



**Universidade Estadual de Maringá**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada**

**Ação do gel de *Limonium brasiliense* no desenvolvimento da  
doença periodontal induzida em ratos.**

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada  
da Universidade Estadual de Maringá com pré-requisito  
para a obtenção do título de Mestre em Odontologia Integrada

**Maringá, 2020.**



**Universidade Estadual de Maringá**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada**

**Ação do gel de *Limonium brasiliense* no desenvolvimento da  
doença periodontal induzida em ratos.**

**Mestranda: Gislaine Stella Alves Amaral**

**Orientador: Prof. Dr. Cléverson de Oliveira e Silva**

**Co-orientadora: Prof. Dra. Luzmarina Hernandes**





## AGRADECIMENTOS

À Deus pelas coisas maravilhosas nesses anos de dedicação, mesmo muitas vezes não entendendo algumas situações Deus sempre fez o melhor e nesse mestrado ficou claro Seu cuidado pelas pessoas que colocou em meu caminho, em especial meu orientador e minha co-orientadora.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cléverson de Oliveira, pelo ensinamento, paciência e por ser presente durante todo tempo.

Minha co-orientadora Prof. Dra. Luzmarina Hernandes, pela dedicação, cuidado e ensinamento.

Ao prof.Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pelo laboratório, incentivo e conhecimento e a prof. Dra.Elen de Souza Tolentino pelo conhecimento.

Minhas amigas Lays, Isadora e Camila que juntas compartilhamos momentos de alegrias e tristezas.

Às pessoas do laboratório, em especial Maria Ângela, Silvia e Ana pelo ensinamento e amizade.

Aos alunos do programa de pós graduação da Uem, Alessandro Gavazzoni, Humberto Pasquinelli, Rafael Lazarin, Cecília Truite, Gabriela Padro, Jéssica Naiara, às alunas do laboratório PALAFITO, Ana Carolina Guidi, Daniela C. Medeiros, Raquel G. Isolani, Fernanda P. Silva e à aluna de iniciação Driele Schneider.

Meus pais Isaias Alves e Leonice Aparecida da Silva, que a todo o momento me acompanharam e entenderam minha ausência.

Minha querida irmã, que como dentista me ajudou muitas vezes, sempre me apoiando nos momentos mais difíceis.

Meus afilhados e sobrinhos, os quais amo muito Miguel ,Gabriel e Raphael (*in memorian*)

Meu afilhado Samuel, um presente que recebi durante o mestrado.

Meu marido Danilo de Souza Amaral, que sempre compreendeu a importância do mestrado e pelo incentivo, pois muitas vezes foi necessário desistir de outras coisas por essa formação.

À Todos que participaram desse momento.

<b>Sumário</b>	<b>Página</b>
CAPÍTULO I	9
1.DOENÇA PERIODONTAL	9
1.1. Etiopatogenia	10
1.2 Prevenção e tratamento	12
1.2.1 Tratamento adjunto	13
1. 2.1.1 Produtos naturais	13
1.3 <i>Limonium brasiliense</i>	14
1. 4 Justificativa	15
1. 5 Objetivo	15
CAPÍTULO II Artigo	21

## RESUMO

A doença periodontal é uma patologia que afeta mais da metade da população mundial. Sua prevenção é um grande desafio e diversos métodos já foram desenvolvidos para tratar essa doença. *Limonium brasiliense* é uma planta natural da região sul do Brasil, tem ação bacteriostática, anti-inflamatória e antioxidante e não existem estudos *in vivo* avaliando seu efeito sobre a evolução da doença periodontal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do extrato de *L. brasiliense*, na forma farmacêutica gel, no desenvolvimento da doença periodontal em ratos. Foram utilizados ratos Wistar machos com 65 dias de idade. A doença periodontal foi induzida nos segundos molares superiores, por meio da colocação da ligadura de algodão. Os animais foram divididos em sete grupos de acordo com o tratamento: controle negativo, sem indução da doença; doença periodontal sem tratamento; doença tratada com clorexidina 0,12%; doença tratada com gel veículo; doença tratada com gel de *L. brasiliense* 0,5%, 1% e 2%. As aplicações dos géis foram realizadas com *microbrush* durante 1 minuto, 2x/dia durante 11 dias. Após este período os animais foram eutanasiados e as maxilas coletadas, fixadas, processadas para inclusão em parafina e coradas com Hematoxilina e Eosina. A região periodontal foi analisada quanto à presença de inflamação, integridade das fibras transeptais e perda óssea alveolar. Os parâmetros de inflamação e perda óssea foram avaliados nas regiões mesial, distal e de furca. Foram atribuídos escores para cada parâmetro analisado. Os resultados mostraram que o tratamento com gel de *L. brasiliense* 1% evitou o desenvolvimento de inflamação intensa. A maior frequência de integridade das fibras transeptais foi observada no periodonto dos animais tratados com *L. brasiliense* 0,5%, 1% e naqueles animais sem qualquer tratamento. O osso alveolar apresentou menor destruição naqueles animais tratados com o gel de *L. brasiliense* a 1%. Conclui-se que o gel de *L. brasiliense* 1% apresentou o melhor resultado na evolução da doença periodontal, atenuando os seus efeitos deletérios.

**Palavras-chave:** periodonto; fitofármacos; indução de doença periodontal; osso alveolar



## ABSTRACT

Periodontal disease is the pathology that affects over half of the world's population, and the prevention of this disease is a great challenge for the population's health. *Limonium brasiliense* is a natural plant from southern Brazil, has bacteriostatic, anti-inflammatory and antioxidant action and there are no *in vivo* studies evaluating its effect on the development of periodontal disease. Therefore, the aim of this study was to evaluate the use of *L. brasiliense* extract, in the pharmaceutical gel form, in the development of periodontal disease in rats. The study was performed using 65 days old male Wistar rats. Periodontal disease was induced in the upper second molars, through the ligature. The animals were divided into seven groups according to treatment: negative control without periodontal disease, periodontal disease without treatment, disease treated with 0.12% chlorhexidine; disease treated with base gel; disease treated with *L. brasiliense* gel 0.5%, 1% and 2%. Gels were applied with microbrush for 1 minute, 2x/day for 11 days. After this period, the animals were euthanized and the jaws were collected, fixed, processed for inclusion in paraffin and stained with Hematoxylin and Eosin. The periodontal region was analyzed for the presence of inflammation, integrity of the transseptal fibers and alveolar bone loss. The parameters of inflammation and bone loss were analyzed in the mesial, distal and furcation regions. Scores were attributed to each parameter analyzed. The results showed that *L. brasiliense* at 1% prevented the development of intense inflammation. The highest frequency of transseptal fiber integrity was observed in the periodontium of animals treated with *L. brasiliense* 0.5%, 1% and in animals without any treatment. The alveolar bone showed less destruction in those animals treated with *L. brasiliense* gel at 1%. It is concluded that the *L. brasiliense* 1% gel presented the best result in the development of periodontal disease, attenuating the deleterious effects of the disease.

**Keywords:** periodontium; phytopharmaceuticals; induction of periodontal disease; alveolar bone.

## CAPÍTULO I

### 1. DOENÇA PERIODONTAL

A saúde periodontal é caracterizada pela ausência histológica de inflamação e nenhuma alteração anatômica no periodonto, porém as doenças periodontais (DP) são frequentemente encontradas (Lang, Bartold, 2018), com uma prevalência de 60% na população adulta (Demmer, Papapanou, 2010; Papapanou, Susin, 2017). Devido ao grande predomínio da doença, a saúde periodontal deve ser descrita como a ausência total ou redução significativa de inflamação em um periodonto intacto ou reduzido (Lang, Bartold, 2018).

As DP são infecções que resultam na inflamação dos tecidos de proteção e suporte dentário (Kinane et al., 2017), essa doença gera uma destruição do tecido ósseo que pode levar à perda dentária (Kinane et al., 2017; Papapanou, Susin, 2017). O diagnóstico da DP é feito por meio de exames clínico e radiográfico e os sinais mais frequentes são o sangramento à sondagem, vermelhidão, inchaço, podendo também apresentar mobilidade dentária (Lang, Bartold, 2018). Como consequência, a doença pode predispor à aterosclerose, diabetes, aumento de inflamações sistêmicas, e problemas psicossociais associados à halitose (Papapanou, Susin, 2017).

A DP é multifatorial, envolvendo a interação entre bactérias subgingivais, respostas do hospedeiro e fatores predisponentes (Bartold, Van Dyke, 2013). Nesse contexto, alguns elementos podem proporcionar condições para o desenvolvimento da doença, entre eles estão presentes a genética, estilo de vida, tabagismo, doenças sistêmicas, nutrição e estresse (Chapple et al., 2015; Lang, Bartold, 2018). No entanto, o fator de risco mais importante para periodontite é o acúmulo de biofilme (Chapple et al., 2015). Este é formado por uma matriz orgânica de saliva, dieta do hospedeiro e bactérias, sendo as principais componentes do grupo a *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Tannerella forsythia* (*Tf*) e *Treponema denticola* (*Td*) (Socransky et al., 1998; Schumuch et al., 2015; Harvey, 2017).

A doença periodontal representa um grande problema de saúde pública mundial (Petersen, Ogawa, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a saúde é definida como um estado de completo de bem-estar físico, mental e social e não apenas a ausência de doença (OMS, 1946). A DP causa alterações como comprometimento da função

e estética, impactando na qualidade de vida. O estabelecimento da DP está relacionada às condições de vida, fatores ambientais, comportamentais e sistemas de saúde bucal daquele indivíduo (Petersen, Ogawa, 2012). Assim, o controle da DP está intimamente ligado à melhora do bem estar global do indivíduo.

## 1.1 ETIOPATOGENIA

O desenvolvimento da DP, de maneira geral, se dá por meio das bactérias, em fluidos orais que chegam aos tecidos periodontais, promovendo a adesão às células e a outras bactérias do biofilme dental (Harvey, 2017). As principais bactérias da doença são *a Pg*, *Tf* e *Td* (Socransky et al., 1998; Schumuch et al., 2015; Harvey, 2017). A característica mais marcante dessas bactérias do complexo vermelho é a atividade proteolítica extracelular (Dashper et al., 2010).

A *Pg* está intimamente relacionada à DP (Nakayama; Ohara, 2017) e apresenta como fatores de virulência os lipossacarídeos (LPS), polissacarídeo capsular e fímbrias (Bostanci, Belibasakis, 2012).

Dos componentes presentes para desencadear a doença, o LPS estimula a resposta inflamatória do hospedeiro, a cápsula permite à bactéria a resistência e as fímbrias possuem um papel na adesão às células epiteliais e a outras bactérias. Esse fator de adesão é extremamente importante para a manutenção da bactéria e desenvolvimento da doença (Nakayama; Ohara, 2017).

A gingipaína é composta por proteases de cisteína, divididas em arginina e lisina. A gingipaína rompe os mecanismos de defesa do hospedeiro, influenciando diretamente a resposta imune pela atividade proteolítica. Com esses mecanismos, *Pg* é uma das principais contribuintes para o surgimento da doença (Nakayama; Ohara, 2017).

*Tf* também está relacionada a problemas periodontais (Sharma, 2010), porém apresenta um maior potencial patogênico na inflamação quando associada às outras bactérias do complexo vermelho. Como característica, é Gram-negativa, e está presente nos níveis mais altos das doenças (Sharma, 2010). Possui enzimas semelhantes à tripsina, uma camada superficial (S), lipoproteínas e LPS.

A superfície dessa bactéria apresenta uma enzima que está relacionada à degradação de peptídeos, porém esse fator influencia de maneira pouco significativa na DP. Possui

também a camada S, com glicoproteínas, essa camada permite proteção, adesão e invasão da bactéria (Sharma, 2010). O potencial de internalização desse microrganismo às células do hospedeiro, ocorre através da endocitose mediada por receptores da bactéria, que aderem e invadem as células, porém de maneira mais fraca que *Pg*. *Tf* também possui como virulência a hemaglutinação e, de acordo com estudos, apresenta o potencial de formação de abscessos, em camundongos (Sabet et al., 2003).

*Tf* possui em sua membrana, lipoproteínas e LPS que desempenham a indução de respostas inflamatória (Hasebe et al., 2004). Outro fator de virulência são as proteínas, sendo as principais o BspA, DppIV dipeptidil peptidase IV. O BspA está relacionado a enzimas que geram a destruição dos tecidos, e o DppIV é uma proteína de reparo de incompatibilidade de DNA (Sharma, 2010). Assim, a bactéria apresenta vários fatores importantes que em conjunto desencadeiam a doença.

Finalizando as bactérias desse grupo, *Td* é encontrada na cavidade bucal de pacientes saudáveis e necessitam de outras bactérias para desencadear a doença. Como fatores de virulência têm o sistema de toxina-antitoxina, formação de ácidos, flagelos e LPS.

A invasão de *Td* em células epiteliais e na formação de biofilme está associada a proteínas leucina de repetição (Lrr). *Td* e *Pg* não competem pelas condições de crescimento, possibilitando a manutenção de ambas no ambiente. O sistema de toxina-antitoxina (TA), apresentado pela bactéria, auxilia na sua resistência no ambiente (Dashper et al., 2011). A bactéria também é capaz de fazer fermentação e esses produtos promovem a alteração no biofilme e também interferem na resposta imunológica do indivíduo, contribuindo para o desenvolvimento da doença (Dashper et al., 2011). Em um trabalho *in vitro*, a proteína da bainha externa (Msp) desempenha inibição das funções dependentes de actina por neutrófilos, influenciando a resposta imune (Puthengady et al., 2006).

Como locomoção, a bactéria apresenta flagelos periplasmáticos e a quimiotaxia, que estimulam a orientação da bactéria através das proteínas quimiotáticas, assim, os sinais são transmitidos pela proteína que direciona a rotação flagelar, isso aumenta os sítios de contaminação (Dashper, 2011). Os LPS estimulam a osteoclastogênese (Choi et al., 2003). Dessa forma, os principais fatores de virulência desse organismo são a motilidade e quimiotaxia que permite que propagação da presença da bactéria, capacidade de associação com outras bactérias e produção de toxinas que permite sua longevidade e comprometimento imunológico do hospedeiro (Dashper et al., 2011).

## 1.2 Prevenção e tratamento

Os problemas bucais sofrem influência de fatores sociais e do estilo de vida, assim a prevenção da doença está relacionada a capacitação e participação do indivíduo no controle dos determinantes que desencadeiam a doença (Løe, 2000). Dessa forma, o direcionamento correto sobre a escovação e a motivação do paciente no interesse pelo cuidado bucal são atividades educativas que permitem a prevenção das doenças e uma mudança dos hábitos deletérios (Sgan-Cohen, 2005).

O desenvolvimento da doença periodontal está intimamente relacionado à higiene bucal insuficiente (Petersen, Ogawa, 2012), associado aos microrganismos presentes no biofilme (Socransky et al., 1998), porém não é o único fator que deve ser abordado para a obtenção e manutenção da saúde periodontal (Lang, Bartold, 2018). Países desenvolvidos possuem hábitos mais saudáveis incluindo uma higiene regular e a utilização de dentifício fluoretado (Tseveenjav et al., 2011), hábitos menos frequente em países de renda inferior, pela falta de informação (Amin, AI-Abad, 2008).

Existem outros fatores com associação direta ao favorecimento do desenvolvimento da doença periodontal, entre eles o tabagismo, uma vez que este altera os fatores de resposta microbiana, resposta imune e as células, já que seus componentes possuem um caráter tóxico a elas (Johnson, Hill, 2004). Também a diabetes, que possui uma relação bidirecional com a doença periodontal, e pode possibilitar a alteração na produção de colágeno e resposta do hospedeiro (Taylor George, 2001).

Dessa forma, métodos educativos e preventivos de acordo com as características de cada paciente, permitem o controle dos meios que desencadeiam a doença (Sgan-Cohen, 2005). Porém, quando a doença já está instalada, o tratamento mecânico é considerado o tratamento padrão, podendo ser realizado de maneira cirúrgica ou não cirúrgica. O objetivo do tratamento periodontal é controlar a infecção da área, a terapia periodontal não cirúrgica, raspagem e alisamento radicular, associado ao controle de placa, altera o ambiente subgingival microbiano e diminui o processo inflamatório, deixando a raiz livre dos depósitos bacterianos (Wennström et al., 2005). Já a terapia cirúrgica é utilizada para a redução de profundidade de sondagem, em níveis mais avançados da doença (Deas et al.,

2016). Mas o tratamento da doença não deve estar centrado apenas na remoção do biofilme e sim em todos os fatores que auxiliam no desenvolvimento da doença.

### 1.2.1 Tratamento adjunto

O tratamento adjunto é requisitado em ocasiões de maior comprometimento periodontal, bolsas profundas, envolvimento de furca e dificuldade no autocuidado (Bonito et al., 2005). Ele potencializa o efeito do tratamento convencional. Dessa forma, os antimicrobianos, enxaguatórios bucais e terapia fotodinâmica são alguns métodos utilizados associados ao tratamento tradicional.

Os compostos antimicrobianos visam alterar, reduzir ou eliminar a infecção, influenciando diretamente na resposta do hospedeiro. O uso desse método deve ser prudente, uma vez que possibilita o surgimento de bactérias resistentes, dificultando o tratamento (Slot, Ting, 2002). Os enxaguatórios bucais têm ação antiplaca e antimicrobiana. Nesse caso, o enxaguatório que apresenta grandes benefícios no tratamento adjunto é a clorexidina (James et al., 2017).

A terapia fotodinâmica também pode ser utilizada como adjunto no tratamento periodontal, controlando as bactérias subgingivais, por inativação de células, microrganismos ou moléculas, induzida pela luz (Christodoulides et al., 2008).

A utilização de produtos naturais também tem apresentado características e benefícios frente às agressões bucais. As substâncias presentes apresentam potencial na produção de formulações para modificarem a ocorrência da doença (Freires, Rosalen, 2016). Por fim, podem ser métodos que auxiliam na manutenção da saúde, na eliminação de fatores locais e no tratamento periodontal de suporte. Desse modo, a utilização desses mecanismos complementam o controle mecânico.

#### 1.2.1.1 Produtos naturais

O tratamento periodontal tem como função proporcionar o restabelecimento da saúde, porém, se os mecanismos de prevenção da doença não forem abordados e acompanhados, podem permitir que a doença se estabeleça novamente. Logo, os produtos naturais podem ser uma maneira de controlar a recorrência da doença (Sgan-Cohen, 2005).

Dentre as substâncias que possuem propriedades para serem usadas na DP está o própolis (Gebara et al., 2002), o alho (Bakri, Douglas, 2005), óleo de *Leptospermum scoparium* J.R.Forst. & G.Forst. (manuka), óleo de *Melaleuca linariifolia* var. *alternifolia* Maiden & Betche (tea tree) (Takarada et al., 2004), *Lippia sidoides* Cham. conhecida como alecrim pimenta e a *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira do sertão) (Botelho et al., 2007). O própolis possui atividade antimicrobiana contra as bactérias *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Pg*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Porém, a dificuldade da utilização desse componente está na composição química que pode variar de acordo com o local produzido (Gebara et al., 2002). *Allium sativum* (alho), tem efeito sobre *C. albicans* e algumas bactérias Gram-negativas como *Pg* e *P. intermedia*, e menos em Gram-positiva. Há evidências iniciais de que a arginina e a lisina de *Pg* são inibidas pelo alho (Bakri, Douglas, 2005).

O óleo de *L. scoparium* (manuka) e o óleo de *M. alternifolia* (tea tree), são óleos essenciais, com função antibacteriana, que impedem o crescimento e adesão bacteriana de *Pg* e *Streptococcus mutans* (Takarada et al., 2004) *L. sidoides* (alecrim pimenta) e a *M. urundeuva* (Aroeira do sertão) foram testadas separadamente e juntas, comprovando que têm efeito anti-inflamatório, antimicrobiano e que previnem a reabsorção óssea, porém segundo o autor mais estudos devem ser realizados (Botelho et al., 2007). Assim, medicamentos fitoterápicos têm muitos benefícios que podem ser utilizados como coadjuvante no tratamento e manutenção da saúde periodontal.

### 1.3 *Limonium brasiliense*.

*Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), popularmente conhecida como Baicuru ou Guaicuru (Fenner et al., 2006), é encontrada na região Sul do Brasil, na Argentina e Uruguai (Calcarea et al., 2017). *L. brasiliense* possui seus princípios ativos nos rizomas, que são empregados popularmente e também como atividade anti-inflamatória (Moura et al., 1985), antioxidante (Murray et al., 2004) e antimicrobiana (Blainski et al., 2017). Mais recentemente, foi demonstrado, em estudo *in vitro*, sua ação inibitória sobre a adesividade de *Pg*, com as células epiteliais humanas da linhagem KB. Tal ação

antimicrobiana foi atribuída aos ácido gálico, epigallocatequina-3-*O*-galato, Samarangeninas A e B principais componentes presentes no extrato acetona:água de *L. brasiliense* (Caleari et al., 2017). Estes estudos mostram que as atividades biológicas até o momento atribuídas ao *L. brasiliense* são favoráveis para o desenvolvimento de produtos para o tratamento da doença periodontal.

#### 1.4 Justificativa

Tendo em vista que os compostos do extrato da planta *L. brasiliense* apresentam efeito bacteriostático, anti-inflamatória e antioxidante *in vitro* e, portanto, têm potencial para interferir no desenvolvimento da DP, este estudo tem como meta a continuidade dos estudos *in vitro* que relacionam o extrato da planta a uma ação anti-inflamatória e antibacteriana. Considerando a alta incidência da doença periodontal, e os efeitos adversos dos antibióticos utilizados no tratamento da doença, o extrato possibilitaria um melhor controle da DP com menores efeitos colaterais, acarretando uma melhora significativa do quadro de saúde bucal pública.

#### 1.5 Objetivos

##### 1.5.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar ação do extrato de *L. brasiliense* na inibição da doença periodontal.

##### 1.5.2 Específico

Avaliar histologicamente a ação do gel contendo extrato de *L. brasiliense* na inflamação dos tecidos periodontais;

Avaliar histologicamente a ação do gel contendo extrato *L. brasiliense* na destruição das fibras transeptais;

Avaliar histologicamente a ação do gel contendo extrato *L. brasiliense* na perda óssea periodontal.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Amin TT, Al-Abad BM. Oral hygiene practices, dental knowledge, dietary habits and their relation to caries among male primary school children in Al Hassa, Saudi Arabia. *Int J Dent Hyg.* 2008 Nov;6(4):361-70.

Bakri IM, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Oral Biol. Arch Oral Biol.* 2005 Jul;50(7):645-51.

Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol 2000.* 2013 Jun; 62 (1): 203-17.

Blainski A, Gionco B, Oliveira AG, Andrade G, Scarminio IS, Silva DB, Lopes NP, Mello JCP. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design. *J Ethnopharmacol.* 2017 Feb;198:313-323.

Bonito AJ, Lux L, Lohr KN. Impact of local adjuncts to scaling and root planning in periodontal disease therapy: a systematic review. *J Periodontol.* 2005 Aug;76(8):1227-36.

Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 2012 Aug;333(1):1-9.

Botelho MA, Rao VS, Carvalho CB, Bezerra-Filho JG, Fonseca SGC, Vale ML, Montenegro D, Cunha F, Ribeiro RA, Brito GA. Lippia sidoides and Myracrodruon urundeuva gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007 Sep;113(3):471-8.

Caleare AO, Hensel A, Mello JC, Pinha AB, Panizzon GP, Echtenberg M, Petereit F, Nakamura CV. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia.* 2017 Apr;118:87-93.

Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, Madianos P, Louropoulou A, Machtei E, Donos N, Greenwell H, Van Winkelhoff AJ, Eren Kuru B, Arweiler N, Teughels W, Aimetti M, Molina A, Montero E, Graziani F. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015 Apr;42 Suppl 16:S71-6.

Choi BK, Lee HJ, Kang JH, Jeong GJ, Min CK, Yoo YJ. Induction of osteoclastogenesis and matrix metalloproteinase expression by the lipooligosaccharide of *Treponema denticola*. *Infect Immun*. 2003 Jan;71(1):226-233

Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rössler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2008 Sep;79(9):1638-44.

Dashper SG , Seers CA , Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res*. 2011 Jun;90(6):691-703.

Deas D, Moritz AJ, Sagun JRS, Gruwell SF, Powell CA. Scaling and Root Planing vs. Conservative Surgery in the Treatment of Chronic Periodontitis. *Periodontol 2000*. 2016 Jun; 71 (1): 128-39.

Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010 Jun;53:28-44.

Fenner R, Betti AH, Mentz, AM, Rates MK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifungica. *Rev Bras Cienc Farm*. 2006 July/Sept; 42(3):269-394.

Freires IA, Rosalen PL. How natural product research has contributed to oral care product development? A critical view. *Pharm Res*. 2016 Jun;33(6):1311-7.

Gebara ECE, Lima LA, Mayer MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz. J. Microbiol*. 2002 Oct/Dec;33(4):365-369.

Harvey JD. Periodontal microbiology. *Dent Clin North Am.* 2017 Apr;61(2):253-269.

Hasebe A, Yoshimura A, Into T, Kataoka H, Tanaka S, Arakawa S, Ishikura H, Golenbock DT, Sugaya T, Tsuchida N, Kawanami M, Hara Y, Shibata K. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infect Immun.* 2004 Mar; 72(3):1318-25.

James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, Whelton H, Philip Riley P. Chlorhexidine Mouthrinse as an Adjunctive Treatment for Gingival Health. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Mar;2017(3): CD008676.

Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol.* 2004; 75(2): 196-209.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Jun; 3:17038.

Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S9-S16.

Löe H. Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *Int Dent J.* 2000 Jun;50(3):129-39.

Moura TFAL, Schenkel EP, Schapoval EES, Simões CMO, Santo RI. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze-Plumbaginaceae (Baicuru). *Caderno de farmácia.* 1985;1(1):45-54.

Murray AP, Rodriguez S, Frontera MA, Tomas MA, Mulet MC. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z Naturforsch C.* 2004 Jul-Aug;59(7-8):477-80.

Nakayama M, Oharaa N. Molecular mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-host cell interaction on periodontal diseases. *Jpn Dent Sci Rev.* 2017 Nov; 53(4): 134–140.

Organização Mundial da Saúde- OMS. Carta da Organização Mundial de Saúde, 1946.

Papapanou PN, Susin C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis underrecognized, over-diagnosed, or both? *Periodontol 2000*. 2017 Oct;75(1):45-51.

Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. 2012 Oct;60(1):15-39.

Puthengady Thomas B, Sun CX, Bajenova E, Ellen RP, Glogauer M. Modulation of human neutrophil functions in vitro by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Infect Immun*. 2006 Mar; 74 (3): 1954-7.

Sabet M, Lee SW, Nauman RK, Sims T, Um HS. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*. 2003 Dec;149(Pt 12):3617-27.

Sgan-Cohen HD. Oral hygiene: past history and future recommendations. *Int J Dent Hyg*. 2005 May;3(2):54-8.

Schmuck J, Beckert S, Brandt S, Löhr G, Hermann F, Schmidt TJ, Beikler T, Hensel A. Extract from *Rumex acetosa* L. for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial in vitro adhesion and of gingipains of *Porphyromonas gingivalis* by epicatechin-3-O-(4 $\beta$ →8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate). *PLoS One*. 2015 Mar;10(3):e0120130.

Sharma A. Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontol 2000*. 2010 Oct; 54(1): 106–116.

Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2002;28:106-76.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.

Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N, Honma K, Okuda K, Kato T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Feb;19(1):61-4.

Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*. 2001 Dec;6(1):99-112.

Tseveenjav B, Suominen AL, Hausen H, Vehkalahti MM. The role of sugar, xylitol, toothbrushing frequency, and use of fluoride toothpaste in maintenance of adults' dental health: findings from the Finnish National Health 2000 Survey. *Eur J Oral Sci*. 2011 Feb;119(1):40-7.

Wennström JL, Tomasi C, Bertelle A, Dellasega E. Full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant scaling and root planning as an initial approach in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Aug;32(8):851-9.

## CAPÍTULO II

# **Ação do gel de *Limonium brasiliense* no desenvolvimento da doença periodontal induzida em ratos.**

### **INTRODUÇÃO**

A doença periodontal é uma infecção que provoca inflamação dos tecidos de proteção e suporte dentário, sendo a principal causa de perda dentária em adultos (Kinane et al., 2017; Papapanou e Susin, 2017), impactando na qual idade de vida, por afetar a função e a estética do indivíduo (Papapanou et al., 2018; Reynolds, Duane, 2018). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a periodontite afeta até 60% da população mundial adulta (Demmer, Papapanou 2010; Papapanou e Susin, 2017), representando assim um problema de saúde pública.

A doença periodontal é multifatorial e a predisposição genética pode interferir no seu início e progressão (Sippert et al., 2013; Sippert et al., 2015; Zacarias et al., 2015; Tsuneto et al., 2019; Zacarias et al., 2019; de Alencar et al., 2020), entretanto, o biofilme dental é o seu principal fator etiológico (Socransky et al., 1998; Schumuch et al., 2015; Harvey, 2017). Este é formado por uma matriz orgânica de saliva, dieta do hospedeiro e bactérias. Os produtos das bactérias desse biofilme provocam uma resposta imuno-inflamatória que pode resultar em destruição dos componentes do periodonto, estimulando a perda óssea e perda de inserção, caracterizando a doença periodontal (Schumuch et al., 2015; Papapanou et al., 2018). Esta condição leva a sinais clínicos, que se desenvolvem como inchaço, sangramento gengival e mobilidade dentária (Papapanou, Susin, 2017).

A prevenção da doença periodontal é um desafio que há décadas vem sendo enfrentado, pelas consequências que essa doença gera no indivíduo. O tratamento mecânico e a utilização de substâncias químicas adjuntas à raspagem são as metodologias mais empregadas na prevenção e tratamento da doença periodontal (Chapple et al., 2015; Serrano et al., 2015). Entre as substâncias utilizadas, os produtos naturais já foram testados de

diversas formas (Chen et al., 2014), devido aos seus componentes e às suas propriedades com potencial para modificar o desenvolvimento da doença (Freires et al., 2016).

O *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), popularmente conhecido como Baicuru ou Guaicuru (Fenner et al., 2006), é encontrada na região Sul do Brasil, na Argentina e Uruguai (Caleare et al., 2017). Possui atividade anti-inflamatória (Moura et al., 1985), antioxidante (Murray et al., 2004) e, mais recentemente, foi demonstrado, em estudo *in vitro*, sua ação inibitória sobre a adesividade de *Porphyromonas gingivalis*, a principal bactéria causadora da doença periodontal, com as células epiteliais humanas da linhagem KB. Tal ação antimicrobiana foi atribuída aos polifenóis (ácido gálico, epigallocatequina-3-*O*-galato, Samarangenina A e Samarangenina B) presentes no extrato acetona:água da *L. brasiliense* (Caleare et al., 2017). Estes estudos mostram que as atividades biológicas até o momento atribuídas ao *L. brasiliense* são favoráveis para tratamento da doença periodontal. Entretanto, a literatura carece de estudos pré-clínicos, *in vivo*, para comprovar sua eficácia na prática. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar ação do gel à base de extrato acetato de etila de *L. brasiliense* na inibição da doença periodontal induzida experimentalmente.

## MATERIAIS E MÉTODO

Todos os procedimentos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA N° 8930141118) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e estão de acordo com o artigo 8 da Lei Federal 11.794/2008.

### Droga vegetal

Os rizomas de *Limonium brasiliense* foram adquiridos na Ilha dos Marinheiros (31°59'33"S, 52°10'43"W) na cidade Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil, em maio de 2010. Exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob número HUEM 21151 e identificada pela Profa. Dra. Lilian Auler Mentz, UFGR. O material vegetal foi coletado com permissão do IBAMA-SISBIO e registrado sob número 11995-3 em 2 de novembro de 2010, código de autenticação 46367613, sob responsabilidade de J. C. P. Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registrado pelo número 010252/2015-0. A droga vegetal foi seca em estufa de circulação de ar em temperatura de  $37 \pm 2$  °C, em seguida moída em

moinho de martelos (Tigre ASN-6). O preparo do extrato bruto e das frações acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ) foram realizados de acordo com Blainski et al. (2013).

#### Preparação do gel de *Limonium brasiliense*

Na preparação do gel base foi utilizado Carbopol 974P 0,5%, Trietanolamina (1%) e água destilada (q.s.p.). A clorexidina 0,12% ou a fração acetato de etila de *L. brasiliense* à 0,5% ou 1% ou 2% foram incorporados no gel base, de acordo com a formulação desejada. O gel base foi utilizado como controle negativo.

#### Experimentação animal

Foram utilizados ratos Wistar machos jovens adultos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), com cerca de 65 dias de idade, provenientes do biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais permaneceram em gaiolas em condições controladas de temperatura, com ciclos claro/escuro de 12h, ração balanceada Nuvital (Nuvilab, Curitiba; Brasil) e água *ad libitum*.

Para induzir a doença periodontal, os animais foram anestesiados, via intramuscular, com uma associação 1:1 de cloridrato de xilazina 2% (20 mg/kg de peso do animal) (Rompun, Bayer, São Paulo, Brasil) e cetamina 10% (100 mg/ kg de peso do animal) (Agener, São Paulo, Brasil).

A doença foi induzida por meio da colocação de ligadura de algodão nº 10 (Coats Corrente, São Paulo, Brasil) no sulco gengival nos segundos molares (Holzhausen et al., 2004) superiores, de cada rato (Figura 1). A ligadura foi instalada com o auxílio de um espaçador endodôntico (Dentsply Maillefer, Tulsa, OK), para a separação dos dentes, e de uma espátula simples 24F (S.S.White / Duflex, Rio de Janeiro, Brasil) para o correto posicionamento do fio no sulco gengival. A ligadura permaneceu em íntimo contato com os tecidos gengivais, ficando com o nó voltado para a face palatina e sendo mantido durante todo o período experimental. Esse método permite o acúmulo de biofilme e desenvolvimento da periodontite (Cintra et al., 2014).



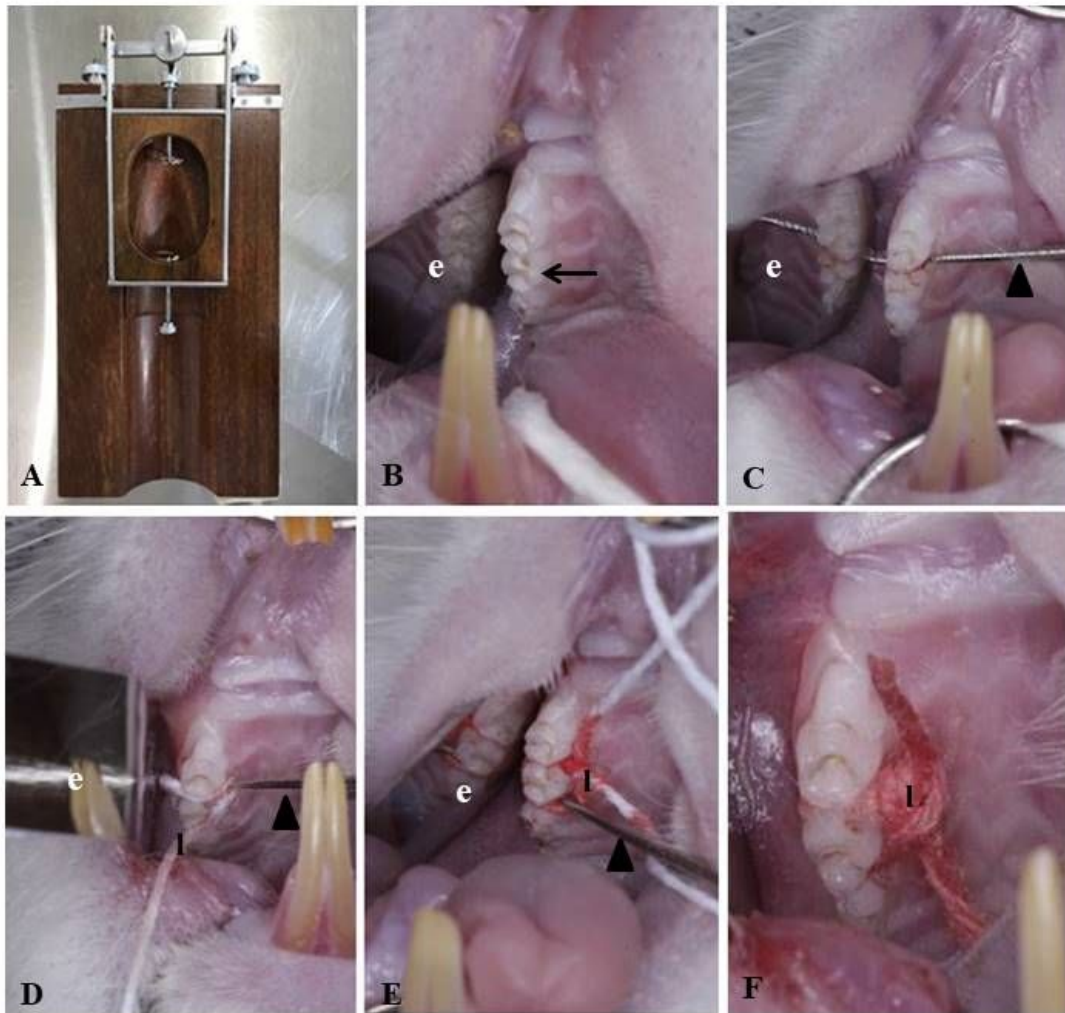


Figura 1: Fotografias ilustrando o procedimento de indução da doença periodontal, por meio da colocação de ligadura de algodão, no segundo molar superior de ratos Wistar. Em (A), mesa de procedimentos, para posicionar o animal e manter a cavidade oral aberta. (B) Visão palatina dos molares superiores. A seta indica o segundo molar. (C) Inserção do espaçador endodôntico (cabeça de seta) entre o primeiro e segundo molar para separação e posterior passagem da ligadura de algodão. (D) Passagem da ligadura (l) entre o primeiro e segundo molar (mesial). Em (E) observar a passagem da ligadura entre o segundo e terceiro molar (distal) e seu posicionamento no sulco gengival. (F) Fixação da ligadura por meio de nó, voltado para a face palatina. e= espátula utilizada para afastamentos dos tecidos e auxílio na colocação do fio.

O tratamento foi iniciado imediatamente após a colocação da ligadura. Para a aplicação do gel, foi utilizado um aplicador tipo *microbrush* durante um minuto, duas vezes ao dia, até o dia da eutanásia, que ocorreu no décimo primeiro dia (Botelho et al., 2007; Botelho et al., 2009). As ligaduras foram verificadas diariamente e refeitas quando necessário. Durante o tratamento os animais foram mantidos sedados por inalação de isoflurano, em câmara anestésica.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos.

- Grupo 1 (Controle negativo - n=2): sem indução da doença;
- Grupo 2 (Sem tratamento - n=4): ligadura, sem aplicação de nenhuma substância;
- Grupo 3 (Controle positivo - n=4): ligadura e tratamento com gel de clorexidina 0,12%;
- Grupo 4 (Veículo - n=2): ligadura e aplicação de gel base;
- Grupo 5 (Limonium 0,5% - n=4): ligadura e tratamento com gel de *L. brasiliense* 0,5%;
- Grupo 6 (Limonium 1% - n=4): ligadura e tratamento com gel de *L. brasiliense* 1%;
- Grupo 7 (Limonium 2% - n=4): ligadura e tratamento com gel de *L. brasiliense* 2%

Foram utilizados 22 ratos e 24 dentes. Para os grupos 2 e 4 foram utilizados os mesmos animais. No primeiro caso, com 4 molares, e no segundo, apenas dois molares.

No dia da eutanásia, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilazina 2% (20 mg/kg de peso do animal) (Rompun, Bayer, São Paulo, Brasil) e cetamina 10% (100 mg/ kg de peso do animal) (Agener, São Paulo, Brasil), para a remoção da ligadura, com o animal ainda vivo, seguido da administração da sobredose de anestésico para eutanásia e coleta das amostras contendo os molares.

#### *Estudo histológico*

Para o estudo histológico, as maxilas foram removidas, fixadas em paraformaldeído 4% por 48h, descalcificadas em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%) entre 4 e 11 dias e a seguir processadas para inclusão em parafina. Foram feitos cortes

seriados de 7µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina. Para a análise microscópica, os cortes foram observados em microscópio Nikon Eclipse (Tóquio, Japão) acoplado com câmera Nikon (Ds-Fi1c, Shimjuku, Japão).

O estudo morfológico foi realizado com a finalidade de descrever as principais características histopatológicas na região periodontal, resultantes da indução da doença.

Uma avaliação semi-quantitativa, empregando escores, foi realizada para avaliar o processo inflamatório gengival, a reabsorção das fibras transeptais e do osso alveolar. Um total de 120 cortes foram analisados, sendo 5 cortes por animal. As análises foram feitas nos cortes que apresentaram as raízes mesial e distal íntegras e com a região apical presente.

Para avaliar a presença ou ausência de inflamação, foram analisadas as regiões mesial, de furca e distal. Para qualificar a inflamação foram atribuídos escores de 0 a 3, de acordo com a Quadro 1 abaixo.

Quadro 1: Escores empregados para avaliação da inflamação gengival

Escore	Qualificação
0	<b>sem inflamação:</b> ausência de infiltrado inflamatório
1	<b>inflamação leve:</b> presença células inflamatórias, especialmente neutrófilos, com distribuição esparsa
2	<b>inflamação moderada:</b> maior concentração de neutrófilos (comparado ao escore 1), discreto aumento da vascularização
3	<b>inflamação intensa:</b> grande concentração de neutrófilos (maior basofilia em comparação com escore 2), presença de macrófagos, vasos hiperêmicos e edema

A destruição da fibra transeptal foi avaliada nas regiões mesial e distal, acima da crista óssea, de acordo com os seguintes critérios (Quadro 2).

Quadro 2: Escores empregados para avaliação da destruição das fibras transeptais

Escore	Qualificação
1	<b>fibras transeptais íntegras</b> cruzando completamente o espaço entre o cimento supra alveolar de dentes vizinhos
2	fibras transeptais <b>cruzando parcialmente</b> o espaço entre os dentes
3	<b>ausência</b> completa das fibras transeptais

A destruição da crista óssea alveolar foi classificada nas regiões mesial e distal, de acordo com os seguintes critérios (Quadro 3).

Quadro 3: Escores empregados para avaliação da destruição da crista óssea alveolar

Escore	Qualificação
1	<b>ausência de destruição</b> , cristas ósseas íntegras até a altura do terço cervical da raiz
2	presença de destruição da crista óssea até a altura do <b>terço médio da raiz</b>
3	presença de destruição da crista óssea até a altura do <b>terço apical da raiz</b>
4	<b>destruição completa</b> das crista óssea alveolar

Na região de furca o osso alveolar foi classificado em escores de acordo com os seguintes critérios apontados no Quadro 4.

Quadro 4: Escores empregados para avaliação da destruição do osso alveolar

Escore	Qualificação
1	<b>ausência de destruição</b> , altura óssea íntegra até o terço cervical da raiz
2	presença de destruição óssea até a altura do <b>terço médio da raiz</b>
3	presença de destruição óssea até a altura do <b>terço apical da raiz</b>
4	<b>destruição completa</b> do osso alveolar na região

## RESULTADOS

As análises microscópicas mostraram que a colocação da ligadura promoveu em todos os grupos estudados, o desenvolvimento de doença periodontal, caracterizada por inflamação e comprometimento do periodonto de inserção. Todos os dentes que receberam algum tipo de tratamento apresentaram alterações estruturais, características da doença, em seu periodonto de inserção. Por esta razão, as observações histológicas serão descritas em conjunto (Figura 2). As análises microscópicas mostraram que após o período de 11 dias da colocação da ligadura ao redor do segundo molar superior houve o desenvolvimento de reação inflamatória subepitelial com desenvolvimento de edema. A gengiva não estava aderida ao dente, e em muitas áreas foi observado um espaço de variável profundidade entre o dente e a gengiva, típico de bolsa periodontal.

O padrão de resposta inflamatória foi predominantemente polimorfonuclear e com a presença de macrófagos. A intensa resposta inflamatória esteve frequentemente associada à ulceração papilar e desaparecimento das fibras transeptais. A perda da inserção, resultante do desaparecimento das fibras periodontais, ocorreu paralelamente às variações na quantidade de osso alveolar, cuja destruição evoluiu desde a redução parcial na altura das cristas até o desaparecimento completo. Um aumento na atividade osteoclástica também foi observado.

Foram observados defeitos do tipo cratera nas raízes mesial e distal e as lesões eram preenchidas por células inflamatórias.

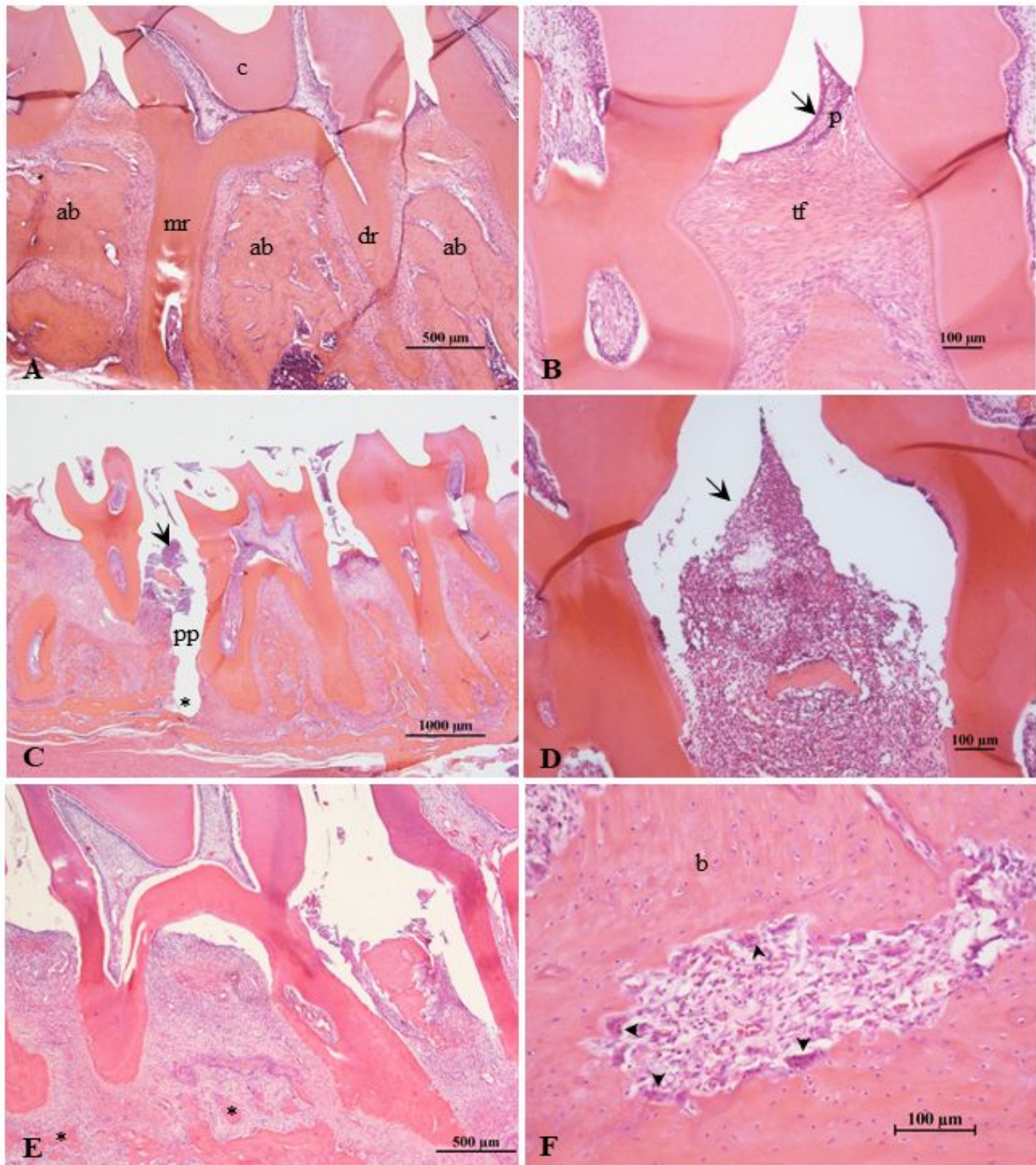


Figura 2. Fotomicrografia da maxila de ratos Wistar. Em (A e B), o controle negativo, sem ligadura e (C, D, E e F) após colocação de ligadura de algodão no segundo molar superior, para indução de doença periodontal. Em (A) observar na região do segundo molar a integridade das cristas alveolares (ab) adjacentes às raízes mesial (mr) e distal (dr). Em (B), no detalhe da papila interdental (p), notar a integridade do epitélio oral (seta) e das fibras transeptais (tf). Em (C), no grupo sem tratamento, observar a ulceração na papila interdental (seta), desenvolvimento de bolsa periodontal (pp) e reabsorção da crista alveolar na distal (\*). Em (D), região da papila interdental na mesial após tratamento com gel de *L. brasiliense* 1%, observar ausência de epitélio (seta) e infiltrado inflamatório em área ulcerada. Em (E), o segundo molar, após tratamento com gel de *L. brasiliense* 0,5%, observar



o desaparecimento do periodonto de inserção, com intensa reabsorção do osso alveolar (\*). Em (F), um detalhe do osso alveolar durante a reabsorção, com grande quantidade de osteoclastos (cabeça de seta). Coloração: hematoxilina e eosina.

Para que os resultados fossem os mais fiéis possíveis, quanto à intensidade da resposta inflamatória e da destruição óssea, as análises da região de furca foram apresentadas separadamente, porque a furca foi menos afetada pela doença periodontal induzida.

Os resultados das análises da inflamação nas regiões mesial/distal e da furca estão ilustrados nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Nas regiões mesial e distal (Figura 3), a inflamação esteve presente em todos os grupos com ligadura, em intensidades variadas e houve o predomínio do escore moderado. O grupo do gel de *L. brasiliense* 1% foi o único que não desenvolveu resposta inflamatória intensa, e também apresentou 12,5% de ausência de inflamação, sendo maior que todos os outros grupos. A região de furca apresentou uma resposta inflamatória menos intensa, em comparação com as regiões mesial e distal (Figura 4). Nesse local, os grupos *L. brasiliense* 0,5% e 2% apresentaram inflamação moderada enquanto nos demais grupos a inflamação foi classificada como leve. O gel de *L. brasiliense* a 1% foi o tratamento que proporcionou a maior frequência de inflamação leve e nenhum caso de inflamação intensa.

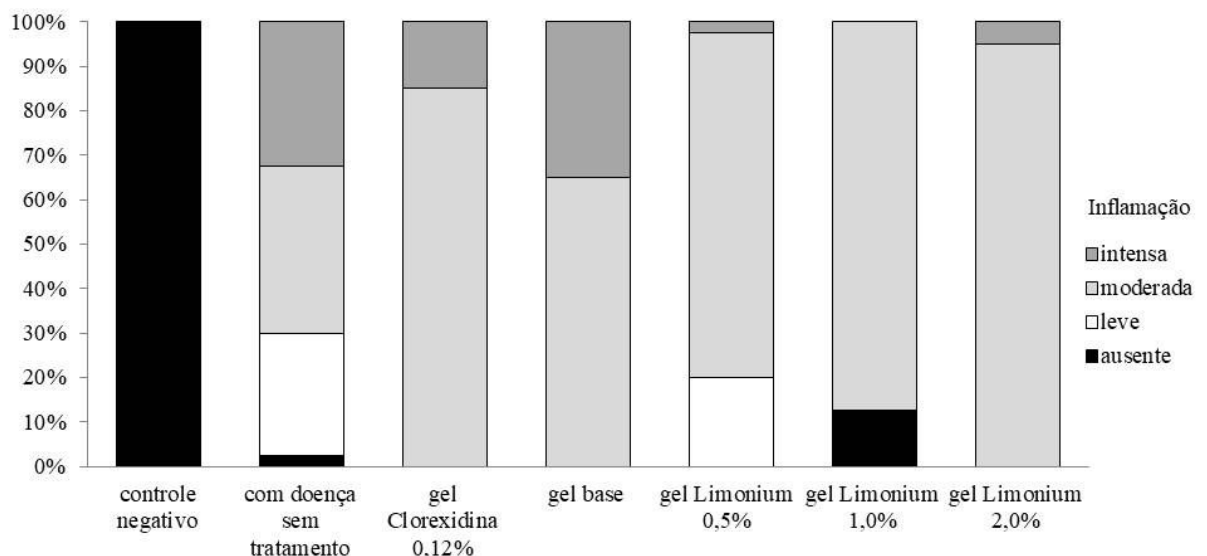


Figura 3. Distribuição de frequência da intensidade de inflamação nos tecidos periodontais na região mesial e distal do segundo molar superior, 11 dias após a colocação de ligadura de algodão para indução de doença periodontal em ratos Wistar. Controle negativo: sem ligadura e sem tratamento. Os demais grupos, representando as formas de tratamento, estão explícitos no eixo X da Figura.

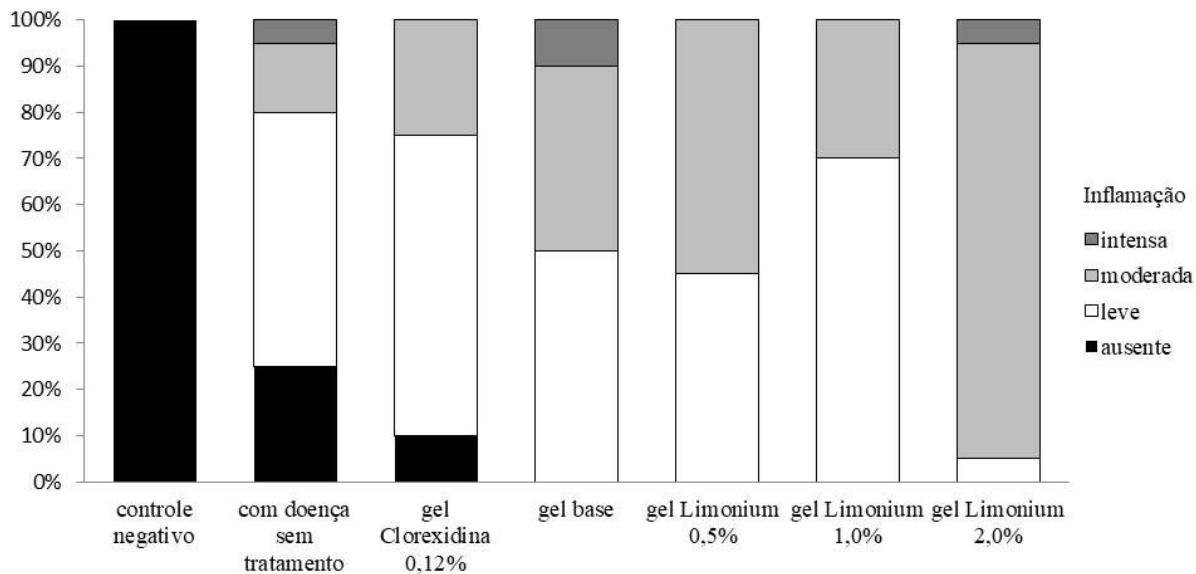


Figura 4. Distribuição de frequência da intensidade de inflamação nos tecidos periodontais na região de furca do segundo molar superior, 11 dias após a colocação da ligadura de algodão para indução de doença periodontal em ratos Wistar. Controle negativo: sem ligadura e sem tratamento. Os demais grupos, representando as formas de tratamento, estão explícitos no eixo X da Figura.

Em relação às fibras transeptais, com exceção do controle negativo, todos os grupos apresentaram maior frequência de ausência total das fibras, porém o grupo com gel de *L. brasiliense* a 1% foi o que apresentou maior proporção de casos com integridade total das fibras (Figura 5).

As Figuras 6 e 7 ilustram os resultados obtidos a partir da avaliação da reabsorção óssea nas regiões mesial/distal e de furca, respectivamente. Nas regiões mesial e distal houve predomínio de reabsorção total da crista óssea e na região de furca de reabsorção completa e no terço apical. Porém, em ambos os casos o grupo com gel de *L. brasiliense* a 1% foi o que apresentou menor proporção de casos com reabsorção completa e maior proporção de casos com reabsorções menores (até o terço médio).



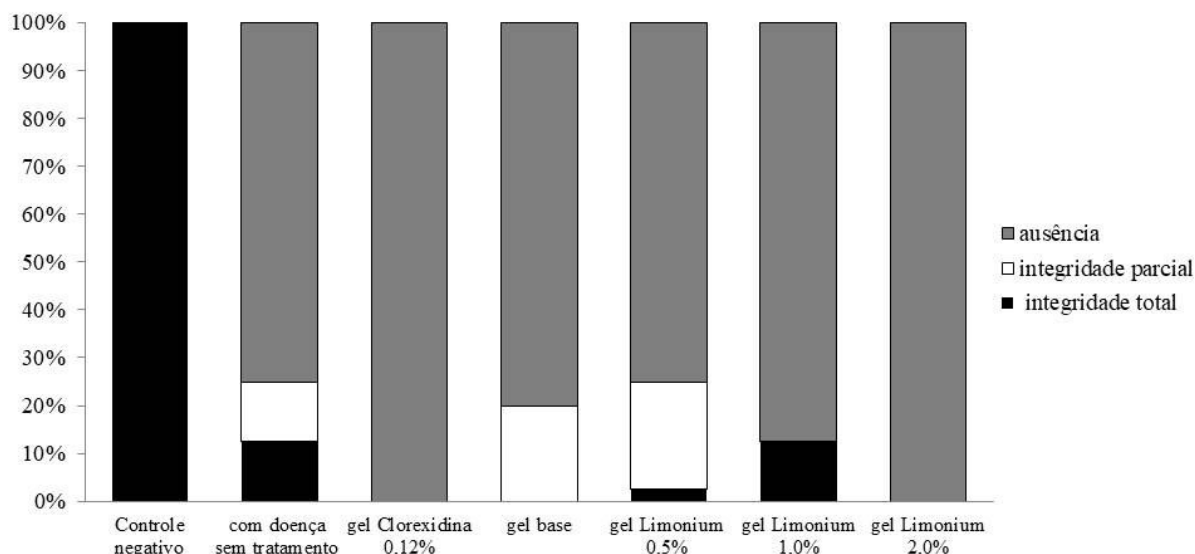


Figura 5. Distribuição de frequência de integridade das fibras transeptais localizadas acima da crista óssea na região do segundo molar superior, 11 dias após a colocação de ligadura de algodão para indução de doença periodontal em ratos Wistar. Controle negativo: sem ligadura e sem tratamento. Os demais grupos, representando as formas de tratamento, estão explícitos no eixo X da Figura.

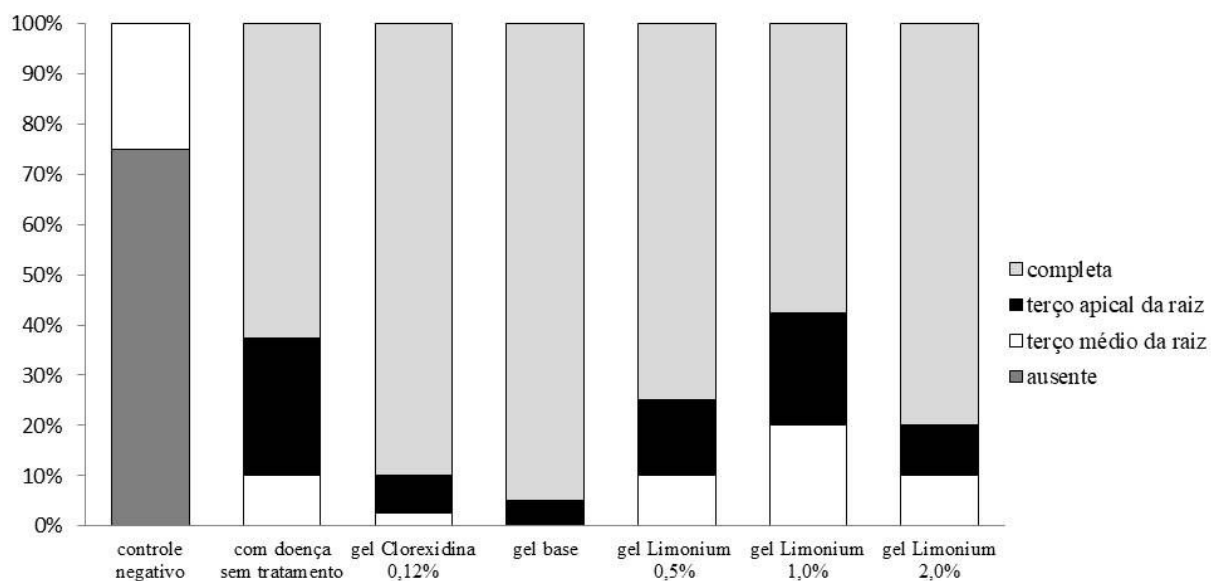


Figura 6. Distribuição de frequência de reabsorção das cristas alveolares nas regiões mesial e distal do segundo molar superior, 11 dias após a colocação de ligadura de algodão para indução de doença periodontal em ratos Wistar. Controle negativo: sem ligadura e sem tratamento. Os demais grupos, representando as formas de tratamento, estão explícitos no eixo X da Figura.

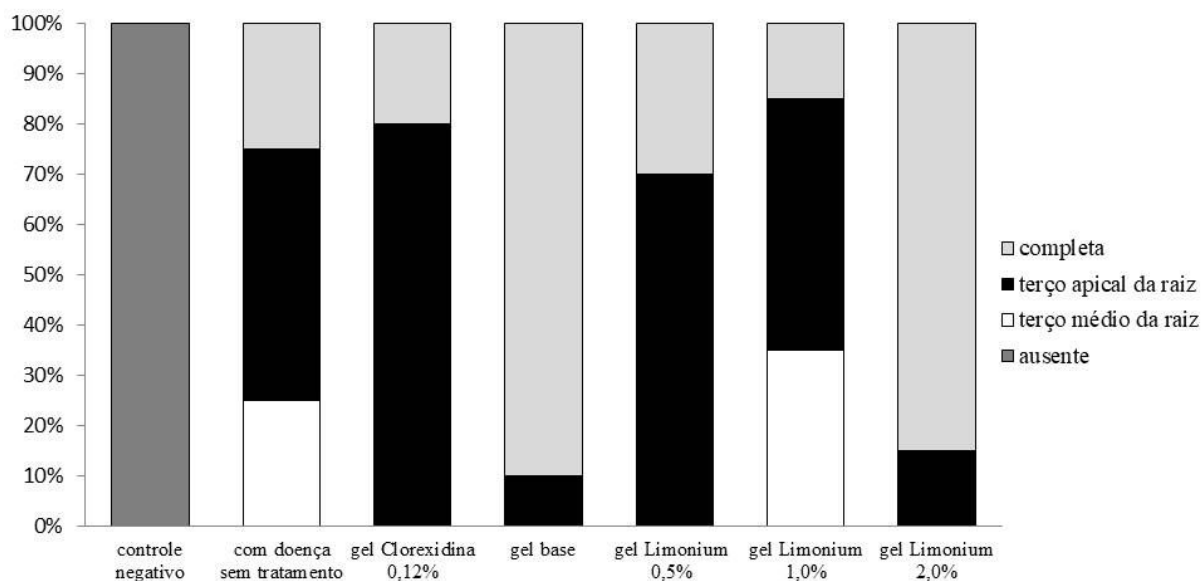


Figura 7. Distribuição de frequência de reabsorção das cristas alveolares nas região de furca do segundo molar superior, 11 dias após a colocação de ligadura de algodão para indução de doença periodontal em ratos Wistar. Controle negativo: sem ligadura e sem tratamento. Os demais grupos, representando as formas de tratamento, estão explícitos no eixo X da Figura.

## Discussão

A alta incidência de periodontite e as diferentes modalidades terapêuticas para recuperar a perda dos tecidos periodontais gera significativo interesse no aspecto histológico destes tecidos (Donos et al., 2000).

Neste estudo, foi avaliada a histologia de tecidos que compõem o periodonto de inserção e proteção após a indução da doença periodontal e tratamento, por meio de aplicação tópica, com um gel à base de *L. brasiliense*, em diferentes concentrações.

Os roedores, incluindo os ratos (*Rattus norvegicus*), têm sido usados como modelos para estudos na região oral, por apresentarem algumas similaridades com os humanos (Listgarten, 1975).

O modelo de indução de doença periodontal, por meio da colocação de ligadura no sulco gengival, tem o objetivo de provocar o acúmulo crescente de biofilme ao redor da ligadura. O início da periodontite é caracterizado pelo acúmulo de biofilme e ulceração do

epitélio juncional, levando à exposição da raiz ao ambiente oral (Donos et al., 2018). Este método apresentou a vantagem de promover a perda de osso alveolar em curto período de tempo, induzindo resposta inflamatória (Molon et al., 2014).

Neste estudo, a comparação histológica entre o controle negativo com os demais grupos estudados evidencia o sucesso no estabelecimento do modelo experimental. A ausência de inflamação e integridade das fibras transeptais sugerem ausência de doença periodontal. Um percentual de reabsorção da crista alveolar no controle negativo certamente está associado com o fenômeno fisiológico de erupção constante dos dentes nos ratos (Hoffman e Schour, 1940), que pode levar a um aumento na distância entre a junção cimento-esmalte e não ser claramente distinguido da destruição periodontal.

Os tratamentos empregados incluíram o uso de gel de clorexidina 0,12%, normalmente utilizado como padrão ouro no tratamento da doença periodontal em humanos, um gel base, sem substâncias ativas, e os géis a base de extrato de *L. brasiliense* nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0%.

O gel de clorexidina 0,12% não apresentou resultados satisfatórios em relação à prevenção da destruição das fibras transeptais e da crista óssea alveolar nas faces proximais, entretanto apresentou um escore predominantemente moderado, na resposta inflamatória, nas regiões proximais. Um estudo em ratos empregou também o modelo de ligadura no segundo molar superior e fez uso tópico de soluções aquosas de clorexidina a 0,2%, 0,8%, 1,4% e com água pura, por quatro semanas, duas vezes ao dia. Os resultados demonstraram que o tratamento com a clorexidina 0,8% e 1,4% foi efetivo em reduzir significativamente a perda da crista óssea alveolar nas proximais e reduzir a formação de bolsa periodontal (Kenworthy e Baverel, 1981). Ferreira-Fernandes et al. (2019) demonstraram, também em ratos, que o uso tópico da clorexidina 2,0%, por duas semanas, promoveu uma diminuição da inflamação no periodonto. Estes dados sugerem que a eficácia da clorexidina pode estar relacionada à sua concentração e tempo de tratamento. Na clínica odontológica, a clorexidina é usada na concentração de 0,12%, razão pela qual esta concentração foi adotada neste estudo.

O grupo veículo desenvolveu maior inflamação e reabsorção quando comparado aos outros grupos, o que pode ser atribuído, ao menos em parte, à metodologia de aplicação do gel que, no presente estudo, foi feito por meio de *microbrush*, enquanto outros trabalhos utilizaram *swabs* (Leonard e Mandel, 1979; Ferreira-Fernandes et al., 2019). A fricção mecânica de aplicadores com ponta de algodão pode ajudar na redução mecânica do biofilme

bacteriano da ligadura (Leonard e Mandel, 1979), influenciando no desenvolvimento da doença. Porém, o *microbrush* possui o centro firme e micro cerdas sintéticas ao redor, que pode ter apresentado efeitos semelhantes ao de uma escovação traumática em humanos, lesionando mecanicamente os tecidos periodontais da região (Fan e Caton, 2017; Sanz et al., 2015) e, como consequência, aumentando a resposta inflamatória. Dessa forma, não apenas o grupo veículo, mas também todos os outros grupos do *L. brasiliense* e da clorexidina podem ter sofrido influência da utilização do *microbrush*.

Não há estudos avaliando o efeito do extrato de *L. brasiliense* associado à doença periodontal, portanto este é um estudo pioneiro. O *L. brasiliense* possui como farmacógeno, os rizomas, que são empregadas popularmente na forma de infuso e decocto, como antiséptico, adstringente, diurético e anti-inflamatório. Também é empregado na normalização da menstruação (Moura et al., 1985). Sua ação antimicrobiana foi atribuída aos rizomas (Blainski et al., 2017). Recente estudo *in vitro* demonstrou a atividade concentração-dependente de um extrato água:acetona de *L. brasiliense* contra o potencial antiadesivo de *P. gingivalis* em células humanas KB e para a inibição da atividade proteolítica das gingipainas, o principal fator de virulência de *P. gingivalis* (Caleare et al., 2017), uma das principais bactérias relacionadas com a doença periodontal. Entretanto, a doença periodontal possui múltiplos microrganismos (Socransky et al., 1998; Schumuch et al., 2015; Harvey, 2017). Neste estudo, uma avaliação microbiológica das ligaduras de algodão (dados não mostrados) detectou apenas a presença de cocos e/ou cocobacilos Gram negativos.

A concentração na qual se obteve o melhor resultado sobre os parâmetros analisados neste estudo foi aquela com 1% do extrato. Na concentração de 2% foram encontrados os resultados menos satisfatórios, sugerindo que a concentração foi um fator determinante na resposta biológica. O gel de *Limonium* 0,5% parece ter um efeito menor do que o desejável na doença e, provavelmente, a concentração de 2% parece ultrapassar a ação benéfica e apresentar um efeito negativo. A atividade da planta de modo concentração-dependente e seu potencial anti-inflamatório (Moura et al., 1985) podem justificar o melhor resultado encontrado neste trabalho, com o extrato de *L. brasiliense* a 1%. A redução da inflamação na mesial, distal e furca comparado às outras concentrações do extrato, reflete uma redução na sinalização para a diferenciação dos monócitos circulantes, em osteoclastos (Menezes et al.,

2005), contribuindo desta forma, para uma menor destruição do osso alveolar, como observado neste estudo.

Mesmo não inibindo satisfatoriamente o desenvolvimento da doença periodontal, os resultados são promissores ao demonstrarem um efeito positivo do gel de *L. brasiliense* 1% no desenvolvimento da doença, diminuindo a inflamação e a destruição do osso alveolar. Novos estudos, empregando outras formas de indução da doença e de aplicação do extrato são necessários para reafirmar os resultados observados no presente estudo.

Este estudo mostrou que o gel de *L. brasiliense* 1% apresentou melhor resultado quanto à redução da intensidade da inflamação e destruição do osso alveolar, na doença periodontal induzida por ligadura. A clorexidina 0,12% não foi efetiva na prevenção. Conclui-se que o gel de *L. brasiliense* 1% apresentou o melhor resultado na evolução da doença periodontal, atenuando os seus efeitos deletérios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blainski A, Gionco B, Oliveira AG, Andrade G, Scarminio IS, Silva DB, Lopes NP, Mello JCP. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design. *J Ethnopharmacol.* 2017 Feb;198,313-323.

Blainski A, Lopes GC, Mello JC. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules.* 2013 Jun;18(6),6852-65.

Botelho MA, Martins JG, Ruela RS, Rachid I, Santos JA, Soares JB, França MC, Montenegro D, Ruela WS, Barros LP, Queiroz DB, Araujo RS, Sampio FC. Protective effect of locally applied carvacrol gel on ligature-induced periodontitis in rats: A tapping mode AFM study. *Phytother Res.* 2009 Oct;23(10),1439-48.

Botelho MA, Rao VS, Carvalho CB, Bezerra-Filho JG, Fonseca SGC, Vale ML, Montenegro D, Cunha F, Ribeiro RA, Brito GA. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007 Sep;113(3),471-8.

Caleare AO, Hensel A, Mello JC, Pinha AB, Panizzon GP, Lechtenberg M, Petereit F, Nakamura CV. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia.* 2017 Apr;118, 87-93.

Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, Madianos P, Louropoulou A, Machtei E, Donos N, Greenwell H, Van Winkelhoff AJ, Eren Kuru B, Arweiler N, Teughels W, Aimetti M, Molina A, Montero E, Graziani F. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2015 Apr;42 Suppl 16,S71-6

Chen Y, Wong RW, McGrath C, Hagg U, Seneviratne CJ. Natural compounds containing mouthrinses in the management of dental plaque and gingivitis: a systematic review. *Clin Oral Investig.* 2014 Jan;18(1),1-16.

Cintra LT, da Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Mogami Bomfim SR, Oliveira e Silva C, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho J.E. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *J Endod.* 2014 Aug;40(8),1139-44.

de Alencar JB, Zacarias JMV, Tsuneto PY, et al. Influence of inflammasome NLRP3, and IL1B and IL2 gene polymorphisms in periodontitis susceptibility. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227905.

Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2010 Jun;53,28-44.

Donos N, Park JC, Vajgel A, Farias BC, Dereka X. Description of the periodontal pocket in preclinical models: limitations and considerations. *Periodontology 2000.* 2018; 76, 16–34

Fan J, Caton JG. Occlusal Trauma and Excessive Occlusal Forces: Narrative Review, Case Definitions, and Diagnostic Considerations. *J Periodontol.* 2018 Jun; 89 Suppl 1, S214-S222

Fenner R, Betti AH, Mentz, AM, Rates MK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev Bras Cienc Farm.* 2006 July/Sept; 42(3),269-394.

Ferreira-Fernandes H, Barros MAL, Souza Filho MD, Medeiros JVR, Vasconcelos DFP, Silva DA, Pinto GR. Topical application of cashew gum or chlorhexidine gel reduces overexpression of proinflammatory genes in experimental periodontitis. *Int J Biol Macromol.* 2019 May; 128, 934-940

Freires IA, Rosalen PL. How Natural Product Research Has Contributed to Oral Care Product Development? A Critical View. *Pharm Res.* 2016 Jun; 33 (6), 1311-7

Harvey JD. Periodontal microbiology. *Dent Clin North Am.* 2017 Apr; 61(2),253-269.

Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res.* 2004 Jun; 39(3),188-93.

Hoffman M, Schour I. Quantitative studies in the development of the rat molar. American Journal of Orthodontics and Oral Surgery. 1940; 26(9), 854–874.

Kenworthy R, Baverel M. Studies of a Periodontal Tissue Lesion in the Rat, Untreated or Treated With Chlorhexidine Digluconate. J Clin Periodontol. 1981 Aug; 8 (4), 349-58

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. Nat Rev Dis Primers. 2017 Jun; 22;3,17038.

Leonard EP, Mandel EJ. Use of Chlorhexidine Gluconate to Prevent Bone Resorption in the Rice Rat. J Dent Res. 1979 Feb; 58 (2), 672

Listgarten MA. Similarity of Epithelial Relationships in the Gingiva of Rat and Man. J Periodontol. 1975 Nov; 46 (11), 677-80

Mello JP, Petereit F, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. Phytochemistry. 1996; 41(3), 807-813

Menezes, AMA, Rocha FAC, Chaves HV, Carvalho CBM, Ribeiro RA, Brito GAC. Effect of Sodium Alendronate on Alveolar Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. Journal of Periodontology. 2005 Nov; 76(11), 1901–1909.

Moura TFAL, Schenkel EP, Schapoval EES, Simões CMO, Santos RI. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss. Kuntze-Plumbaginaceae (Baicuru)). Caderno de farmácia. 1985; 1(1), 45-54

Molon RS, De Avila ED, Nogueira AVB, De Souza JAC, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, Cirelli JA. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. J Periodontol. 2014 Mar; 85(3), 465-77.

Murray AP, Rodriguez S, Frontera MA, Tomas MA, Mulet MC. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. Z Naturforsch C. 2004 Jul-Aug; 59(7-8), 477-80.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kebschull M, Kinane DF,



Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Periodontol. 2018 Jun;89 Suppl 1,S173-S182.

Papapanou PN, Susin C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? Periodontol 2000. 2017 Oct;75(1),45-51.

Reynolds I, Duane B. Periodontal disease has an impact on patients' quality of life. Evid Based Dent. 2018 Mar;19(1),14-15.

Sanz M, Bäumer A, Buduneli N, Dommisch H, Farina R, Kononen E, Linden G, Meyle J, Preshaw M, Quirynen M, Roldan S, Sanchez N, Sculean A, Slot ED, Trobelli L, West N, Winkel, E. Effect of professional mechanical plaque removal on secondary prevention of periodontitis and the complications of gingival and periodontal preventive measures. J Clin Periodontol. 2015 Apr; 42 Suppl 16, S214-20

Schmuck J, Beckert S, Brandt S, Löhr G, Hermann F, Schmidt TJ, Beikler T, Hensel A. Extract from *Rumex acetosa L.* for prophylaxis of periodontitis: inhibition of bacterial *in vitro* adhesion and of gingipains of *Porphyromonas gingivalis* by epicatechin-3-O-(4 $\beta$ →8)-epicatechin-3-O-gallate (procyanidin-B2-Di-gallate). PLoS One. 2015 Mar;10(3),e0120130.

Serrano J, Escribano M, Roldán S, Martín C, Herrera D. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol. 2015 Apr;42 Suppl 16,S106-38.

Sippert EÂ, Oliveira e Silva C, Ayo CM, Marques SB, Visentainer JE, Sell AM. HLA Haplotypes and genotypes frequencies in Brazilian chronic periodontitis patients. Mediators Inflamm, 2015,481656.

Sippert EÂ, Oliveira e Silva C, Visentainer JE, Sell AM. Association of duffy blood group gene polymorphisms with IL8 gene in chronic periodontitis. PLoS One. 2013;8(12),e83286.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2),134-44

Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *Open Dent J*. 2010; 4, 37–47.

Tsuneto PY, de Souza VH, de Alencar JB, et al. *IL18* Polymorphism and Periodontitis Susceptibility, Regardless of *IL12B*, *MMP9*, and Smoking Habits. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:9585964.

Zacarias JMV, de Alencar JB, Tsuneto PY, et al. The Influence of *TLR4*, *CD14*, *OPG*, and *RANKL* Polymorphisms in Periodontitis: A Case-Control Study. *Mediators Inflamm*. 2019;2019:4029217.

Zacarias JM, Sippert EÂ, Tsuneto PY, Visentainer JE, Silva CO, Sell AM. The influence of interleukin 17A and IL17F polymorphisms on chronic periodontitis disease in Brazilian patients. *Mediators Inflamm*. 2015;2015,147056.

