mL), mostrando valores significativos de encontro às bactérias cariogênicas.No que concerne à atividade fungistática, o timol e o carvacrol foram outra vez mais ativos do que o óleo essencial com MIC = 0,625 – 1,25 mg/mL e o mg/mL de OELS MIC = 2,5 (tabelas 3 e 4).

Nas Tabelas 3 e 4 expressam a atividade antimicrobiana de cada substância testada (óleo essencial de *Lippia sidoides*, timol e carvacrol) como Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) e Concentração Bactericida Mínima do contra as quatro cepas cariogênicas (NCCLS, 2000) bem como para *C. albicans*.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana expressa como Concentração Inibitória Mínima (MIC) (mg/mL) e Concentração Bactericida Mínima do óleo essencial de *Lippia sidoides*, timol e carvacrol contra bactérias cariogênicas (NCCLS, 2000).

	OELS		Timol		Carvacrol		Vancomicina	
<i>Microorganismos</i>	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. mutans</i>	5,0	20,0	5,0	10,0	2,5	5,0	0,0023	0,018
<i>S. mitis</i>	10,0	40,0	5,0	10,0	2,5	5,0	0,037	0,075
<i>S. sanguis</i>	10,0	40,0	5,0	10,0	2,5	5,0	0,037	0,075
<i>S. salivarius</i>	10,0	40,0	5,0	10,0	2,5	5,0	0,037	0,075

MIC = Concentração Inibitória Mínima

MBC = Concentração Bactericida Mínima

Tabela 4 - Atividade Antimicrobiana expressa como Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) e Concentração Bactericida Mínima (mg/mL) do óleo essencial de *Lippia sidoides*, timol e carvacrol contra *C.albicans* (NCCLS, 2000)

	OELS		Timol		Carvacrol		Cetaconazol	
<i>Microorganismo</i>	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i>	2,5	5,0	0,625	5,0	1,25	2,5	0,0037	0,0075

MIC = Concentração Inibitória Mínima

MFC = Concentração Fungicida Mínima

5.4 Efeito do gel de Alecrim (GAI) , gel de Aroeira (GAR) ou a combinação de ambos (GAA) na DPE induzida em ratos

5.4.1 Efeito do gel (GAA) sobre o índice de perda óssea na DPE

5.4.1.1 Estudo do Índice de Perda Óssea (IPO)

A indução da DPE nos animais não tratados (NT) assim como naqueles que receberam apenas gel veículo (V) resultou em reabsorção óssea significativa quando comparado aos animais sem DPE, cujo IPO foi próximo de zero bem como naqueles que receberam tratamento com gel de alecrim+aroeira (GAA) que quando comparados entre si, não alcançam uma significância estatística. (Figura 18). Foi possível constatar que o gel combinado de alecrim e aroeira aplicado localmente na região gengival imediatamente após a indução da DPE e diariamente até o 11º dia reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o IPO, representado pela redução na reabsorção óssea na face vestibular das maxilas.

5.4.1.2 Aspecto macroscópico do periodonto

Observou-se a partir da avaliação macroscópica da hemiarcada superior esquerda do grupo de animais submetidos à DPE que tanto os Não-Tratados quanto os que receberam gel veículo (Figura 19b), que a permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a doença periodontal experimentalmente, de forma a reproduzir os principais sinais clínicos da doença periodontal em humanos, tais como: reabsorção óssea alveolar e perda de contato interdental,

em comparação aos animais normais, sem DPE (Figura 19a). Foi observada redução da perda óssea no grupo tratado com o gel de alecrim e aroeira (GAA) (Figura 19d).

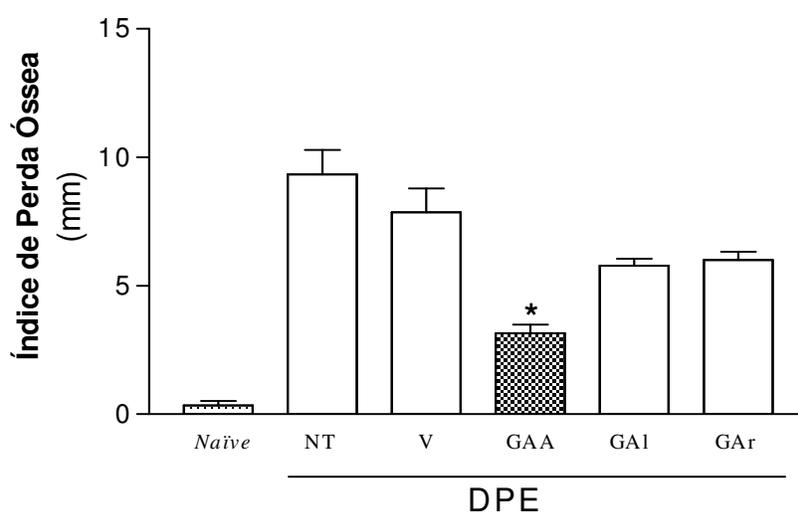


Figura 18 - Efeito do gel de Alecrim (GAI) e/ou Aroeira (GAr) no índice de perda óssea alveolar na doença periodontal experimental (DPE) em ratos: Gel veículo (V), gel de Alecrim (GAI), gel de Aroeira (GAr) ou a combinação do gel de Alecrim e Aroeira (GAA) foi administrada de forma tópica, diariamente, nos animais submetidos à indução de DPE. A DPE também foi induzida nos animais não tratados (NT). O grupo Naive não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. As barras representam a média \pm o erro padrão de média do índice de perda óssea (milímetro; N=6). O asterisco indica a diferença estatística significativa entre o grupo tratado e o grupo veículo e NT (* $P < 0,01$; Bonferroni, ANOVA).

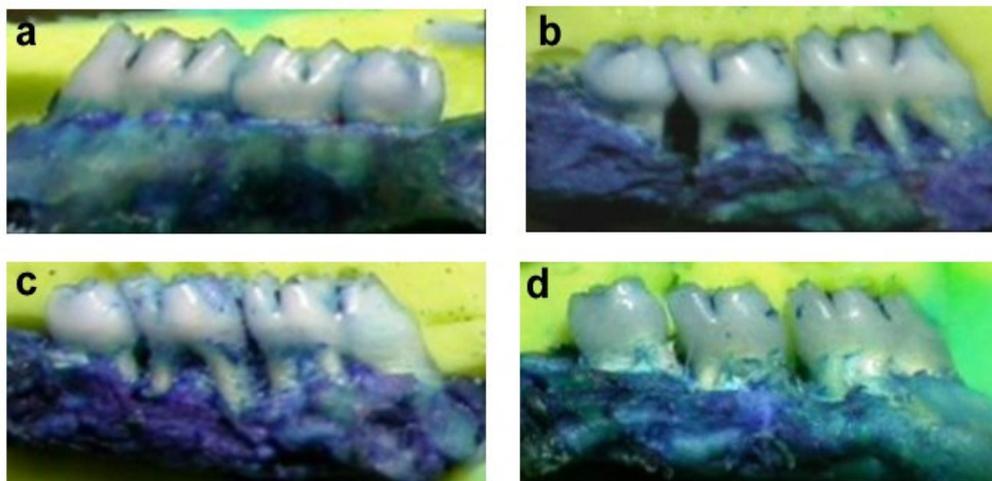


Figura 19 - Aspecto macroscópico de maxilas de ratos normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com gel veículo ou gel de alecrim + aroeira (GAA). Os animais foram submetidos à indução da DPE e receberam de forma tópica gel veículo (V) ou gel de alecrim (0,5%) + aroeira (5%) (GAA), imediatamente após a cirurgia da indução da DPE. Os animais foram sacrificados no 11º dia e suas maxilas foram removidas e fixadas em formol a 10%. Em seguida, as hemiarcadas foram separadas, dissecadas, coradas em azul de metileno a 1% e acomodadas em massa de modelar para posterior observação em microscópio com ocular graduada. **a:** Maxila de animal normal que não foi submetido à DPE. **b:** Maxila de animal com DPE, no qual foi aplicado gel veículo, mostrando intensa destruição óssea alveolar, exposição das raízes e perda do contato interdentário. **c:** Maxila de animal que foi submetido à DPE e não recebeu tratamento apresentando intensa reabsorção do osso alveolar. **d:** Maxila de animal com DPE que recebeu aplicação tópica com gel GAA com redução significativa na reabsorção do osso.

5.4.2 Efeito do gel (GAA) sobre as alterações histopatológicas

A análise histopatológica realizada no 11º dia das maxilas dos ratos submetidos à DPE de animais não-tratados bem como aqueles que receberam gel veículo (Figura 20 B; C), mostraram presença de infiltrado celular inflamatório acentuado, reabsorção completa do processo alveolar e destruição parcial do cemento em relação ao grupo de animais normais, sem a doença (Figura 20A). Nos animais tratados com GAA imediatamente após a cirurgia (Figura 20D) observou-se preservação do processo alveolar e do cemento, com discreto infiltrado inflamatório.

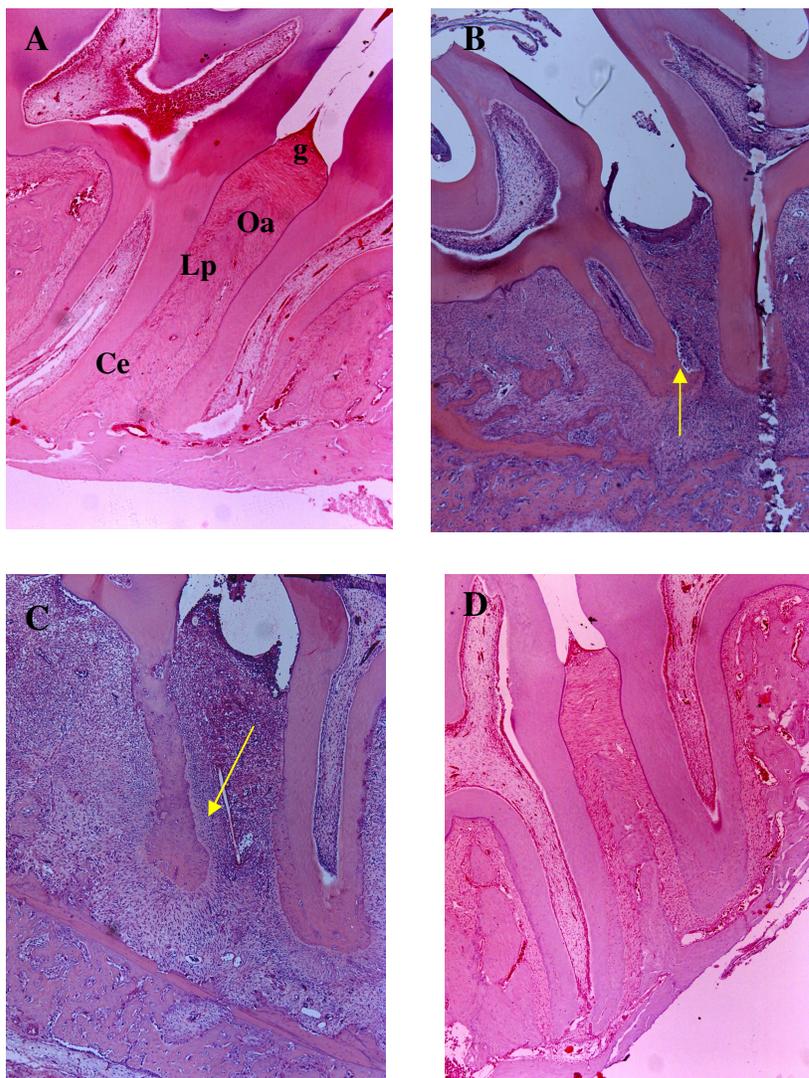


Figura 20 - Aspectos histopatológicos do efeito do gel de Alecrim + Aroeira (GAA) na (DPE): A figura 20A - Aspecto microscópico de um periodonto normal da maxila do rato que mostra a gengiva (g), ligamento periodontal (lp), cimento (ce), osso alveolar (oa); **figura 20B** - Periodonto do rato submetido à DPE sem nenhum tratamento apresentando um intenso infiltrado inflamatório na gengiva e no ligamento periodontal, com parcial destruição do cimento e reabsorção total do processo alveolar; **figura 20C** - Periodonto do rato submetido à DPE e tratado com o gel veículo o qual mostra alterações similares aos ratos não tratados; **A figura 20D** -Periodonto do rato submetido à DPE e tratado com o gel GAA o qual mostra a ausência de infiltrado inflamatório na gengiva e preservação do cimento e do osso alveolar (processados para coloração pelo método HE; ampliação 40x).

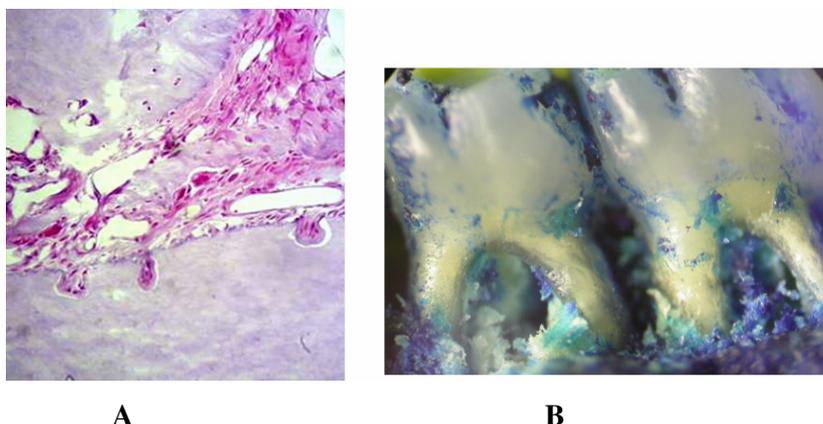


Figura 21 - Detalhes de reabsorção óssea (A) e de reabsorção óssea na região da raiz dentária (B).

Tabela dos escores histopatológicos

A tabela 5 representa os escores atribuídos à análise histopatológica das maxilas referente à figura 20. A partir dos cortes seriados das hemiarcadas, observou-se que o tratamento com GAA, reduziu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) as alterações histopatológicas vistas na DPE, quando comparada às observadas em animais que não receberam tratamento (NT) assim como naqueles que receberam apenas gel veículo (V).

Tabela 5 - Análise histopatológica do efeito do gel de Alecrim (GAl), gel de Aroeira (GAr) ou de sua associação (GAA) na DPE

Grupos	<i>Naïve</i>	NT	Veículo	GAA	GAl	GAr
Escores	0(0-0)	3 (3-3)*	3(2-3)*	0 (0-1) #	1 (1-1)	1 (1-1)

* $P < 0,05$ comparado aos animais do grupo *Naïve* (Kruskal-Wallis)

$P < 0,05$ comparado aos animais do grupo Veículo (Kruskal-Wallis)

Os dados representam a mediana e variação de pelo menos 5 animais, onde as regiões entre os 1° e 2° molares foram consideradas para análise dos seguintes parâmetros: presença de infiltrado celular e grau de preservação do processo alveolar e cemento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas gel veículo (Kruskal-Wallis).

5.4.3 Efeito do gel (GAA) sobre os níveis de TNF- α e IL-1 β na DPE

Os ratos, pertencentes ao grupo com DPE não-tratados e aqueles que receberam apenas gel veículo, apresentaram um considerável aumento dos níveis de ambas as citocinas (Figura 22) em relação ao grupo normal sem doença. A associação do gel de alecrim+aroeira (GAA) foi capaz de reduzir de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) os níveis de ambas as citocinas quando comparado ao grupo não-tratado assim como com o grupo tratado com gel veículo (V).

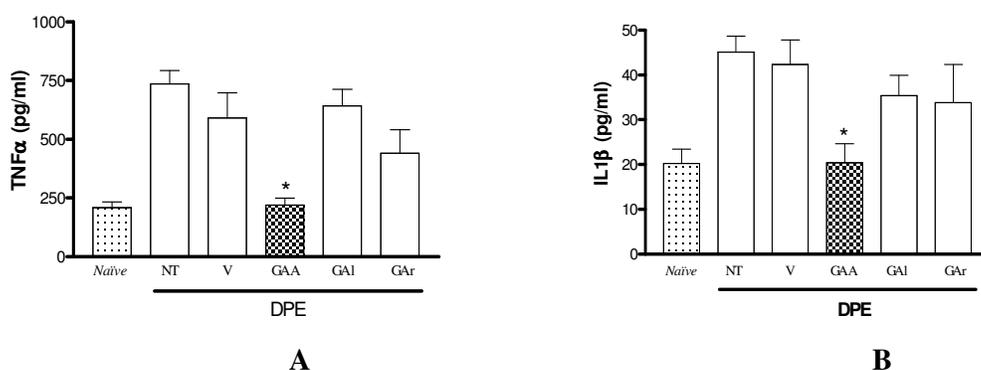


Figura 22 - Efeito do gel de Alecrim + Aroeira (GAA), gel de Alecrim (GAl) e gel de Aroeira (GAr) na produção de TNF - α e interleucina-1 β na gengiva de ratos submetidos à doença periodontal experimental (DPE): Os géis veículo (V), CAA, GAl e GAr foram administrados de forma tópica na região gengival nos animais submetidos à DPE. O grupo não-tratados (NT) foi submetido a DPE mas não recebeu tratamento . O grupo de *Naive* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. Após 11 dias, os animais foram sacrificados e a gengiva da região molar superior esquerda foi removida e as concentrações de TNF - α (A) e interleucina-1 β (B) no sobrenadante do homogenato foi determinado por ELISA. Os resultados são relatados como média \pm erro padrão da média da concentração das citocinas em pg/ml de seis poços (um por animal) e o asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e o grupo do Não-Tratado (* $P < 0,05$; teste de Bonferroni, ANOVA).

5.4.4 Efeito do gel (GAA) sobre a dosagem de mieloperoxidase

Efeito do gel de alecrim e aroeira (GAA) sobre a atividade da mieloperoxidase no tecido gengival de ratos após 6 horas da indução da DPE

Em animais submetidos à DPE não-tratados (NT) assim como aqueles que receberam gel veículo (V), foi possível determinar um aumento significativo da MPO na gengiva 6 horas após a cirurgia ($p < 0,01$) em relação a animais sem a doença (Figura 23). No grupo de animais submetidos à DPE e tratados com GAA, ocorreu uma diminuição significativa na atividade de MPO na gengiva destes animais em relação aos animais com DPE não-tratados (NT) e que receberam gel veículo (V). Contudo, os géis de alecrim e aroeira aplicados de forma isoladamente não foram capazes de inibir a atividade da enzima.

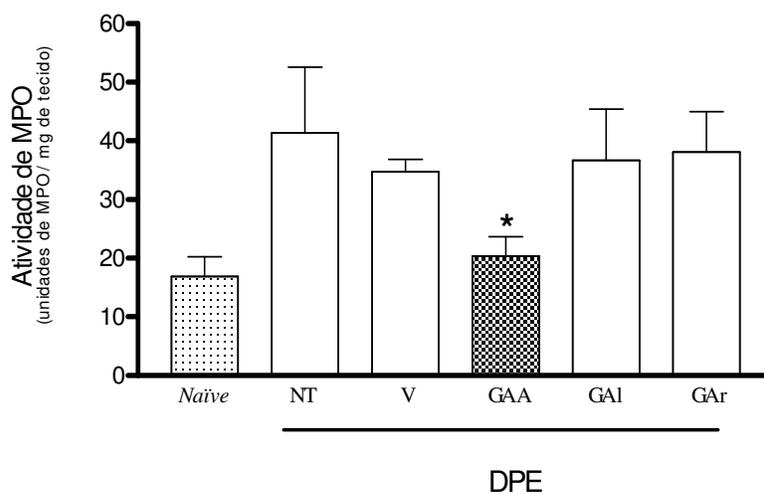


Figura 23 - O efeito do GAA, gel de Alecrim (GAl) e Aroeira (GAr) na atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival das maxilas de ratos submetidos à DPE: Os géis veículo (V), GAA, GAl e GAr foram administrados de forma tópica na região gengival dos animais submetidos à indução de DPE. O grupo não-tratados (NT) foi submetido a DPE mas não recebeu tratamento. O grupo *Naïve* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. As barras representam a média \pm o erro padrão de média da atividade de MPO/mg do tecido. * $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significante quando comparado ao grupo veículo e não tratado (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Efeito do gel de Alecrim (GAl), gel de Aroeira (GAR) e gel de Alecrim+Aroeira (GAA) sobre as alterações de microrganismos em ratos submetidos à DPE

5.4.5 Efeito do gel (GAA) sobre a flora microbiana na DPE

Os géis de alecrim, aroeira e o gel de alecrim+ aroeira foram capazes de inibir o crescimento de bactérias (Unidades Formadoras de Colônias) após semeadura do tecido gengival homogeneizado em placas petri com Ágar sangue (Figuras 24 e 25).

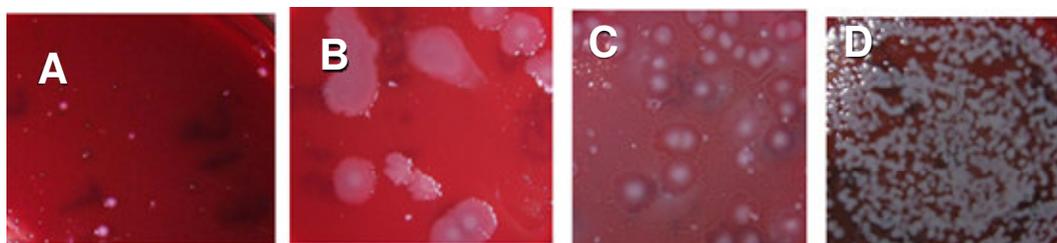


Figura 24 - Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias em Ágar sangue. **A**= (Gel de Alecrim - GAl) **B**= (Gel de Aroeira - GAR); **C**= (V) **D**= (NT)

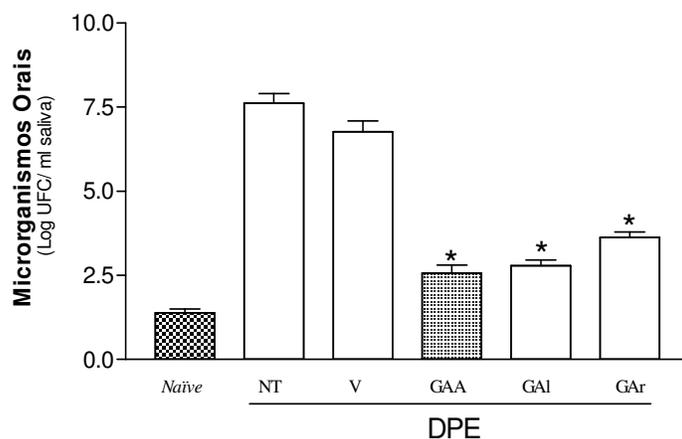


Figura 25 - Efeito antibacteriano do gel de Alecrim (GAI), gel de Aroeira (GAR) e gel de Alecrim+Aroeira (GAA) nos microrganismos envolvidos na DPE em ratos. Os géis veículo (V), CAA, GAI e GAR foram administrados de forma tópica na região gengival dos animais submetidos à DPE. O grupo não-tratados (NT) foi submetido a DPE mas não recebeu tratamento. O grupo *Naïve* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. Os resultados são relatados como médias \pm o erro padrão da média das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas após a semeadura do tecido gengival homogeneizado do tecido dos ratos submetidos à DPE em placa petri (Meio de cultura de Ágar sangue). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e grupo veículo e NT (* $P < 0,05$; teste de Bonferroni, ANOVA).

5.4.6 Efeito do gel (GAA) sobre a variação da massa corpórea na DPE

Os géis de alecrim, aroeira e o gel de alecrim+aroeira foram capazes de promover um aumento da porcentagem da massa corpórea quando comparados aos animais do grupo não-tratado (NT) e gel veículo (V) (Figura 26).

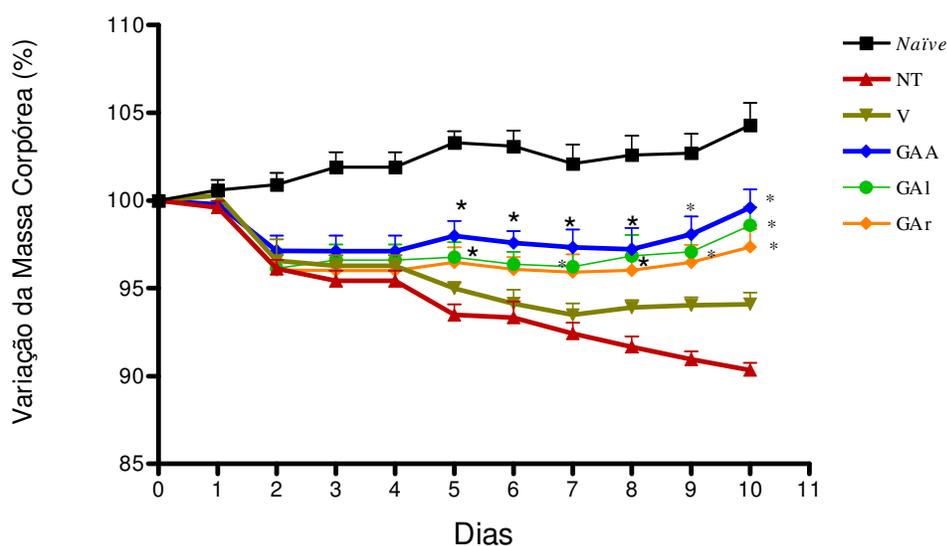


Figura 26 - O efeito do GAA, gel de Alecrim (GAl) e Aroeira (GAr) na variação da massa corpórea de ratos submetidos à DPE. O gel veículo (V), o gel de Alecrim (GAl), o gel de Aroeira (GAr) ou a combinação de ambos Alecrim + Aroeira (GAA) foram administrados de forma tópica na região gengival dos animais submetidos à DPE. O grupo não-tratados (NT) foi submetido à DPE mas não recebeu tratamento. O grupo *Naive* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média (EPM) (N=6) do peso (g) medido a cada dia antes e depois da indução da DPE até o 11º dia. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados com géis naturais, o grupo veículo (V) e Não-Tratado (NT) (* $p < 0,05$; ANOVA teste de Bonferroni)

5.5 Efeito do gel de Carvacrol (300µg/g), Chalconas (600 µg/g) e a combinação de ambos (GCC) na DPE induzida em ratos

5.5.1 Efeito do gel (GCC) sobre o índice de perda óssea na DPE

A indução da DPE nos animais que receberam apenas gel veículo resultou em reabsorção óssea significativa em relação aos animais sem DPE, cujo IPO foi próximo de zero. Observou-se que o gel combinado de Carvacrol e Chalconas aplicado localmente a partir do 1º dia da indução da DPE e diariamente até o 11º dia (3x dia/ 1') reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o IPO, representado pela redução na reabsorção óssea na face vestibular das maxilas em 65,26% em relação ao grupo de animais que receberam gel veículo. Este efeito é comparável ao do gel de Doxíciclina aplicado da mesma forma (69,48%) (Figura 27).

Aspecto macroscópico da doença periodontal experimental

Observou-se a partir da avaliação macroscópica da hemiarcada superior esquerda do grupo de animais submetidos à DPE e que não foram tratados (Figura 28b), que a permanência do fio de náilon foi capaz de induzir a doença periodontal experimentalmente, de forma a reproduzir os principais sinais clínicos da doença periodontal em humanos, tais como: reabsorção óssea alveolar e perda de contato interdental, em comparação aos animais normais, sem DPE (Figura 28a). Foi observada redução da perda óssea tanto no grupo tratado com o gel de carvacrol e chalconas (GCC 3x ao dia - 1') (Figura 28d), em relação ao grupo de animais com DPE que receberam gel veículo (Figura 28c). A diminuição do IPO promovida pelo GCC também foi semelhante à observada nos animais após a aplicação do gel de Doxíciclina.

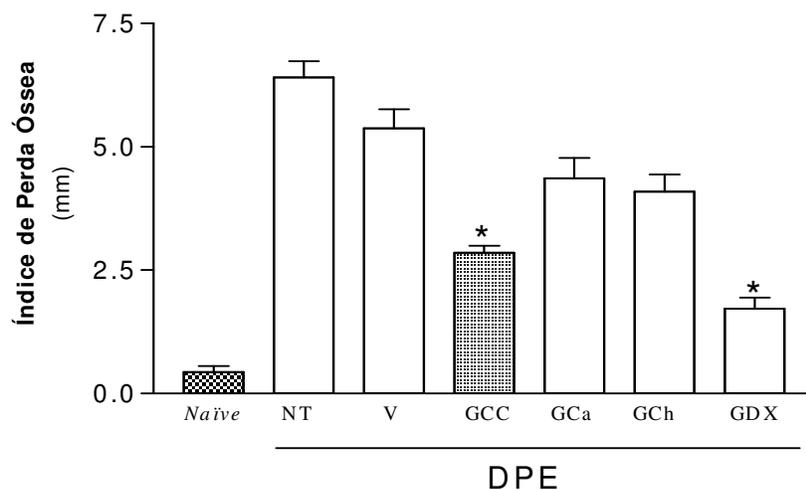


Figura 27 - Efeito do gel de Carvacrol (GCa) e/ou Chalconas (GCh) no índice de perda óssea alveolar na (DPE) em ratos: Gel veículo (V), gel de Carvacrol (GCa), gel de Chalconas (GCh), a combinação de ambos o gel de Carvacrol + Chalconas (GCC) ou o gel de doxiciclina (GDX) foi administrado de forma tópica, diariamente, nos animais submetidos à indução de DPE. A DPE também foi induzida nos animais não tratados (NT). O grupo *Naive* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. As barras representam a média \pm o erro padrão de média do índice de perda óssea (milímetro; N=6). O asterisco indica a diferença estatística significativa entre o grupo tratado e o grupo veículo e NT (* $P < 0,01$; Bonferroni, ANOVA).

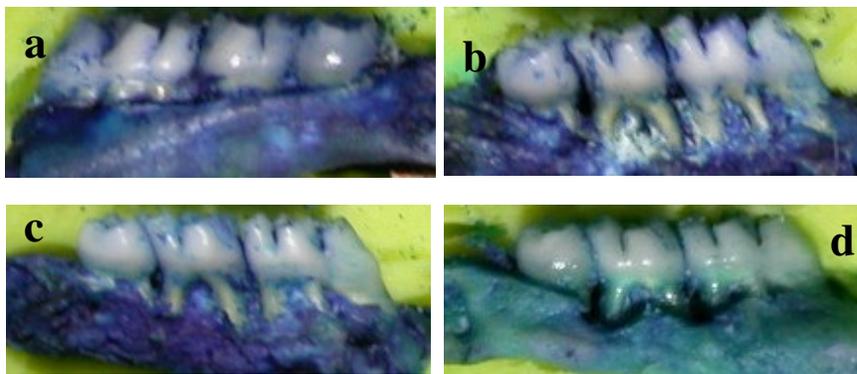


Figura 28 - Aspecto macroscópico de maxilas de ratos normais ou de animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE) tratados com gel veículo ou gel de carvacrol + chalconas (GCC). Os animais foram submetidos à indução da DPE e receberam de forma tópica gel veículo (V) ou gel de carvacrol (300 μ g/g) + chalconas (600 μ g/g) (GCC), imediatamente após a cirurgia da indução da DPE. Os animais foram sacrificados no 11^o dia e suas maxilas foram removidas e fixadas em formol a 10%. Em seguida, as hemiarcadas foram separadas, dissecadas, coradas em azul de metileno a 1% e acomodadas em massa de modelar para posterior observação em microscópio com ocular graduada. a: Maxila de animal normal que não foi submetido à DPE. b: Maxila de animal com DPE, no qual foi aplicado gel veículo, mostrando intensa destruição óssea alveolar, exposição das raízes e perda do contato interdentário. c: Maxila de animal que foi submetido à DPE e não recebeu tratamento apresentando intensa reabsorção do osso alveolar. d: Maxila de animal com DPE que recebeu aplicação tópica com gel GCC com redução significativa na reabsorção do osso.

5.5.2 Efeito do gel (GCC) sobre as alterações histopatológicas na DPE

A análise histopatológica realizada no 11^o dia das maxilas dos ratos submetidos à DPE de animais não-tratados bem como aqueles que receberam gel veículo (Figuras 29B;C), mostraram presença de infiltrado celular inflamatório acentuado, reabsorção completa do processo alveolar e destruição parcial do cimento em relação ao grupo de animais normais, sem a doença (Figura 29A). Nos animais tratados com GCC imediatamente após a cirurgia (Figura 29D) observou-se preservação do processo alveolar e do cimento, com discreto infiltrado inflamatório.

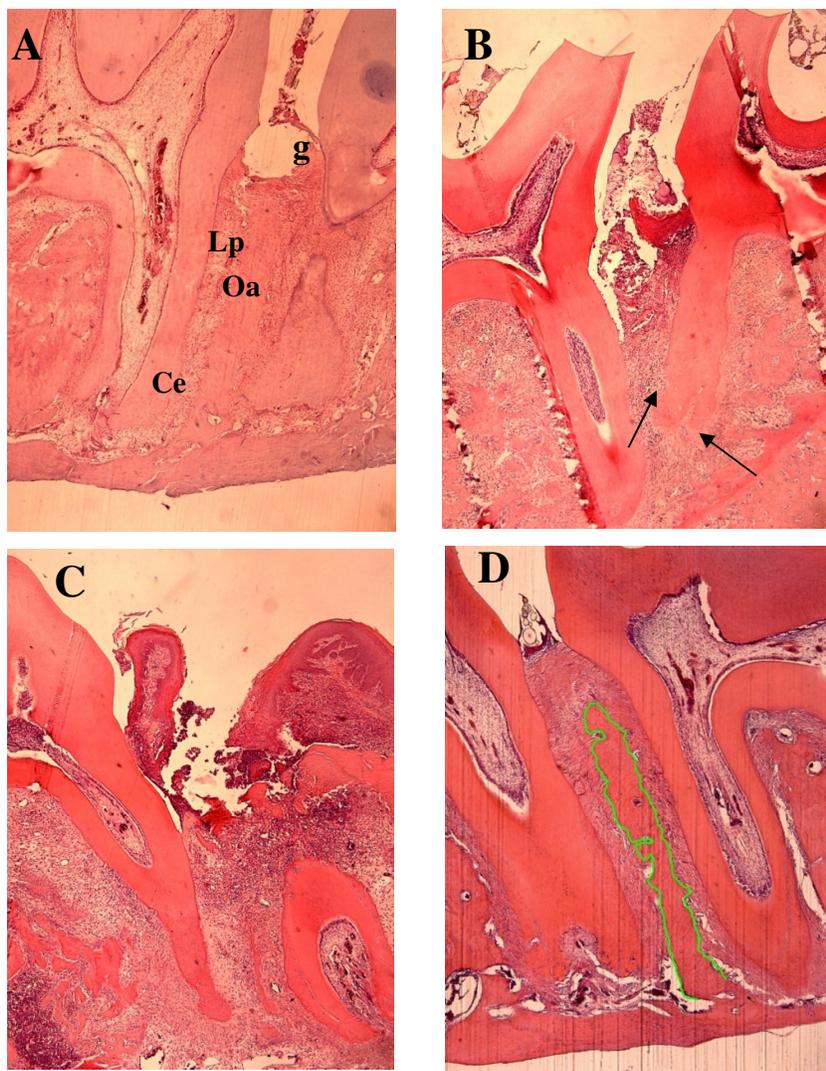


Figura 29 - Aspectos histopatológicos do efeito do gel de carvacrol+ chalconas (GCC) na (DPE): A figura 29A - Aspecto microscópico de um periodonto normal da maxila do rato que mostra a gengiva (g), ligamento periodontal (Lp), cemento (Ce), osso alveolar (Oa); figura 29B - Periodonto do rato submetido à DPE sem nenhum tratamento apresentando um intenso infiltrado inflamatório na gengiva e no ligamento periodontal, com parcial destruição do cemento e reabsorção total do processo alveolar; figura 29C - Periodonto do rato submetido à DPE e tratado com o gel veículo o qual mostra alterações similares aos ratos não tratados; A figura 29D - Periodonto do rato submetido à DPE e tratado com o gel GCC o qual mostra a ausência de infiltrado inflamatório na gengiva e preservação do cemento e do osso alveolar (processados para coloração pelo método HE; ampliação 40x).

Tabela dos escores histopatológicos

A tabela 6 representa os escores atribuídos à análise histopatológica das maxilas referente à figura 29. Os animais receberam gel veículo, GCC, Gal, GCh, GDX (10%) imediatamente após a cirurgia da indução da DPE (curativo) e foram sacrificados no 11º dia. A partir dos cortes seriados das hemiarcadas, observou-se que os tratamentos com GCC, GDX (10%) reduziram de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) as alterações histopatológicas vistas na DPE, quando comparada às observadas em animais que receberam apenas gel veículo.

Tabela 6 - Efeito do gel de Carvacrol + Chalconas (GCC) sobre as alterações histopatológicas observadas na doença periodontal experimental (DPE) em ratos

Grupos	<i>Naïve</i>	NT	V	GCC	GCa	GCh	GDX
Escores	0 (0-0)	3(3-3)*	3 (2-3)*	0 (0-1) #	1 (1-1)	1 (1-1)	0(0-0) #

* $P < 0.05$ comparado aos animais do grupo *Naïve* (Kruskal-Wallis)

$P < 0.05$ comparado aos animais do grupo Veículo (Kruskal-Wallis)

Os dados representam a mediana e variação de pelo menos 5 animais, onde as regiões entre os 1º e 2º molares foram consideradas para análise dos seguintes parâmetros: presença de infiltrado celular e grau de preservação do processo alveolar e cemento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo que recebeu apenas gel veículo (Kruskal-Wallis).

Efeito do gel de alecrim e aroeira (GAA) sobre a atividade da mieloperoxidase em ratos após 6 horas da indução da DPE

5.5.3 Efeito do gel (GCC) sobre a dosagem de mieloperoxidase

Em animais submetidos à DPE não-tratados (NT) e aqueles que receberam gel veículo (V), foi possível determinar um aumento significativo da MPO na gengiva 6 horas após a cirurgia ($p < 0,01$) em relação a animais sem a doença (Figura 14). No grupo de animais submetidos à DPE e tratados com GCC, ocorreu uma diminuição significativa na atividade de MPO na gengiva destes animais em relação aos animais com DPE não-tratados (NT) e aqueles receberam gel veículo (V). Contudo, os géis de carvacrol e chalconas aplicados de forma isoladamente não foram capazes de inibir a atividade da enzima. (Figura 30).

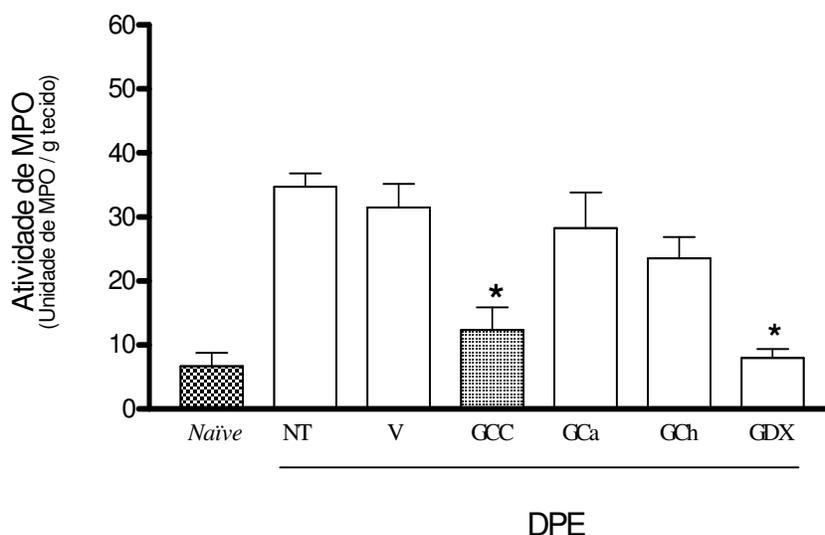


Figura 30 - O efeito do GCC, gel de carvacrol (GCa) e chalconas (GCh) na atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival das maxilas de ratos submetidos à DPE: Os géis veículo (V), GCC, GCa, GCh e gel de doxiciclina (GDX) foram aplicados de forma tópica na região gengival dos animais submetidos à indução de DPE. O grupo não-tratados (NT) foi submetido a DPE mas não recebeu tratamento. O grupo *Naive* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. As barras representam a média \pm o erro padrão de média da atividade de MPO/mg de tecido. * $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo veículo (V) e não tratado (NT) (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Efeito dos géis de Carvacrol, Chalconas e o gel combinado (GCC) sobre as alterações de microrganismos em ratos submetidos à DPE.

5.5.4 Efeito do gel (GCC) sobre a flora microbiana na DPE

Os géis de Carvacrol, Chalconas e o gel de carvacrol+ chalconas foram capazes de inibir o crescimento de bactérias (Unidades Formadoras de Colônias) após semeadura do tecido gengival homogeneizado em placas petri com Ágar sangue (Figuras 31 e 32).

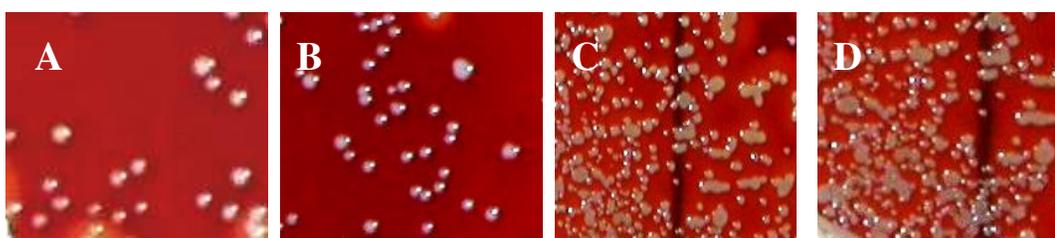


Figura 31 - Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias em Ágar sangue. **A=** (gel de carvacrol GCa); **B=** (gel de Chalcona GCh) **C=** (V); **D=** (NT).

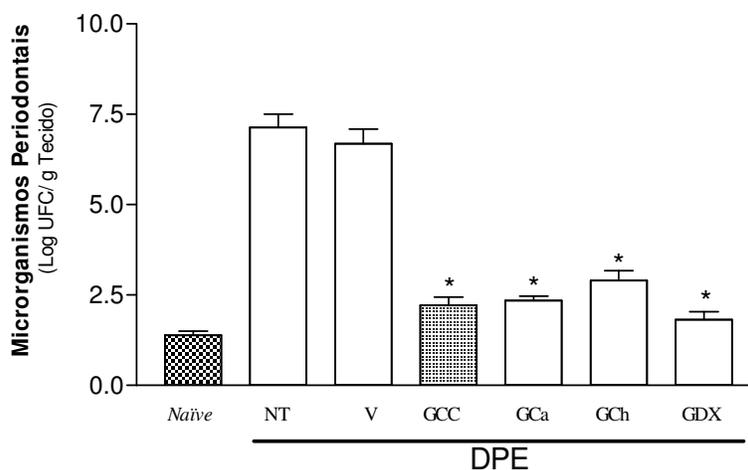


Figura 32 - Efeito antibacteriano do gel de Carvacrol (GCa), gel de Chalconas (GCh) e gel de Carvacrol e Chalconas (GCC) nos microrganismos envolvidos na DPE em ratos. Os géis veiculo (V), GCC, GCa, GCh e gel de doxiciclina (GDX) foram aplicados de forma tópica na região gengival dos animais submetidos à indução de DPE. O grupo não-tratado (NT) foi submetido à DPE, mas não recebeu tratamento. O grupo *Naive* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. Os resultados são relatados como médias + o erro padrão da média das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas após a semeadura do tecido gengival homogeneizado do tecido dos ratos submetidos à DPE em placa petri (Meio de cultura de Ágar sangue). O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e grupo veículo e NT (* P <0,05; teste de Bonferroni, ANOVA).

5.5.5 Efeito do gel (GCC) sobre a variação da massa corpórea na DPE

Os géis de carvacrol, chalconas e o gel combinado de carvacrol e chalconas foram capazes de promover um aumento da porcentagem da massa corpórea estatisticamente significativa quando comparados aos grupos não-tratados (NT) e aqueles que receberam tratamento com o gel veículo (Figura 33).

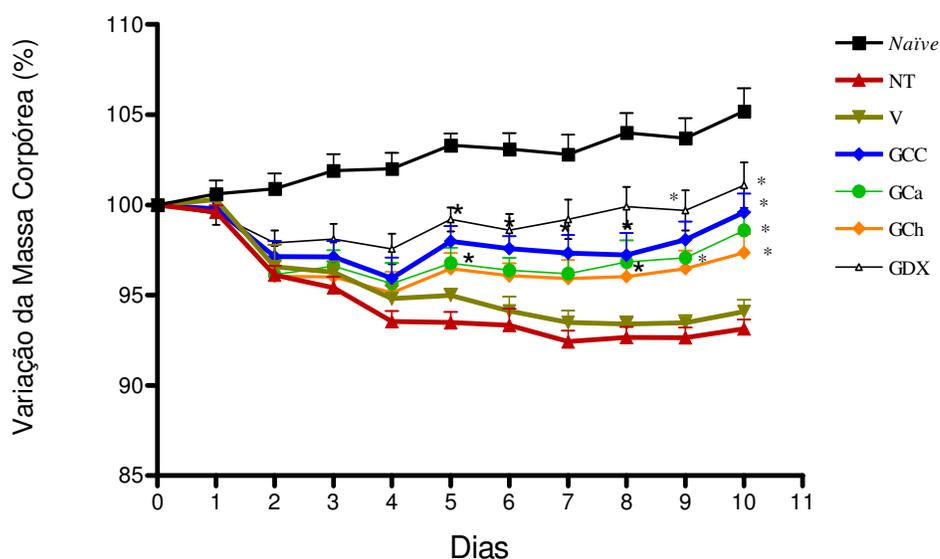


Figura 33 - Efeito do gel de carvacrol+chalconas na variação da massa corpórea de ratos submetidos à doença experimental (DPE) induzida por fator retentivo de placa. A DPE foi induzida pela inserção de fio de náilon em torno dos segundos molares dos animais. As massas corpóreas dos animais foram medidas imediatamente antes da cirurgia e, após esta, diariamente, durante 11 dias. Os pontos representam a média \pm EPM da variação de massa corpórea (g) calculada através das diferenças das massas dos animais em relação à massa inicial. Os géis veículo (V), carvacrol+chalconas (GCC), gel de carvacrol (GCa), gel de chalconas (GCh) e gel de doxiciclina (GDX) foram aplicados de forma tópica nos animais submetidos à DPE. O grupo não-tratados (NT) foi submetido a DPE mas não recebeu tratamento. O grupo *Naïve* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média (N=6) do peso (g) medido a cada dia. O asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e o grupo veículo e Não Tratado (* $p < 0,05$; ANOVA teste de Bonferroni).

6 DISCUSSÃO

Para uma melhor compreensão didática da discussão dos nossos resultados este tópico será abordado em três etapas: Na **Primeira Etapa** serão abordados os resultados dos ensaios antimicrobianos e antifúngicos *in vitro*. A **Segunda Etapa** que trata sobre os resultados dos ensaios experimentais da DPE *in vivo* com os géis a base de produtos naturais *in natura*, ou seja, sem o isolamento de princípios ativos e com os géis a base de produtos naturais elaborados a partir do isolamento de seus respectivos princípios ativos.

As doenças periodontais ainda se configuram como os principais problemas de saúde bucal na maioria de países industrializados, afetando 60-90% dos escolares e a vasta maioria dos adultos. Apesar dos grandes avanços, os problemas ainda remanescem em muitas comunidades não apenas no Brasil, mas também no mundo, particularmente entre grupos menos favorecidos economicamente (PETERSEN, 2005).

Esta patologia tem sido tradicionalmente tratada por procedimentos mecânicos, tais como raspagem, alisamento e polimento radicular, associados ou não a procedimentos cirúrgicos, a fim de descontaminar a superfície radicular (GOLUB et al., 1998; MOMBELLI, 1999). No entanto, esta abordagem provoca prejuízos ao periodonto de inserção e proteção (LLAVANERAS et al., 2001; SALLUM et al., 2002).

Pesquisas recentes continuam a suportar uma forte associação entre infecções periodontais e doenças cardiovasculares (DEMMER; DESVARIEUX, 2006). A busca por novas drogas, que apresentem leves ou pequenos efeitos colaterais, com um baixo custo e uma efetiva ação terapêutica, tem despertado interesse pelo estudo de produtos naturais (RAO et al., 1987; MENEZES; RAO, 1988; TEIXEIRA, 2003; PAI, 2004; BOTELHO et al., 2007a, 2007b, 2007c, 2007d).

A aplicação tópica de géis antimicrobianos sintéticos (GARRETT et al., 1999, 2000; WENNSTROM et al., 2001), ou a base de produtos naturais (alecrim + aroeira) constituem uma nova abordagem no tratamento periodontal, sendo usados como agentes terapêuticos em várias doenças (AMORIM; SANTOS, 2003; PAI et al., 2004). Nos últimos anos, tem sido estudado o uso dos géis de produtos naturais como aplicação local como coadjuvante na terapia periodontal (PAI et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado a resposta frente ao tratamento periodontal com drogas sistêmicas (LIMA, 2000; BEZERRA et al., 2002; MENEZES et al., 2005). Entretanto, poucos estudos têm avaliado o tratamento da aplicação local de drogas antimicrobianas como adjunto ao tratamento da doença periodontal experimental.

Estudos recentes demonstram que substâncias como flavonóides, taninos e chalconas presentes em diversos extratos de plantas medicinais (VIANA et al., 2003; AMORIM; SANTOS 2003), apresentam atividade antiinflamatória e antibacteriana (AMORIM et al., 2003; BOTELHO et al., 2007c), podendo ter efeito sobre patologias onde o componente inflamatório é decisivo para seu desenvolvimento.

Embora o tratamento convencional de remoção mecânica da placa bacteriana mostre-se efetivo em muitos casos, existem, casos que não respondem bem a esse protocolo de tratamento, havendo, portanto, necessidade do desenvolvimento de novos artifícios farmacológicos suplementares para tratar a periodontite (BEZERRA et al., 2002; BOTELHO et al., 2007c, 2007d).

De posse desses dados, pesquisamos na literatura e encontramos em trabalhos recentes que alguns fitoterápicos são usados em diversas patologias e têm apresentado resultados convincentes, demonstrando não apenas atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, como ação antiinflamatória (BOTELHO et al., 2007 a, 2007b). Entre estas drogas, encontram-se os compostos derivados do óleo essencial e da aroeira (VIANA et al., 2003; BOTELHO et al., 2007d).

Trabalhos prévios mostram que alguns produtos naturais como própolis (compostos de flavonóides) e óleos essenciais possuíam capacidade cariostática, inibindo a produção de enzimas que facilitavam a agregação e formação do biofilme bem como o crescimento de *Streptococcus mutans* (DUARTE et al., 2006; CHUNG et al., 2006). Porém, ainda não havia sido mostrada a ação do óleo essencial do alecrim pimenta sobre bactérias cariogênicas bem como contra *C. albicans*.

No contexto do tratamento da doença periodontal, de acordo com os estudos de Kalusen (1991), o número de patógenos periodontais pode ser maior do que o que geralmente se acredita, uma vez que espécies como *Streptococcus* estão associados com a perda óssea

periodontal em ratos. Para melhor caracterizar o efeito antimicrobiano do óleo essencial de alecrim pimenta, foram isoladas de pacientes periodontalmente comprometidos cepas de *Streptococcus*, as quais são representantes das bactérias microaerófilas Gram positivas. Estes microrganismos estão implicados com a doença periodontal e têm sido detectados freqüentemente em sítios ativos de destruição periodontal. (KLAUSEN, 1991).

A primeira etapa do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim pimenta (OELS) e seus compostos derivados sobre patógenos orais bactérias cariogênicas e o fungo *C.albicans*, uma vez que Osawa et al. (1990) mostraram que o timol e o carvacrol presentes no óleo essencial do alecrim-pimenta são efetivos contra bactérias periodontopatogênicas anaeróbicas como *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Eikenella* e *Bacteróides*.

A partir do isolamento de bactérias de pacientes periodontalmente comprometidos, bem como com cepas padrões de *S.mutans* (ss-980) e *C. albicans* (ATCC 11203) foram realizados testes de contato direto (Difusão em Ágar), MIC Concentração Inibitória Mínima e MBC - Concentração Bactericida Mínima.

O OELS assim como seus compostos derivados timol e carvacrol, se mostraram eficazes como agentes antibacterianos quando testados no modelo de difusão em Ágar contra as quatro cepas de bactérias cariogênicas incluindo o *S.mutans* bem como foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*. Os compostos, timol e carvacrol, isolados a partir da cromatografia do óleo essencial se mostraram mais eficazes quando comparados ao óleo essencial, sendo o carvacrol o composto mais ativo contra *C. albicans* e as cepas bacterianas testadas. Os recentes achados de pesquisas realizados pelo nosso grupo concluem que o óleo essencial apresenta um potencial antibacteriano menor do que os componentes principais isolados (Timol e Carvacrol) sugerindo que os componentes menores são críticos à atividade e podem ter um efeito antagonista com influência potencial ao óleo essencial. (BASSOLE et al., 2003; BOTELHO et al., 2007a).

O resultado foi de certa forma inesperada, pois o óleo essencial apresenta os dois compostos logo era de se esperar uma atividade antibacteriana e antifúngica maior. Todavia, Bassole et al. (2003), demonstraram que quando existe uma determinada concentração de *p-cimeno* no óleo, este composto se traduz como um agente antagonista dos efeitos biológicos do timol e carvacrol, diminuindo de sobremaneira sua ação antibacteriana. Este fato foi,

consistente com os nossos achados. Os halos de inibição foram medidos e estatisticamente avaliados mostrando um melhor desempenho para o carvacrol em todos os testes realizados.

O carvacrol foi o composto escolhido para compor o segundo gel a base de princípios ativos isolados. Uma vez que este composto apresentou os melhores resultados no teste do contato direto. Um estudo recente mostra que a remoção dos substituintes alifáticos do anel do carvacrol diminuiu sua atividade antimicrobiana. Entretanto, o composto derivado causa o rompimento da membrana bacteriana de forma similar, com características antimicrobianas semelhantes ao carvacrol, mostrando assim que a hidroxila não é essencial para a atividade antimicrobiana (VELDHUIZEN et al., 2006).

No presente estudo, buscou-se verificar o efeito do tratamento com a aplicação local na região gengival de géis a base de produtos naturais e seus derivados, bem como elucidar os mecanismos pelos quais esses fitofármacos atuam na periodontite em modelo animal, comparando-o com um antimicrobiano já aceito, a doxiciclina (controle positivo) e um gel veículo (controle negativo). Para tanto, a doença periodontal foi induzida através da inserção de fio de náilon 3.0 ao redor dos segundos molares superiores esquerdos de ratos *Wistar*, de acordo com modelo desenvolvido por vários autores (CRAWFORD et al., 1978; SALLAY et al., 1992; SAMEJIMA et al., 1990; KOIDE et al., 1995) e modificado no Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA (LIMA et al., 2000; LEITÃO et al., 2005).

A estrutura e a organização do tecido periodontal da região de molares em ratos, incluindo epitélio gengival oral, epitélio sulcular oral, epitélio juncional, fibras colágenas periodontais, cemento celular e acelular e osso alveolar, são muito semelhantes às do ser humano. A maior diferença consiste no fato de que o epitélio sulcular gengival dos ratos é queratinizado. Porém, estudos mostram que não se deve pensar que a barreira funcional gengival é diferente nos ratos e nos seres humanos, embora a extensão da área afetada seja maior no homem. Dessa forma, o modelo aqui utilizado foi capaz de reproduzir as principais características encontradas na periodontite em humanos, sendo apropriado para o estudo dessa doença.

Neste trabalho, escolhemos o Óleo Essencial de *Lippia sidoides* (OELS) e o extrato fluido da aroeira (EFA) devido ao fato desses produtos naturais serem de fácil acesso a

população de baixa renda (custo mais acessível) e por possuir apresentação para administração via tópica elaborados na UFC. A doxiciclina também foi escolhida não só devido à sua ação antimicrobiana, mas também ao seu efeito anticolagenolítico. Vários autores demonstram que o uso deste fármaco como um agente eficaz como coadjuvante no tratamento da periodontite, em virtude da inibição da atividade das metaloproteinases e, conseqüentemente, inibe a destruição dos tecidos periodontais. Além disso, o uso de uma dose maior, pouco contribui para a ocorrência de alterações na suscetibilidade da microflora periodontal, não ocorrendo, assim, a resistência bacteriana (CHANG et al., 1994; CIANCIO, 1998; GOLUB et al., 1998; BEZERRA et al., 2000; CATON et al., 2001; GOLUB et al., 2001).

Na segunda e terceira etapa do nosso estudo, de acordo com trabalhos anteriores (SALLAY et al., 1982; BEZERRA et al., 2000; LIMA et al., 2000), foi possível observar nos grupos (NT) e gel veículo (V) uma significativa perda óssea alveolar no 11º dia após a indução da doença periodontal experimental (DPE), a qual foi avaliada através do índice de perda óssea (IPO) e da análise histopatológica. De acordo com os autores citados anteriormente que induziram a DPE da mesma forma, nossos achados também comprovaram que a perda óssea alveolar teve início a partir do 3º dia, alcançando valores máximos entre o 7º e o 11º dias.

No presente estudo, a administração de géis combinados de alecrim e aroeira (GAA) assim como gel de carvacrol e chalconas (GCC), logo após a indução de doença, mostrou-se capaz de reduzir de forma significativa o IPO, de forma comparável ao gel de doxiciclina (GDX) (BOTELHO et al., 2007c). O gel de doxiciclina de aplicação tópica já foi utilizado na periodontite como tratamento (TOMASI; WENNSTROM, 2004), mostrando-se eficaz em diminuir a reabsorção óssea, reduzindo o *turnover* ósseo e diminuindo o número de microorganismos nos sítios afetados como também a atividade dos osteoclastos (MACHION et al., 2006). Dessa forma, neste trabalho a doxiciclina foi utilizada como controle positivo.

Os géis a base de compostos naturais aplicados de forma isolada não apresentaram mudanças significativas no IPO. Surpreendentemente, um efeito adicional não apenas no IPO foi verificado como também em outros parâmetros avaliados quando aplicados de forma combinada. É possível especular que com a combinação dos dois compostos no mesmo gel

associou-se o efeito antimicrobiano do alecrim pimenta com o efeito antiinflamatório da aroeira.

Apesar do efeito antimicrobiano do alecrim pimenta ser conhecido e no nosso estudo se mostrar mais acentuado, Amorim e Santos (2003) mostraram que o gel de Aroeira, foi eficaz em diminuir a contagem de bacilos de *Döderlein* e de bactérias anaeróbicas *Gardnerella vaginalis* quando comparado ao grupo tratado com gel placebo. No referido estudo os autores mostraram que alcançaram um percentual de cura de 80% quando o gel de aroeira foi utilizado para o tratamento da vaginose bacteriana.

Considerando a análise histopatológica, o periodonto de animais submetidos à DPE tratados com gel veículo (V) e os não-tratados (NT), apresentaram intenso infiltrado celular inflamatório no 11º dia após a cirurgia, além de destruição total do processo alveolar e destruição acentuada do cemento, achados que conferem com os estudos de Bezerra et al. (2000); Lima et al. (2000) e Menezes et al. (2005).

Adicionalmente, aos dados anteriores, foi possível, através de uma coloração especial, demonstrar uma acentuada destruição das fibras colágenas (dados não apresentados).

Os géis combinados GAA e GCC foram capazes de reduzir a reabsorção do osso alveolar e do cemento radicular, além de preservar de modo parcial a destruição das fibras colágenas do ligamento periodontal. Este efeito também foi análogo ao encontrado com o uso do gel tópico de doxiciclina, havendo uma melhor preservação das fibras colágenas quando comparado com os géis de produtos naturais combinados.

Ainda analisando os achados histopatológicos nesse estudo, observou-se na 6ª hora após a cirurgia um intenso infiltrado celular inflamatório com predomínio de polimorfonucleares, com presença também de mononucleares no tecido gengival, inclusive no próprio epitélio (dado não mostrado), além de hemorragia e edema nos animais não-tratados (NT) assim como naqueles que foram tratados com gel veículo. O aumento do infiltrado neutrofílico na 6ª hora após a indução da DPE foi confirmado através da realização da medida da atividade de MPO, enzima neutrofílica, a qual se mostrou aumentada na 6ª hora em ambos os grupos citados. Estes dados estão de acordo com os achados do nosso grupo (MENEZES et al., 2005). A aplicação tópica dos géis GAA e GCC imediatamente após a cirurgia, promoveu

uma redução acentuada do infiltrado neutrofílico na 6ª hora e redução da MPO, sugerindo um efeito inibitório destes dois géis combinados na migração dos leucócitos PMNs. Esses dados estão de acordo com Viana et al. (1997, 2003); Goes et al. (2005); Cavalcante et al. (2005); Botelho et al. (2007b, 2007c, 2007d), que verificaram uma diminuição do processo inflamatório através do uso tópico destas substâncias em modelos experimentais, e em um ensaio clínico.

Vale ressaltar que os leucócitos PMNs consistem na primeira linha de defesa do organismo, os quais são fundamentais na preservação do periodonto, pois além de realizarem fagocitose, liberam substâncias inflamatórias e antibacterianas capazes de eliminar os microrganismos (ÖVER et al., 1993; MIYASAKI; NEMIROVSKIY, 1997). Entretanto, o papel dos neutrófilos pode ser considerado “uma faca de dois gumes”, de um lado protegendo o organismo, por outro lado pode vir a promover a destruição tecidual, através da liberação de enzimas, radicais reativos de oxigênio e, também, de citocinas (GALBRAITH et al., 1997; LIU et al., 2001).

Com isso, este trabalho mostrou que os géis elaborados e desenvolvidos no laboratório de farmacotécnica da UFC diminuem a resposta inflamatória inicial, o que pode refletir também nas conseqüências posteriores da doença periodontal, como reabsorção óssea e do cimento.

Esta redução acentuada do infiltrado inflamatório neutrofílico induzida pelo tratamento com os géis GAA e GCC de forma tópica poderia melhor explicar a preservação das fibras colágenas do ligamento periodontal, bem como uma menor reabsorção do cimento e do osso alveolar.

Trabalhos prévios demonstraram que a DPE induz um aumento de IL-1 β no tecido gengival, a qual pode ser produzida por monócitos, macrófagos e neutrófilos (KJELDSEN et al., 1995; MILLER et al., 1996; MENEZES et al., 2005). A aplicação tópica do gel GAA na região gengival logo após a indução da doença foi capaz de reduzir os níveis não apenas de IL-1 β , mas também de TNF- α no tecido gengival, com uma diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo tratado com gel veículo e aqueles não-tratados. Estudos prévios mostram a existência de TNF armazenado nos mastócitos e mononucleares, indicando que no tecido gengival sadio, esta citocina já existe, uma vez que a cavidade oral é

naturalmente contaminada e que mastócitos possuem TNF pré-fabricado dentro de seus grânulos (ANDRADE, 2003). Estudos do nosso laboratório mostram que inibidores da síntese de TNF reduzem consideravelmente a perda óssea e o processo inflamatório na DPE enfatizando a importância desta citocina na patogênese da DPE (LIMA et al., 2000; 2004). A aplicação tópica do gel GAA na região gengival logo após a indução da doença nos animais promoveu uma diminuição que alcança uma significância estatística dos níveis de TNF- α no 11º dia no tecido gengival em relação ao tecido dos animais que receberam o gel veículo, esta redução ficou evidente na dosagem de citocina por ELISA. Existem referências que os fitofármacos pertencentes a este grupo atuam como drogas anti-inflamatórias, sendo capazes de diminuir a produção de citocinas, tais como IL-1 β , TNF- α (VIANA et al., 1997, 2003; BOTELHO et al., 2007c).

Neste estudo, também foi analisado a variação de massa corpórea dos animais submetidos à DPE. Verificou-se perda significativa de massa corpórea dos animais no primeiro dia após a indução da doença, provavelmente devido ao trauma provocado pelo ato cirúrgico, ocasionando um processo inflamatório agudo, o qual dificultaria a alimentação dos animais. Após este primeiro momento, ocorreu um ganho de massa corpórea percentual mais acentuado em todos os grupos os quais receberam tratamento com gel a base de produtos naturais, sendo este efeito potencializado na combinação de tais compostos nos quais os animais voltaram a ganhar peso de forma comparável àqueles tratados com gel de doxiciclina. Nos animais nos quais foi administrado GAA e GCC, GAl, GAR, GCa, GCh e GDX observou-se ganho progressivo de massa corpórea de forma significativa em todos os tempos avaliados, resultando em uma curva que se aproximava dos animais sem a doença. Esses achados são em parte consistentes com o trabalho de Lima et al. (2000), no qual afirmam que após os animais perderem 10% de seu peso no primeiro dia depois da indução da doença, retornaram ao peso inicial. Contudo, Koide et al. (1995), demonstrou que a perda de peso ocorreu nos três primeiros dias após a cirurgia. A aplicação de forma tópica pode vir a trazer benefícios como a diminuição da dor e carga bacteriana promovendo condições orais para uma melhor alimentação dos ratos tratados com os géis a base de produtos naturais.

Além de o presente estudo analisar a modulação da resposta inflamatória do hospedeiro pelos géis isolados e combinados (GAA e GCC), também foi avaliado o efeito destes fitofármacos sobre a flora bacteriana local periodontopatogênica, essencial para o desenvolvimento da periodontite. Inicialmente, investigamos as bactérias que fazem parte da

microbiota normal da cavidade oral dos ratos e as que colonizam o periodonto destes animais após a indução da doença. Trabalho do nosso laboratório mostra que a microbiota em ratos submetidos à doença periodontal experimental é diferente da flora de animais sem a doença, sendo formada predominantemente de bactérias Gram negativas anaeróbicas, e bacilos Gram negativos pigmentados (MENEZES et al., 2005). De acordo com a literatura, estes bacilos compreendem os gêneros *Porphyromonas* sp e *Prevotella* sp. Nossos dados confirmam estudos anteriores (KLAUSEN, 1991; MORENO et al., 1999) que mostram que há alteração na constituição microbiológica da doença periodontal semelhantes ao encontrados por nós, presentes tanto em humanos como em ratos.

Surpreendentemente, no presente estudo, notamos que o tanto o GAI, GAR, GAA, GCA, GCh e GCC inibiram o crescimento de bactérias da cavidade oral. Apesar deste achado, o GAA, GCC, GCA e GAI inibiram de forma mais efetiva o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de forma a alcançar significância estatística quando comparados aos géis de aroeira e chalconas, sendo este dado estatisticamente significativo quando comparamos aos animais que receberam apenas gel veículo e não-tratados. Tais achados já eram esperados tendo vista a já estabelecida potente atividade antimicrobiana do alecrim e seus componentes (BOTELHO et al., 2007a; MONTEIRO et al., 2006).

Trabalhos recentes mostram que vários fitofármacos que normalmente são usados em diversas patologias infecciosas têm mostrado atividade antimicrobiana *in vitro e in vivo*. (PAI et al., 2003; DUARTE et al., 2006; BOTELHO et al., 2007a, 2007b, 2007c; CARVALHO et al., 2007). Entre estas drogas, encontram-se o timol e carvacrol, que de acordo com os estudos conduzidos por Osawa et al. (1990), tais compostos presentes no óleo essencial do alecrim-pimenta são efetivos contra bactérias periodontopatogênicas anaeróbicas como *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Eikenella* *Bacteróides*. Carvalho et al. (2007) demonstraram através de microscopia de força atômica a ação do OELS sobre o biofilme e cepas multirresistentes de *Enterococcus fecalis*. Em outro estudo foi comprovada a atividade biológica sobre as larvas do mosquito da dengue *Aedes aegypti* (CARVALHO et al., 2003). Outros compostos derivados da aroeira foram capazes de inibir o crescimento de bactérias presentes no trato vaginal (AMORIM; SANTOS, 2003). Um trabalho um pouco mais antigo mostrou que o óleo essencial do alecrim pimenta possuía capacidade de inibir não apenas o crescimento de *Streptococcus mutans* (BOTELHO; SOARES, 1994) como bactérias residentes na epiderme (LACOSTE et al., 1996). Porém, ainda não havia sido demonstrada a

sua atividade contra o fungo envolvido com o processo de aftas bucais e candidíase oral (*Candida albicans*) assim como a atividade do gel de alecrim pimenta isolado bem como de seu derivado combinado ou não sobre as bactérias periodontopatogênicas.

Os dados apresentados mostram que os géis GAA e GCC possuem ações relevantes, tanto na microbiota envolvida na DPE quanto na resposta inflamatória do hospedeiro e reabsorção dos tecidos duros do periodonto, podendo ser considerado um fitomedicamento promissor para o tratamento da periodontite, e doenças infecciosas e inflamatórias, sendo necessários estudos clínicos futuros, para confirmar o seu efeito positivo.

7 CONCLUSÕES

- O óleo essencial de Alecrim-pimenta, timol e o carvacrol apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* frente à *Candida albicans* bem como aos estreptococos envolvidos no início da formação do biofilme dental e do processo periodontopatogênico;
- Os géis contendo a associação de Alecrim+Aroeira (GAA) e Carvacrol+Chalconas (GCC) reduziram a perda óssea, a reabsorção do cimento, carga microbiana, a perda de peso e os parâmetros inflamatórios característicos da doença periodontal experimental.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R. J. M.; RODRIGUES, L. V.; VIANA, G. S. B. Análise clínica e morfológica da conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina e tratada com chalcona em cobaias. **Acta Cir. Brás.**, v. 19, n. 1, p. 43-48, 2004.
- ALENCAR, W. J.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats indices as preselecion routine in mass spectra library search of volatiles. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 3, p. 890-892, 1984.
- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Rev. Bras. Ginecol. Obstetr.**, v. 2, n. 25, p. 95-102, 2003.
- ANDRADE, A. M. **Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito dos bisfosfonato alendronato dissódico na doença periodontal experimental.** 2003. 112 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
- AZOUBEL, M. C.; MENEZES, A. M.; BEZERRA, D.; ORIÁ, R. B.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 117-125, 2007.
- BAKER, P. J.; EVANS, R. T.; COBURN, R. A.; GENCO, R. J. Tetracyclines and its derivatives strong bind to and are released from tooth surface in active form. **J. Periodontol.**, v. 54, n.10, p. 580-585, Oct. 1983.
- BANDEIRA, M. A. M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (*Astronium urundeuva* engl.), aroeira-do-sertão.** 1993. 206 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1993.
- BASSOLE, I. H.; OUATTARA, A. S.; NEBIE, R.; OUATTARA, C. A.; KABORE, Z. I.; TRAORE, S. A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 209-212, Jan. 2003.
- BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 5, p. 613-616, May 2002.
- BEZERRA, M. M.; DE LIMA, V.; ALENCAR, V. B.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, June 2000.
- BJORVATN, K.; SKAUG, N.; SELVIG, K. A. Tetracycline-impregnated enamel and dentin: Duration of antimicrobial capacity. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 93, n. 3, p. 192-197, 1985.

BOTELHO, M. A. **Eficácia do Alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) no controle da placa bacteriana e gengivite:** um ensaio clínico duplo cego controlado e randomizado. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G.; LEMOS, T. L.; MATOS, F. J.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 3, n. 40, p. 349-356, 2007a.

BOTELHO, M. A.; BEZERRA-FILHO, J. G.; MONTENEGRO, D.; FONSECA, S. G. C.; GAPSKI, R.; BRITO, G. A. C.; HEUKELBACH, J. Effect of a novel mouthrinse based on *Lippia sidoides* Cham essential oil on bacterial plaque and gingivitis: a double-blinded randomized controlled trial. **J. Applied Oral Sci.**, 2007b. *In press*.

BOTELHO, M. A.; RAO, V. S.; CARVALHO, C. B. M.; BEZERRA-FILHO, J. G.; FONSECA, S. G. C.; VALEB, M. L.; MONTENEGRO, D.; CUNHA, F.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, 2007c. *In press*.

BOTELHO, M. A.; RAO V.S.; NOGUEIRA, N. A.; BEZERRA-FILHO, J. G.; FONSECA, S. G. C.; MONTENEGRO, D.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. **Phyther. Res.**, 2007d. *In press*.

BOTELHO, M. A.; SOARES, J. B. O óleo essencial do Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) na prevenção da cárie dental. In: ANAIS SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., 1994, Fortaleza, 1994. p. 20.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa de saúde bucal**. Brasília, DF, 2004.

CAFFESSE, R. G.; SWEENEY, P. L. Smith BA. Scaling and root planning with and without periodontal flap surgery. **J. Clin. Periodontol.**, v. 13, n. 3, p. 205-210, 1986.

CAO, C. F.; SMITH, Q. T. Crevicular fluid myeloperoxidase at health, gingivitis and periodontitis sites. **J. Clin. Periodontol.**, v. 16, p. 17-20, 1989.

CARVALHO, A. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* Linn. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-71, 2003.

CARVALHO, C. B.; BOTELHO, M. A.; ARRUDA, T. T.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; CARNEIRO, V. A.; FREIRE, V. N.; SANTOS, R. P.; RAO, V. S. Topographical alterations and antimicrobial effect of *Lippia sidoides* essential oil against *Enterococcus faecalis* biofilms. **J. Ethnopharmacol.**, em revisão.

CATON, J. G. Subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct to scaling and root planning: post-treatment effects. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p. 782-789, 2001.

CAVALCANTE, A. R. ; RODRIGUES, L.V.; DE MENEZES, D. B.; DA CUNHA, M. D. O. P.; GOES, A. C. Tensional and morphologic analysis of the colonic anastomosis on 10% acetic acid induced colitis, in Wistar rats, treated with 10% aroeira-do-sertao (*Myracrodruon urundeuva* Fr. all.) aqueous extract. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 2, p. 180-186, mar./abr. 2005.

CHANG, K. M. Tetracyclines inhibit porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in rats by a non-antimicrobial mechanism. **J. Periodontal Res.**, v. 29, p. 242-249, 1994.

CHRISTERSSON, L. A.; NORDERYD, O. M.; PUCHALSKY, C. S. Topical application of tetracycline-HCL in human periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 20, n. 2, p. 88-90, 1993.

CHUNG, J. Y.; CHOO, J. H.; LEE, M. H.; HWANG, J. K. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. **Phytochemistry**, v. 4, n. 13, p. 261-266, 2006.

CIANCIO, S. G. Tetracyclines and periodontal therapy. **J. Periodontol.**, v. 47, n. 3, p. 155-159, 1976.

CIANCIO, S. G.; ASHLEY, R. Safety and efficacy of sub-antimicrobial-dose doxycycline therapy in patients with adult periodontitis. **Adv. Dent. Res.**, v. 12, n. 2, p. 27-31, 1998.

CIANCIO, S. G.; COB, C. M.; LEUNG, M. Tissue concentration and localization of tetracycline following site-specific tetracycline fiber therapy. **J. Periodontol.**, v. 63, n.10, p. 849-853, 1992.

COSTA, S. M. O. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n. 6, p.792-795, 2001.

CROUT, R. J. The “cyclic” regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. **J. Periodontol.**, v. 67, p. 506-514, 1996.

DEMMER, R. T.; DESVARIEUX, M. Periodontal infections and cardiovascular disease: the heart of the matter. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.137, Suppl., p. 14S-20S, 2006.

DUARTE, S. The influence of a novel propolis on *mutans streptococci* biofilms and caries development in rats. **Arc. Oral Biol.**, v. 51, p 15-22, 2006.

EBERSOLE, J. L.; CAPPELLI, D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. **Periodontology 2000**, v. 23, p. 19-49, 2000.

ELIZABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. **Ciênc. Cult.**, v. 39, n. 8, p. 697-702, 1997.

FONTENELLE, R. O.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; TOME, A. R.; QUEIROZ, M.G.; NASCIMENTO, N. R.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

GALBRAITH, G. M. P. ; HAGAN, C.; STEED, R. B.; SANDERS, J. J.; JAVED, T. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 68, p. 832-838, 1997.

GARRETT, S.; JOHNSON, L.; DRISKO, C. H.; ADAMS, D. F. Two multi center studies evaluating locally delivered doxycycline hyclate, placebo control, oral hygiene, and scaling and root planning in the treatment of periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 5, p. 490-503, 1999.

GARRETT, S.; ADAMS, D. F.; BOGLE, G.; DONLY, K. The effect of locally delivered controlled-release doxycycline or scaling and root planning on periodontal maintenance patients over 9 months. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 1, p. 22-30, 2000.

GENCO, R. J. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. **J. Periodontol.**, v. 52, n. 9, p. 545-558, 1981.

GENCO, R. J. Host responses in periodontal diseases: current concepts. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 338-355, 1992.

GIRÃO, V. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C.; MORAIS, S. M.; SEQUEIRA, J. L.; GIOSO, M. A. A clinical trial of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham. essential oil in dogs with mild gingival disease. **Prev. Vet. Med.**, v. 59, p. 95-102, 2003.

GOES, A. C.; RODRIGUES, L. V.; DE MENEZES, D. B.; GRANGEIRO, M. D. O. P.; CAVALCANTE, A. R. Histologic analysis of colonic anastomotic healing, in rats, under the action of 10% Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) enema. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, p. 144-151, 2005

GOLUB, L. M.; MCNAMARA, T. F.; RYAN, M. E.; KOHUT, B.; BLIEDEN, T.; PAYONK, G.; SIPOS, T.; BARON, H. J. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenases activity and attachment loss in adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, p.146-156, 2001.

GOLUB, L. M.; GOODSON, J. M.; LEE, H. M.; VIDAL, A. M.; MCNAMARA, T. F.; RAMAMURTHY, N. S. Tetracyclines inhibits tissue collagenases. Effects of ingested low-dose and local delivery systems. **J. Periodontol.**, v. 56, p. 93-97, 1985.

GOLUB, L. M.; WOLFF, M.; ROBERTS, S.; LEE, H. M.; LEUNG, M.; PAYONK, G. S. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 125, n. 2, p. 163-171, 1994.

GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; RYAN, M. E. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. **Adv. Dent. Res.**, v. 12, p. 12-16, 1998.

GOODSON, J. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. **J. Dent. Res.**, v. 68, n. 3, p. 1625-1632, 1989.

GOODSON, J. M.; CUGINI, M. A.; KENT, R. L.; ARMITAGE, G. C.; COBB, C. M. Multicenter evaluation of tetracycline fiber therapy: II. Clinical response. **J. Periodontol. Res.**, v. 26, n. 4, p. 371-379, 1991.

GOODSON, J. M.; OFFENBACHER, S.; FARR, D. H.; HOGAN, P. E. Periodontal disease treatment by local drug delivery. **J. Periodontol.**, v. 56, n. 5, p. 265-272, 1985.

GOODSON, J. M.; HAFFAJEE, A.; SOCRANSKY, S. S. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. **J. Clin. Periodontol.**, v. 6, n. 2, p. 83-92, 1979.

GRENIER, D.; PLAMONDON, P.; SORSA, T.; LEE, H. M. Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives. **J. Periodontol.**, v. 1, n. 73, p. 79-85, 2002.

ISOSHIMA, O.; NAORA, Y.; KURIMOTO, K.; ANADA, T. Antibiotic therapy in periodontal disease. Trial of the topical use with minocycline. **J. Jpn. Periodontol. Assoc.**, v. 2, n. 9, p. 472-483, 1987.

JAIN, A.; BATISTA E. L.; SERHAN, C.; STAHL, G. L.; VAN DYKE, T. E. Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in an animal model. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 10, p. 6012-6018. 2003.

JEFFCOAT, M. K.; BRAY, K. S.; CIANCIO, S. G.; DENTINO, A. R. Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 6, p. 989-97, 1998.

JUKIC, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M.; MILOS, M. In Vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 3, p. 259-261, Mar. 2007.

KACEM, R.; MERAIHI, Z. Effects of essential oil extracted from *Nigella sativa* (L.) seeds and its main components on human neutrophil elastase activity. **Yakugaku Zasshi.**, v. 126, p. 301-305, 2006.

KALDAHL, W. B.; KALKWARF, K. L.; PATIL, K. D.; DYER, J. K.; BATES JUNIOR, R. E. Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. **J. Periodontol.**, v. 59, p. 783-793, 1988.

KARKABOUNAS, S.; KOSTOULA, O. K.; DASKALOU, T.; VELTSISTAS, P.; KARAMOUZIS, M.; ZELOVITIS, I.; METSIOS, A.; LEKKAS, P.; EVANGELOU, A. M.; KOTSIS, N.; SKOUFOS, I. Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. **Exp. Oncol.**, v. 28, p. 121-125, 2006.

KJELDSSEN, M.; HOLMSTRUP, P.; LINDEMANN, R. A.; BENDTZEN, K. Bacterial-stimulated cytokine production of peripheral mononuclear cells from patients of various periodontitis categories. **J. Periodontol.**, v. 66, p. 139-144, 1995.

- KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J. Periodontol.**, v. 62, p. 59-73, 1991.
- KOBAYASHI, M.; OKADA, N.; OKAMATSU, Y.; MUGIKURA, K.; NISHIHARA, T.; HANAZAWA, S.; KITANO, S.; HASEGAWA, K. Intracellular interleukin-1 α production in human gingival fibroblasts is differentially regulated by various cytokines. **J. Dent. Res.**, v. 78, n. 4, p. 840-849, 1999.
- KOIDE, M.; SUDA, S.; SAITON, S.; OFUJI, Y.; SUZUKI, T.; YOSHIE, H.; TAKAI, M.; ONO, Y.; TANIGUCHI, Y.; HARA, K. In vivo administration of IL-1 β accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 24, p. 420-434, 1995.
- LACOSTE, E.; CHAUMONT, J. P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M. M.; MATOS, F. J. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Ann. Pharm. Fr.**, v. 54, n. 5, p. 228-230, 1996.
- LACROIX, J. M.; WALKER, C. B. Detection and incidence of the tetracycline resistance determinant tet(M) in the microbiota associated with adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 66, n. 2, p. 102-108, 1995.
- LARSEN, T. Currency of doxycycline-resistant bacteria in the oral cavity after local administration of doxycycline in patients with periodontal disease. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 1, n. 23, p. 89-95, 1991.
- LEITAO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; CHAVES, H. V.; ROCHA, F. A.; LIMA, V.; BRITO, G. A. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 6, p. 956-963, 2005
- LEITÃO, R. F. C. **Estudo do papel do óxido nítrico na doença periodontal experimental.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- LEMOES, T. L. G.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; CLARCK, A.M.; MACCHESNEY, J. D. Antimicrobial activity of the essential oil of Brazilian plants. **Phytother. Res.**, v.10 , n.4, p. 346-349, 1990.
- LIMA, V.; VIDAL, F. D.; ROCHA, F. A.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 1, p.162-168, Jan. 2004.
- LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; DE MENEZES ALENCAR, V. B.; VIDAL, F. D.; DA ROCHA, F. A.; DE CASTRO BRITO, G. A.; DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 108, n. 2, p. 123-129, Apr. 2000.
- LINDHE, J.; KARRING, T. A anatomia do periodonto. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 1, p. 1-42.

- LISTGARTEN, M. A.; LINDHE, J.; HELLDEN, L. Effects of tetracyclines and/or scaling on human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 4, n. 5, p. 246-271, 1978.
- LIU, R. K.; CAO, C. F.; MENG, H. X.; GAO, Y. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissue from generalized aggressive periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 11, p. 1545-1553, 2001.
- LLAVANERAS, A. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. **J. Periodontol.**, v. 72, n. 8, p. 1069-1077, 2001.
- MACHION, L.; ANDIA, D. C.; LECIO, G.; NOCITI JUNIOR, F. H.; CASATI, M. Z.; SALLUM A. W.; SALLUM, E. A. Locally delivered doxycycline as an adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of smokers: a 2-year follow-up. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 4, p. 606-613, 2006.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000. 344 p.
- MENDONÇA, V. L. M. Toxicidade e alergenicidade do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham para utilização em cosméticos. In: ANAIS CONGRESSO LATINO - AMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS E COSMÉTICOS, 9.; CONFERÊNCIA REGIONAL DA IFSC, 1989, Santiago. **Anais...** [S.l.: s.n.], 1989. p. 6.
- MENEZES, A. M.; ROCHA, F. A.; CHAVES, H. V.; CARVALHO, C. B; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 11, p. 1901-1909, 2005.
- MENEZES, A. M. S. **Atividade antiinflamatória e antiulcerogênica de *Astronium urundeuva* Engl.** 1986. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1986.
- MENEZES, A. M. S. Anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. **Fitoterapia**, v. 57, p. 253-256, 1986.
- MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n.21, p.531-533, 1988.
- MENEZES, A. M. S.; RAO, V. S. N.; FONTELES, M. C. Antiinflammatory activity of *Astronium urundeuva*: possible mechanisms involved. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 18, p. 861-864, 1985.
- MILLER, G. A.; DEMAYO, T.; HUTTER, J. W. Production of interleukin-1 by polymorphonuclear leukocytes resident in periradicular tissue. **J. Endod.**, v. 22, n. 7, p. 346-335, 1996.
- MIYASAKI, K. T.; NEMIROVSKIY, E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 12, p. 27-32, 1997.

- MOMBELLI, A. Antibióticos em terapia periodontal. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 17, p. 350-363.
- MONTEIRO, M. V. B.; DE MELO LEITE, A. K. R.; BERTINI, L. M.; DE MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.
- MORENO, M.; ROMERO, P.; NIEVES, B.; SALAZAR, M.; BURGUERA, L. Microbiological characteristics of adult periodontitis associated with anaerobic bacteria. **Anaerobe**, v. 5, p. 261-262, 1999.
- MOTA, C. W. C. **Efeito da chalcona (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) nas fraturas expostas induzidas em ratos**. 2006. 38f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. 5th ed. Wayne, 2000.
- _____. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 6th ed. Wayne, 1998.
- NEWMAN, M. G.; KORNMAN, K. S.; DOHERTY, F. M. A 6-month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planing in maintenance patients: clinical results. **J. Periodontol.**, v. 65, n. 7, p. 685-691, 1994.
- OSAWA, K.; MATSUMOTO, T.; MARUYAMA, T.; TAKIGUCHI, T.; OKUDA, K.; TAKAZOE, I. Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their constituents against periodontopathic bacteria. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, v. 31, n. 1, p. 17-21, 1990.
- ÖVER, C.; YAMALIK, N.; YAVUZYLMAZ, E.; ERSOY, F.; ERATALAY, K. Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophil crevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, v. 35, p. 235-240, 1993.
- PAI, M. R.; ACHARYA, L. D.; UDUPA, N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel-a 6-week clinical study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, n. 1, p. 99-103, 2004.
- PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontology**, v. 24, p. 239-252, 2000.
- PEREZ-CONESA, D.; MCLANDSBOROUGH, L.; WEISS, J. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. **J. Food Protect.**, v. 69, p. 2947-2954, 2006.
- PETERSEN, P. E. Challenges to improvement of oral health in the 21st century-the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Int. Dent. J.**, v. 54, p. 329-343, 2004.

- PETERSEN, P. E.; YAMAMOTO, T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v. 33, p. 81-92, 2005.
- PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONCALVES, M. J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; RODRIGUES, A.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 1367-1373, 2006.
- POLSON, A. M.; GARRETT, S.; STOLLER, N. H.; BANDT, C. L. Multicenter comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis (II). Clinical results. **J. Periodontol.**, v. 2, n. 68, p. 119-126, 1997.
- RADONIĆ, A.; MILOS, M. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant effect of free volatile compounds from *Satureja montana* L. **Free Rad. Res.**, v. 37, p. 673-679, 2003.
- RAMS, T. E.; SLOTS, J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. **Periodontology 2000**, v. 10, p. 139-159, 1996.
- RAO, V. S.; VIANA, G. S.; MENEZES, A. M.; GADELHA, M. G. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. II. Aqueous extract. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 803-805, 1987.
- RODRIGUES, L. V.; FERREIRA, F. V.; REGADAS, F. S.; MATOS, D.; VIANA, G. S. Morphologic and morphometric analyses of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira do Sertão). **Phytother. Res.**, v. 3, n. 16, p.267-272, 2002.
- SANT'ANA, R. O. **Abordagens terapêuticas na mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil - papel dos extratos de *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira-do-Sertao) e de *Aloe barbadensis* (Babosa)**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ROSSOMANDO, E. F.; KENNEDY, J. E.; HADJIMICHAEL, J. Tumor necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, n. 6, p. 431-434, 1990.
- ROSSOMANDO, E. F.; WHITE, L. A novel method for the detection of TNF-alpha in gingival crevicular fluid. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 445-449, 1993.
- SALLAY, K.; SANAVI, F.; RING, I.; PHAM, P.; BEHLING, U. H.; NOWOTNY, A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodontal Res.**, v. 17, p. 263-274, 1982.
- SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z.; NOCITI JUNIOR, F. Benefícios do tratamento químico/medicamentoso das lesões periodontais. In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Periodontia/ cirurgia/ cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p. 65-75.

SANDROS, J.; KARLSSON, C.; LAPPIN, D. F.; MADIANOS, P. N.; KINANE, D. F.; PAPAPANOU, P. N. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 10, p. 1808-1814, 2000.

SATO, K.; KRIST, S.; BUCHBAUER, G. Antimicrobial effect of trans-cinnamaldehyde, perillaldehyde, (-)-citronellal, citral, eugenol and carvacrol on airborne microbes using an airwasher. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 2292-2294, 2006.

STOLLER, N. H.; JOHNSON, L. R.; TRAPNELL, S.; HARROLD, C. Q. The pharmacokinetic profile of a biodegradable controlled-release delivery system containing doxycycline compared to systemically delivered doxycycline in gingival crevicular fluid, saliva and serum. **J. Periodontol.**, v. 69, n. 10, p. 1085-1091, 1998.

TEIXEIRA, P. A. L. **Efeito dos produtos naturais (Rutina, Quercetina e Aroeira) na doença periodontal experimental em ratos**. 2003. 101 f Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

TOMASI, C.; WENNSTROM, J. L. Locally delivered doxycycline improves the healing following non-surgical periodontal therapy in smokers. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 8, p.589-595, 2004.

VELDHUIZEN, E. J. A.; TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, J. L. M.; ZWEIJTZER, C.; BURT, S. A.; HAAGSMAN, H. P. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 5, p. 1874-1879, 2006.

VIANA, G. S.; BANDEIRA, M. A.; MOURA, L. C.; SOUZA-FILHO, M. V. P.; MATOS, F. J. A.; RIBEIRO, R. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of the Tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr All. **Phytother. Res.**, v. 11, p. 118 -122, 1997.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A.; MATOS, F. J. Analgesic and anti-inflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemao. **Phytomedicine**, v. 10, p. 189-195, 2003.

VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A.; BANDEIRA, M. A. M.; RAO, V. S. **Aroeira-do-sertão (Myracrodruon urundeuva Fr. All):** estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1995. 64 f.

WALKER, C. B.; GODOWSKI, K. C.; BORDEN, L.; LENNON, J.; NANGÓ, S.; STONE, C.; GARRETT, S. The effects of sustained release doxycycline on the anaerobic flora and antibiotic-resistant patterns in subgingival plaque and saliva. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 5, p. 768-774, May 2000.

WENNSTROM, J. L.; HEIJL, L.; DAHLEN, G.; GRONDAHL, K. Periodic subgingival antimicrobial irrigation of periodontal pockets. (I). Clinical observations. **J. Clin. Periodontol.**, v. 14, p. 541-550, 1987.

WENNSTROM, J. L.; NEWMAN, H. N.; MACNEILL, S. R.; KILLOY, W. J.; GRIFFITHS, G. S.; GILLAM, D.G.; KROK, L.; NEEDLEMAN, I. G.; WEISS, G.; GARRETT, S. Utilization of locally delivered doxycycline in non-surgical treatment of chronic periodontitis.

A comparative multi-center trial of 2 treatment approaches. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 8, p. 753-761, Aug. 2001.

APÊNDICE A - PUBLICAÇÕES

Artigo 1

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 3, n. 40, p. 349-56, 2007a.

Artigo 2

BOTELHO, M. A. et al. Effect of a novel mouthrinse based on *Lippia sidoides* Cham essential oil on bacterial plaque and gingivitis: a double-blinded randomized controlled trial. **Journal Applied Oral Sciences**, 2007b. in press.

Artigo 3

BOTELHO, M. A. et al. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, in press). 2007c.

Artigo 4

BOTELHO, M. A. et al. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis (**Phytotherapy Research**, in press). 2007d.

Artigo 5

CARVALHO, C. B. et al. Topographical alterations and antimicrobial effect of *Lippia sidoides* essential oil against *Enterococcus faecalis* biofilms. (**Journal of Ethnopharmacology**, em revisão).

ANEXO A



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 4009-8338 Fax (85) 4009-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 10/05, sobre o projeto intitulado “**Estudo de mecanismos envolvidos no efeito da *Lippia sidoides* Cham (Alecrim Pimenta) e *Myracrodouon urundeuva* (Aroeira do Sertão) na doença periodontal experimental**”, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA em reunião realizada em 06 de outubro de 2005.

Fortaleza, 11 de outubro de 2005

A handwritten signature in blue ink that reads "Gisela Costa Camarão".

Profª. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA