



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Avaliação da atividade biológica e farmacológica e formulação tópica de Gel Dental do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* L. Poit

Mônica Silveira Paixão

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2012

MÔNICA SILVEIRA PAIXÃO

Avaliação da atividade biológica e farmacológica e formulação tópica de Gel Dental do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* L. Poit

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe, RENORBIO/SE, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Paixão, Mônica Silveira
P149a Avaliação da atividade biológica e farmacológica e formulação
tópica de gel dental do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* L. Poit /
Mônica Silveira Paixão ; orientador Lucindo José Quintans Junior.
– São Cristóvão, 2012.
150 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de
Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal de Sergipe,
2012.

1. Biotecnologia – Aplicações médicas. 2. Doença periodontal.
3. *Hyptis pectinata*. 4. Higiene dental. I. Quintans Junior, Lucindo
José, orient. II. Título.

CDU 606:616.314.17:582.949

MÔNICA SILVEIRA PAIXÃO

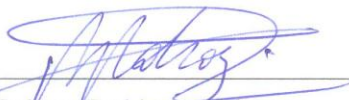
*Avaliação da atividade biológica e farmacológica e formulação
tópica de Gel Dental do extrato aquoso da Hyptis pectinata L. Poit*

Conceito: A

EXAMINADORA



Prof. Dr. Lucindo José Quintans Junior (orientador)
Universidade Federal de Sergipe-UFS



Prof. Dr. Roberto Rodrigues de Sousa
Universidade Federal de Sergipe-UFS



Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim
Universidade Federal de Sergipe-UFS



Profª. Drª. Liane Maciel de Almeida Souza
Universidade Federal de Sergipe-UFS



Profª. Drª. Maria de Fátima Arrigoni-Blank
Universidade Federal de Sergipe/UFS

Dedicatória

Eu dedico este trabalho:

Ao meu filho LUCAS, pelo carinho, apoio e exemplos de lealdade, amor e fraternidade.

A minha mãe ANA MARIA, pelos exemplos de vida, pelos ensinamentos na área médica e pelo apoio em todos os setores da minha vida.

Às minhas avós Nivalda e Pedrozina (ambas *in memoriam*), que me ensinaram o valor da ética na vida de um ser humano.

Ao meu pai Valtércio e aos meus irmãos Valtércio, Ana Valéria e Clara Angélica, pela compreensão, torcida e carinho dedicados a mim.

Aos meus tios João Alberto, Maurício, Maria José e Jorge e aos meus primos Iandra, Ianto, Jorge, André (exemplo de dedicação aos estudos), Dany, Gabí, Gliciane, Glícia, Gliçan, Patrícia, Pricila, Paula, Thiago, Fábio e João. Também a minha Tia Naia, por me acolher com tanto carinho em Fortaleza.

Aos meus sobrinhos Celinho, Paula, Kalil, Gabriel e Ana Beatriz, com os quais aprendo diariamente o verdadeiro sentido da família.

Agradecimentos

A Deus, por nos colocar exatamente onde devemos estar!

Ao prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior, meu orientador, por ter aberto as portas do seu laboratório para a parceria com a Odontologia.

Ao prof. Dr. Charles Santos Estevam, pai científico de incontáveis alunos...

À Prof^a Dr^a Brancilene Silva, pelo desprendimento e presteza em todos os momentos da minha pesquisa. Pelas co-orientações sobre antioxidantes, estatística, elaboração de artigos científicos em Biotecnologia, etc. Muito obrigada, Branci!

Aos professores Dr. Adriano Antunes e Dr^a. Francilene Amaral, pelo apoio no desenvolvimento dos géis.

Ao Prof. Dr. Roberto Rodrigues, coordenador do RENORBIO/SE, pela amizade, confiança e apoio a todos os doutorandos.

Ao Prof. Dr. Marco Botelho, por ter nos ensinado a induzir a doença periodontal experimental em ratos.

Aos professores e amigos Murilo Marchioro, Leonardo Bonjardim, Edilson Divino, Rita Trindade, Arie Blank, Fátima Blank e tantos outros que sempre me incentivaram.

Aos colegas e amigos do doutorado: Fabrício (SE), Jeison (SE), Clóvis (SE), Jacira (PE), Maria Helena (PE), Lidiane (PE), Silvanito (SE), Marcos Vinícius (MG), Fabio (SE), Sérgio (SE), Patrícia (SE), Dângelli (SE), Mônica Batista (SE), Venâncio (SE), Marco Aurélio Salvino (BA), Andrea (SE), Magna (SE), Elisângela (SE), Sheyla (SE), Fabio Neves (SE) e Celia (SE) por tudo que passamos juntos. Na certeza de que a “nossa” frase é verdadeira: “E TODO SOFRIMENTO SE TRANSFORMARÁ EM RECORDAÇÃO”...

Aos mestres Aloysio Carvalho e Denise Viana (SODIC) pela generosidade, amizade, simpatia, competência e tantos outros adjetivos que nos uniram como amigos e colegas de profissão. E, principalmente, por terem deixado suas tarefas habituais para me ajudar na Tomografia Computadorizada dos ratos.

A colega e amiga Dr^a Edith Paixão, ex-professora do Departamento de Odontologia/UFS, pelos sábios ensinamentos na arte dentária.

Ao colega e amigo Clóvis Franco, primeiro Doutor RENORBIO/UFS, com sua sabedoria singular, por ter me ensinado que nunca é tarde para se conseguir o que quer. Clóvis é, sem dúvida, modelo para muitas gerações de doutores.

Aos amigos Mônica Melo, Marília, Geovana, Makson, Adriana Gibara, Aldirene, Douglas, Jeison, Simone, Michele, Juliana, Rosana, Renan, Barretinho, Allancardi, ... e tantos outros, por dividirem comigo a alegria de ser um ALUNO LAPEC.

Aos alunos do Laboratório de Bioquímica (sob a responsabilidade do prof. Dr. Charles): Antonio, Nicole, Chris, Dani, Ximene, André, Jimmis, Marcel, Davi, Rodolfo, Matheus, Silvan, Yasmin, Amanda, Carla, pela valiosa colaboração nos experimentos envolvendo fitoquímica, antioxidantes e HPLC.

A colega Danielle Santana, pela presteza em liofilizar os nossos extratos.

Aos alunos da Histologia/UFS: Daniel e Rodrigo pela dedicação e lealdade. Aos professores e amigos da Histologia: Andrea, Rosilene e Waldeci pela parceria firmada e pelas valiosas orientações.

Aos meus fiéis amigos Fabrício Tavares, Mônica Melo, Nicole Prata, Meyrielle Lima, Isamar Dantas, Fabíola e a turma do prof. Arie: Lucas, Alex, Danila, Juliana e Mércia, por terem compartilhado momentos agradáveis comigo.

Ao colega e amigo José Rogério V. de Almeida, professor do Departamento de Odontologia/UFS, pela amizade e incentivo em todas as etapas da minha vida profissional.

Aos professores do Departamento de Odontologia/UFS, meus colegas de trabalho, por apostarem no sucesso da nossa equipe.

Aos membros do Conselho Regional de Odontologia de Sergipe e do Sindicato dos Cirurgiões-dentistas de Sergipe por me apontarem sempre os caminhos da ética.

Aos meus alunos de Odontologia (Tauan, Allancardi, Elaine, Tamires, Nayane, Edil, Andreza, Aline, Rafael, Camila, Pérola,...) e aos funcionários da UFS, em especial ao senhor Osvaldo (Biotério setorial da UFS) e a Lindinéia (ambulatório de Odontologia), pela amizade, simpatia e disposição em ajudar.

Um agradecimento especial à secretária da pós-graduação da RENORBIO/SE, Jackeline Rittes, que sempre cuidou de tudo incansavelmente, inclusive funções que cabiam a mim e aos meus colegas.

E finalmente, quero agradecer a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho: MUITO OBRIGADA!

RESUMO

PAIXÃO, M.S. Avaliação da atividade biológica e farmacológica e formulação tópica de Gel Dental do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* L. Poit. 2012. 150f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju/SE, 2012.

A *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae) é uma espécie aromática e em Sergipe ocorre naturalmente de forma selvagem. Este estudo avaliou a fitoquímica do extrato aquoso das folhas da *H. pectinata* (EAHP) através de métodos colorimétricos e CLAE (“*cromatografia líquida de alta eficiência*”) que detectou a presença de fenóis, taninos (condensados e catequinas), saponinas, alcalóides e triterpenos pentacíclicos livres. Também foram avaliadas as atividades antibacteriana, antioxidante e antinociceptiva do EAHP em modelos *in vitro* e *in vivo*, assim como foi avaliado o efeito antiinflamatório dos géis do EAHP a 5% e 10% na periodontite experimental em ratos, comparando com o gel de Doxiciclina 10% (controle positivo) e gel veículo (controle negativo). A atividade antibacteriana foi testada contra cepas de *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* pela técnica de difusão em ágar. O crescimento de todas as cepas bacterianas testadas foi inibido pelo EAHP, com diâmetro da zona de inibição variando de 15 a 36 mm e valores da concentração inibitória mínima variando de 12,5 a 1000 µg mL⁻¹. Os resultados mostraram que o EAHP teve uma forte atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC#25923) e *Streptococcus mutans* (ATCC#27923). O EAHP reduziu o radical DPPH em 72.1% com um EC₅₀ de 14,56 µg/mL. Também inibiu 40,8% da lipoperoxidação induzida pelo AAPH no teste de TBARS, apresentando atividade contra radicais peróxido. A atividade antinociceptiva orofacial foi avaliada em camundongos pré-tratados com o EAHP (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) e morfina (5 mg/kg, i.p.), que recebeu depois formalina (20 µL, 2%), glutamato (40 µL, 25 mM) e capsaicina (20 µL, 2,5 µg) induzindo nocicepção orofacial. O EAHP em todas as doses reduziu significativamente ($p < 0,001$) a resposta nociceptiva na primeira (43-62%) e segunda (47-80%) fases do teste da formalina. O efeito do EAHP (400 mg/kg) não mudou na presença da Naloxona (1,5 mg/kg, i.p.), um antagonista opióide. O EAHP inibiu significativamente a resposta nociceptiva pela capsaicina (23-69%, $p < 0,05$) e glutamato (48-77%, $p < 0,001$) em todas as doses. O presente estudo também analisou a relação existente entre a atividade de periodontite e alterações na massa corpórea e na estrutura óssea alveolar, após indução de Doença Periodontal Experimental (DPE) em ratos submetidos ou não a tratamento (TTO) com gel a base de EAHP a 5% e 10%, comparando seus efeitos com o gel de doxiciclina a 10%. Os géis foram desenvolvidos no laboratório de farmacotécnica da Universidade Federal de Sergipe e aplicados topicamente na região gengival imediatamente após a indução da DPE, três vezes ao dia durante 11 dias. A avaliação da destruição óssea foi determinada através do exame clínico, análise histopatológica e Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico das maxilas dos animais experimentais ($n=36$). A doença periodontal foi induzida através da colocação de ligaduras de fio de nylon 3.0, envolvendo o segundo molar superior de cada animal dos 5 grupos teste ($n=30$). Os animais do grupo controle não receberam ligaduras ($n=6$). Após 11 dias da indução de periodontite, a comparação intergrupos mostrou que todos os grupos que receberam ligadura (grupo II, III, IV, V e VI) apresentaram diminuição da massa corpórea, enquanto que o grupo Normal (Grupo I - sem DPE) teve seu peso corporal aumentado. Os resultados da Tomografia evidenciaram estrutura óssea saudável no grupo I (Normal) enquanto os grupos teste exibiram perda óssea em graus variados, com destaque para o grupo VI (Não-Tratado), no qual se observou exacerbação da doença. Os grupos tratados com gel de Sambacaitá a 5% (grupo II) e gel de Sambacaitá a 10% (grupo III) exibiram redução na reabsorção óssea quando comparados ao grupo que recebeu gel Doxiciclina a 10% (grupo V). A análise histopatológica do periodonto dos animais tratados com gel de Sambacaitá a 10% evidenciou maior preservação do periodonto de inserção, além de discreto infiltrado inflamatório gengival, semelhante ao grupo tratado com gel Doxiciclina 10%. De acordo com os resultados, pode-se concluir que o EAHP teve uma forte atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas. O EAHP apresentou atividade antioxidante frente ao radical DPPH e contra radicais peróxido. O EAHP inibiu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela formalina, capsaicina e glutamato em todas as doses testadas. A utilização de gel à base de EAHP a 10% foi capaz prevenir a perda de massa corpórea e reabsorção óssea na DPE com efeito similar ao da Doxiciclina a 10% ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Doença Periodontal. Sambacaitá. *Hyptis pectinata*. Gel dental.

ABSTRACT

PAIXÃO, M.S. Evaluation of biological and pharmacological activity and formulation of a topical gel dental of aqueous extract of *Hyptis pectinata* L. Poit. 2012. 150p. Thesis (pH in biotechnology) – Federal University of Sergipe, Aracaju/SE, 2012.

The *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae) is an aromatic specie and, in Sergipe, occurs naturally in the wild. This study evaluated the aqueous extract phytochemical of *H. pectinata* (AEHP) leaves by colorimetric and HPLC ("high performance liquid chromatography") methods which detected the presence of phenols, tannins (condensed and catechins), saponins, alkaloids and free pentacyclic triterpenes. We also assessed the AEHP antibacterial, antioxidant and antinociceptive activities *in vitro* and *in vivo* the models, and also evaluated the anti-inflammatory effect of AEHP gels of 5% and 10% in experimental periodontitis in rats, comparing with doxycycline gel 10% (positive control) and vehicle gel (negative control). The antibacterial activity was tested against *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* strains by the agar diffusion technique. The growth of all bacterial strains tested was inhibited by AEHP with a diameter of zone of inhibition ranging from 15 to 36mm and the minimum inhibitory concentration values ranging from 12.5 to 1000 µg/mL-1. The results showed that the AEHP had a strong antibacterial activity against Gram positive bacteria like *Staphylococcus aureus* (ATCC # 25923) and *Streptococcus mutans* (ATCC # 27923). The AEHP reduced the DPPH radical in 72.1% with an EC₅₀ of 14.56 µg/mL. Also inhibited 40.8% of the lipid peroxidation induced by AAPH in the TBAR test, showing activity against peroxide radicals. The orofacial antinociceptive activity was evaluated in pretreated mice with AEHP (100, 200 and 400 mg/kg, v.o.) and morphine (5mg/kg, i.p.), after receiving formalin (20 µL, 2%), glutamate (40 µL, 25 mM) and capsaicin (20 µL, 2.5 µg) causing orofacial nociception. The AEHP at all doses significantly reduced ($p < 0.001$) the nociceptive response in the first (43-62%) and second (47-80%) phases of the formalin test. The AEHP effect (400 mg/kg) did not change in the presence of naloxone (1.5 mg/kg, i.p.), an opioid antagonist. The AEHP significantly inhibited the nociceptive response by capsaicin (23-69%, $p < 0.05$) and glutamate (48-77%, $p < 0.001$) at all doses. This study also examined the relationship between the activity of periodontitis and changes in body mass and alveolar bone structure after induction of Experimental Periodontal Disease (EPD) in rats with or without gel with the AEHP 5% and 10% based treatment (TTO) comparing its effects with the 10% doxycycline gel. The gels were developed in the pharmaceutical technology laboratory at the Federal University of Sergipe and immediately topically applied to the gingival area after the induction of EPD, three times daily for 11 days. The bone destruction evaluation was determined by clinical examination, histopathology and Cone Beam Computed Tomography of the experimental animals jaws ($n = 36$). The periodontal disease was induced by the placement of 3.0 nylon thread, involving the second molar of each animal of the fifth test group ($n = 30$). The control group received no ligatures ($n = 6$). After 11 days of periodontitis induction, the inter group comparison showed that all the groups that received ligation (group II, III, IV, V and VI) showed a decrease in mass, while the normal group (Group I - without EPD) was their body weight increased. The results of the CT scan showed healthy bone structure in group I (Normal) while the test groups showed varying degrees of bone loss, especially for the group VI (Non-Treaty), in which we observed exacerbation of the disease. The groups treated with sambacaitá 5% gel (Group II) and sambacaitá 10% gel (Group III) showed reduction in bone resorption compared to group that received 10% doxycycline gel (Group V). The histopathological analysis of the animals periodontium treated with 10% sambacaitá gel showed greater preservation of periodontal insertion and mild inflammatory infiltrate gum similar to the group treated with 10% doxycycline gel. According to the results, it can be concluded that the AEHP had a strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria. The AEHP showed antioxidant activity against the DPPH radical and against peroxide radicals. The AEHP significantly inhibited the formalin, capsaicin and glutamate-induced nociceptive response, at all doses tested. The use of gel-based AEHP 10% was able to prevent loss of body mass and bone resorption in DPE with similar effect to Doxycycline 10% ($p < 0.05$).

Keywords: Periodontal Disease, Sambacaitá, *Hyptis pectinata*, Dental gel

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAPH – Diidrocloreto de 2,2 azobis (2-amidinopropano)
ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis – (3 - etilbenzo-tiazolina-6-sulfonico)
ANOVA – Análise de variância
APGI – Ácido graxo poliinsaturado
ATCC – Coleção americana tipo cultura
CAT – Catalase
CE₅₀ – Concentração eficiente em 50%
CIM – Concentração inibitória mínima
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM – Cromatografia líquida acoplada ao espectro de massas
CL-RMN – Cromatografia líquida com detector para ressonância magnética nuclear
CLSI – Clínica e Laboratório Instituto Padrão
DP – Doença Periodontal
DPE – Doença Periodontal Experimental
DPM – Desvio padrão da média
DPPH – 2,2'-difeníl-1-picril-hidrazil
EAHP – Extrato aquoso de *Hyptis pectinata*
EAG – Equivalentes de ácido gálico
ETA – Extrato total aquoso
FT – Fenóis totais
GD10% - Gel de Doxíciclina 10%
GS5% - Gel de Sambacaitá 5%
GS10% - Gel de Sambacaitá 10%
GV – Gel Veículo
NT – Não-tratado
IP – Percentual de inibição
LPO – Lipoperoxidação
MDA – Malondialdeído
MMP - Metaloproteína
NCCLS – Comitê nacional para padrões clínicos de laboratório

ND – Não determinado

NO• – Óxido nítrico

O₂ – Oxigênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONOO– – Radical peroxinitrito

pH – Potencial de hidrogênio

RL – Radicais livres

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TTO - Tratamento

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 – A DOENÇA PERIODONTAL (DP).....	16
• Periodonto e Doenças ou Condições Sistêmicas.....	17
• Doença Periodontal Experimental – DPE.....	27
• Diagnóstico da Doença Periodontal.....	32
○ Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico (“Cone Beam”).....	32
3.2 – ANTIMICROBIANOS NA TERAPIA PERIODONTAL.....	38
3.3 – PRODUTOS NATURAIS NA ODONTOLOGIA.....	45
• <i>A Hyptis pectinata</i> L. Poit – “Sambacaitá”.....	51
4 CAPÍTULO I – Artigo Científico – <i>Hyptis pectinata</i>: Redox protection and orofacial antinociception.....	58
5 CAPÍTULO II - Artigo Científico – <i>Hyptis pectinata</i> gel prevents resorption alveolar bone in periodontitis experimental in rats	83
6 CAPÍTULO III – Artigo Científico –Phytochemistry and antibacterial activity of <i>Hyptis pectinata</i> L. Poit (Laminaceae) aqueous extract.....	105
7 REFERÊNCIAS.....	126
8 APÊNDICE.....	139
9 ANEXOS.....	143

1 Introdução

Em muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais é transmitido entre as gerações e representa, muitas vezes, o único recurso terapêutico ao seu alcance. No Brasil, plantas medicinais são vendidas em mercados públicos e feiras populares ou, encontradas em cultivo doméstico (MACIEL *et al.*, 2002).

A maioria das novas drogas tem origem de produtos naturais (metabólitos secundários) e de compostos derivados de produtos naturais. Atualmente, mais de 100 drogas baseadas em produtos naturais encontram-se em estudos clínicos, representando um aumento de cerca de 30% entre 2001 e 2008 (Li *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, vem ocorrendo no Brasil um aumento acentuado no uso de plantas medicinais. No entanto, existe uma carência de estudos científicos sobre a atividade terapêutica e efeitos adversos da maioria desses produtos, não havendo preocupação, portanto, com a eficácia e o uso seguro dos mesmos (NASCIMENTO, 2005).

A utilização de produtos naturais associada ao tratamento preventivo poderia reduzir a alta incidência de doenças que afetam o elemento dental, como a doença periodontal (JUIZ *et al.*, 2010).

Os quadros patológicos da gengivite e da periodontite, afecções bucais mais prevalentes no Brasil, merecem especial atenção em comunidades carentes, especialmente no Nordeste brasileiro, onde os indivíduos acometidos geralmente apresentam quadros muito evoluídos, acompanhados da deterioração da unidade

dental bem como do seu suporte ósseo (BOTELHO *et al.*, 2007). Dados do Ministério da Saúde apontam esta região com índices alarmantes com apenas 22% dos adultos e 8% dos idosos com saúde periodontal (BRASIL, 2004).

O caráter destrutivo das doenças periodontais e sua progressão são dependentes da presença da placa gengival supra e subgengival. Dentre as espécies envolvidas na doença periodontal, destacam-se *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, espécies de *Selenomonas*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga* e *Eikenella corrodens* (SLOTS & RAMS, 1992). Em resposta a esta infecção, o hospedeiro representa um papel importante na patogenia da doença periodontal através da produção de enzimas e outros mediadores endógenos da resposta inflamatória, sendo responsável por grande parte da destruição tecidual observada através de parâmetros clínicos e histopatológicos (LINDHE, 2005).

A periodontite, uma relevante causa de perda de dentes em adultos, é uma doença inflamatória crônica que se caracteriza pela reabsorção óssea localizada (CHAMBRONE & CHAMBRONE, 2006).

As diferenças clínicas na severidade e prevalência da periodontite podem ser explicadas pela presença de fatores ou indicadores de risco tais como idade, padrão de higiene bucal, hábito de fumar, diabetes, microrganismos periodontopatogênicos, estresse, imunodeficiências congênicas ou adquiridas, fatores genéticos e outros (GARCIA, 2001).

A aplicação local dos antimicrobianos em sítios comprometidos tem apresentado resultados satisfatórios. Estudos indicam a utilização local desse gel antimicrobiano como forma definitiva de tratamento, eliminando o procedimento de

raspagem e alisamento radicular, apresentando resultados efetivos no combate à Doença Periodontal (POLSON *et al.*, 1997; GARRETT *et al.*, 1999).

Pesquisas recentes têm indicado a utilização local do gel de doxiciclina como forma isolada de tratamento, sem o procedimento de raspagem e alisamento radicular, apresentando resultados efetivos no combate à doença periodontal (MACHION, 2006).

A pesquisa utilizando plantas medicinais vem recentemente apresentando novas estratégias de tratamento para várias afecções bucais.

A *Hyptis pectinata* (L). Poit. (Lamiaceae), planta medicinal utilizada no presente estudo, é uma espécie aromática e em Sergipe e Alagoas ocorre naturalmente de forma selvagem em campos, matas e estradas e em volta de residências, sendo vastamente utilizada para problemas gastrintestinais (CARVALHO *et al.*, 1999).

A utilização dessa planta no uso popular é bastante comum, pois é facilmente encontrada em hortas e jardins. O seu uso mais freqüente é a ingestão na forma de chás (decocções ou infusões) e bochechos, sendo considerada um antiinflamatório natural (CARVALHO, 1999).

Diante do exposto, justifica-se a condução de trabalhos de pesquisa que possibilitem uma avaliação mais precisa das interações entre microrganismos, produtos naturais e o controle das doenças periodontais e suas conseqüências para o organismo.

2 Objetivos

Objetivo Geral:

- ✎ Investigar as propriedades fitoquímicas e farmacológicas do extrato aquoso das folhas da *Hyptis pectinata* (L.) Poit ("Sambacaitá") e os efeitos do gel dental preparado com esse extrato na Doença Periodontal Experimental em roedores.

Objetivos Específicos:

- ✎ Traçar o perfil fitoquímico do extrato aquoso obtido das folhas da *H. pectinata* (EAHP) através de métodos colorimétricos e HPLC;
- ✎ Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do EAHP frente a microorganismos de importância clínica para a doença periodontal;
- ✎ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EAHP contra a lipoperoxidação provocada pelo indutor dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidino-propano) (AAPH);
- ✎ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EAHP através do método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazina (DPPH);
- ✎ Avaliar a atividade antinociceptiva do EAHP através do modelo de dor orofacial induzida por formalina, glutamato e capsaicina em camundongos;
- ✎ Desenvolver um gel dental à base de EAHP;
- ✎ Avaliar o efeito da aplicação local do gel dental de *H. pectinata* no modelo de doença periodontal experimental em ratos, através da análise histopatológica e Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico:
 - No índice de perda óssea;
 - Na massa corpórea.

3 Revisão de Literatura

3.1 *A Doença Periodontal*

As doenças gengivais e periodontais, em suas várias formas, têm afligido a espécie humana desde os primórdios da história. Pesquisas em paleontologia têm indicado que a doença periodontal destrutiva, evidenciada pela perda óssea, afetou os primeiros humanos em diversas culturas, tais como o antigo Egito e a primitiva América Pré-Colombiana (CARRANZA *et al.*, 2007).

A doença periodontal é atualmente a afecção bucal de maior prevalência e incidência, constituindo um dos maiores problemas de saúde pública na odontologia brasileira. Na verdade não constitui uma afecção apenas, mas um grupo de problemas ou doenças que ganham importância cada vez maior. Sendo assim, são responsáveis pela maioria das dores e perdas dentais, que têm por principal causa o biofilme bacteriano devido às más condições de higienização (BERNIMOULIN, 2003).

A resposta imune de cada indivíduo tem um papel importante no início e progressão desta doença e pode ser influenciada por fatores de risco, biológicos e comportamentais (KORNMAN & PAGE, 2000).

Periodonto e Doenças ou Condições Sistêmicas:

O periodonto é constituído por gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. As principais funções dos tecidos periodontais incluem a inserção das estruturas dentárias no tecido ósseo dos maxilares e a manutenção da integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral. O periodonto forma, assim, uma unidade de desenvolvimento biológico e funcional, que sofre alterações com a idade e, além disso, está sujeito a alterações morfológicas

relacionadas com modificações funcionais do microambiente oral (POLIMENI *et al*, 2006).

O quadro clínico dos tecidos gengivais sadios apresenta-se com uma coloração pálida, tendo a sua superfície um aspecto granuloso e um tom consistente. A natureza insidiosa da doença periodontal é indicada pela ocorrência de uma inflamação gengival podendo mesmo levar à perda parcial ou completa dos dentes (McDONALD *et al*, 1995).

É sabido que a formação da placa bacteriana é o desencadeador dos processos patológicos que acometem a estrutura do elemento dental e o tecido de suporte dentário. Assim, o controle da formação da placa bacteriana é imprescindível quando se quer controlar o desenvolvimento da periodontite (JUIZ *et al.*, 2010).

A placa bacteriana caracteriza-se por uma película não calcificada, que apresenta forte adesão às superfícies dentárias, resistindo desta forma à presença do fluxo salivar. O termo biofilme é usado para denominar uma comunidade microbiana estruturada, suspensa numa matriz exopolissacarídica, que adere a uma superfície (WILSON, 2001). A associação dos microrganismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sua sobrevivência em ambientes hostis. O biofilme constitui deste modo um depósito bacteriano e de constituintes salivares, com um crescimento contínuo, sendo considerado a principal causa de doenças como a cárie e a periodontite (ROSAN & LAMONT, 2000).

O controle do biofilme dental (placa bacteriana) é assunto de bastante interesse para a Odontologia preventiva, por ser este o agente etiológico

preponderante no surgimento da cárie dentária e da doença periodontal. Portanto, a saúde bucal depende em grande parte do controle da formação e desenvolvimento do biofilme bacteriano através da higienização e utilização de um arsenal de produtos, tais como: dentifrícios, anti-sépticos orais, fio dental, uma boa escova, que nem sempre são disponíveis à grande parte da população.

Dentre os microrganismos colonizadores do biofilme dental, o *Streptococcus mutans*, um dos agentes etiológicos da cárie dental, facilita a colonização de microrganismos anaeróbios. Assim, o controle do crescimento do *S. mutans* resultará na prevenção também da periodontite (JUIZ *et al.*, 2010).

Foi descrito no processo de colonização do biofilme que os primeiros microrganismos a se agregarem são os cocos Gram-positivos, especialmente os *Streptococcus mutans* e *sanguis*, fusobactérias, espirilos e espiroquetas. A colonização ocorre nas primeiras oito horas de forma rápida e seletiva à película adquirida (NEWBRUN, 1988). A composição do biofilme varia de acordo com a idade e a dieta, mas geralmente é composta por cerca de 80% de água e 20% de sólidos, dentre estes, bactérias e polímeros extracelulares secretados pelos organismos e aqueles derivados do meio ambiente (GENCO, 1996).

Os *Streptococcus* do grupo *mutans* são pandêmicos, sendo isolados de populações de diversas origens étnicas e sócio-econômicas. A concentração do grupo *Streptococcus mutans* na saliva humana tem uma variação que vai desde não detectável até 10^7 UFC/mL, com concentração média de 10^5 UFC/mL de saliva (BERNIMOULIN, 2003).

Com o desenvolvimento da microbiota da placa, tanto o aumento da quantidade de bactérias já existentes como o aparecimento de novas espécies,

levam a alterações inflamatórias que caracterizam a gengivite. Quando o processo inflamatório progride em direção ao ligamento periodontal, com formação de bolsas periodontais, este processo é denominado periodontite (RODRIGUES, 2002).

As alterações que afetam o periodonto, de forma dependente da acumulação do biofilme oral, são classificadas em duas categorias gerais: gengivite e periodontite. Na gengivite verifica-se a presença de inflamação gengival, sem perda de adesão do tecido conjuntivo do ligamento periodontal; enquanto que, na periodontite verifica-se a existência de inflamação gengival associada à migração apical do epitélio de adesão, com perda de tecido conjuntivo e osso alveolar. A saúde periodontal implica a ausência de qualquer tipo de patologia periodontal, associada à existência do biofilme oral (KWOK & CATON, 2007).

Segundo a Academia Americana de Periodontologia (1999), entende-se como gengivite uma inflamação resultante da presença de bactérias na margem gengival, podendo difundir-se por toda a unidade gengival remanescente. A intensidade dos sinais e sintomas clínicos pode variar em função dos indivíduos e dos locais numa dentição (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999).

A periodontite é uma patologia de base imuno-inflamatória, caracterizada pela destruição progressiva das estruturas de suporte dentário. Com a evolução da doença, estes tecidos vão sendo, progressivamente, destruídos, o que resulta numa perda de aderência entre o dente e as estruturas de suporte. Diversos sinais clínicos, como a hemorragia gengival pós-sondagem, eritema, edema e supuração na margem gengival, estão associados à evidência clínica da periodontite; contudo, o diagnóstico definitivo é determinado pela avaliação da profundidade na sondagem periodontal e a avaliação do nível da crista óssea, após a realização de um exame

radiográfico intra-oral. Assim, o principal objetivo da terapia periodontal é a redução da profundidade de bolsa, evitando a progressão da doença periodontal. Geralmente, esse objetivo é alcançado com a terapia não-cirúrgica em pacientes diagnosticados com periodontite moderada. Em casos mais avançados, nomeadamente em defeitos intraósseos e defeitos de furca, o tratamento deve ser suplementado com terapia periodontal cirúrgica (LINDHE *et al.*, 2005).

Apesar de apresentar as mesmas características clínicas da gengivite, a periodontite ocorre quando há destruição do ligamento periodontal e migração apical do epitélio de união. Verifica-se deste modo a existência de um acúmulo de placa bacteriana, ao nível dos tecidos mais profundos, causando uma perda de inserção por destruição do tecido conjuntivo e por reabsorção do osso alveolar. Macroscopicamente, a gengiva apresenta-se eritematosa com sinais de inflamação. No entanto, esta característica pode não estar presente, como acontece nos pacientes fumadores nos quais a vasoconstrição provocada pelo tabaco simula ausência de inflamação (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999).

Sabe-se que nem toda gengivite evolui para periodontite e não se sabe quando essa evolução pode ocorrer: de gengivite a periodontite. Com a proliferação bacteriana, ocorre aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandina E₂ (PGE₂), resultando na sequência de eventos que poderão provocar destruição do tecido conjuntivo e do osso alveolar (LINDHE, 2005). A IL-1 β é potente indutora de reabsorção óssea e inibição da formação do osso, pela estimulação da síntese de prostaglandinas, tromboxanas, collagenases e proteases. Também pode potencializar a desgranulação de neutrófilos, aumento da adesão leucocitária ao

endotélio vascular e estimulação de fibroblastos e ceratócitos. Esses efeitos pró-inflamatórios promovem uma ação vasodilatadora, aumentando a permeabilidade vascular e atuando como mediadores da desmineralização óssea, acarretando agravo e perpetuação da reação inflamatória (ROXO JUNIOR & GABRIELLI, 2004).

A perda de suporte devido à destruição do osso alveolar é uma das características e sinais da doença periodontal. A extensão e a severidade da perda de osso alveolar podem ser avaliadas clínica e radiograficamente, sendo de extrema importância na determinação do diagnóstico, plano de tratamento e prognóstico da patologia (PAPAPANOU & TONETTI, 2000).

Os principais aspectos histopatológicos da periodontite são acúmulo de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente à bolsa periodontal, destruição das fibras do ligamento periodontal, migração apical do epitélio juncional e reabsorção da crista óssea alveolar. Sua origem é multifatorial e sua prevalência é estimada em 30% a 40% da população adulta (PAIVA & ALMEIDA, 2005).

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 α . 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).

As lesões ósseas podem ser diferenciadas em defeitos supraósseos, defeitos intraósseos, defeitos interradiculares ou de furca. De acordo com a classificação de *Goldman & Cohen* (1958) os defeitos supraósseos são aqueles que se situam na base da bolsa, que se encontra coronalmente à crista alveolar. Os defeitos intraósseos são definidos pela sua localização apical da base da bolsa em relação à crista alveolar residual. Estes defeitos têm sido classificados de acordo com a sua morfologia em termos de paredes ósseas, largura do defeito (ou ângulo radiográfico) e em termos da sua extensão topográfica à volta do dente. A classificação mais frequentemente utilizada tem por base a avaliação do número de paredes residuais. Deste modo, podem ser identificados defeitos de três paredes ósseas, duas paredes ósseas e de uma parede óssea. Frequentemente, os defeitos intraósseos apresentam uma anatomia complexa que engloba um defeito ósseo de três paredes alveolares na porção mais apical, e um componente de uma ou de duas paredes nas porções mais coronais. A cratera interproximal é definida como um defeito ósseo em forma de bacia, no osso alveolar interdentário, com perda óssea em raízes vizinhas ou em dois dentes contíguos, numa posição mais coronal da crista alveolar palatina ou lingual (TONETTI, 2007).

A lesão periodontal é constituída por diversos tecidos biológicos, nomeadamente uma superfície dentária mineralizada não-vascularizada, tecido conjuntivo e epitélio gengival. Logo após a instrumentação cirúrgica ou não-cirúrgica

dos tecidos lesados ocorre a formação de um coágulo sanguíneo, na interface entre o dente a margem gengival. A formação do coágulo é iniciada pelos elementos sanguíneos que migram para a superfície da raiz, durante o procedimento, de uma forma, aparentemente, aleatória. O coágulo é estabilizado por uma rede de fibrina que assenta sobre a superfície radicular. Passadas algumas horas, o processo inflamatório é desenvolvido e mantido por células da resposta inflamatória aguda, predominando neutrófilos e monócitos. Em três dias, a fase tardia da inflamação é dominante, ocorrendo a migração e o recrutamento de macrófagos, para a ferida operatória, seguido da formação do tecido de granulação. Aos sete dias, a aderência do tecido conectivo poderá ser verificada na superfície radicular. Contudo, áreas com coágulo de fibrina, em vários estágios de maturação poderão ainda ser observadas, dependendo do tamanho da ferida e dos recursos teciduais do microambiente local (WIKESJO *et al*, 2003).

A presença de bactérias e suas toxinas estimulam neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais e monócitos. Os neutrófilos libertam as metaloproteinases (MMP) que levam à destruição do colágeno. As restantes células envolvidas promovem a libertação de prostaglandinas (PG), especialmente PGE₂, que por sua vez induzem a libertação de citocinas, entre as quais interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e factor de necrose tumoral (TNF), que conduzem à reabsorção óssea através da estimulação dos osteoclastos. Estas células, ainda que indiretamente, levam também à lise do colagéneo por estimulação das MMP (KORNMAN & PAGE, 2000).

Sabe-se que aspectos relacionados às condições socioeconômicas e de qualidade de vida, no que tange aos cuidados à saúde e acesso aos serviços odontológicos, podem ter influência no acometimento pelas doenças periodontais e

também parece existir uma predisposição biológica para algumas de suas formas, possível explicação para aqueles casos em que a quantidade de placa bacteriana não é compatível com o grau de inflamação encontrado (ARMITAGE, 2004).

A doença periodontal também é influenciada por patologias e condições sistêmicas como diabetes, desordens hematológicas (leucoses, trombocitopenia), síndromes genéticas, sífilis, herpes, agranulocitose e deficiências vitamínicas. Alterações fisiológicas hormonais podem exacerbar a resposta inflamatória à placa bacteriana na fase puberal, durante a gravidez e com o uso de anticoncepcionais. O consumo abusivo de álcool e o vício de fumar são considerados importantes fatores de risco, bem como o uso de medicamentos como fenitoína, nifedipina e ciclosporina (MASCARENHAS *et al.*, 2003).

A saúde sistêmica está frequentemente associada à situação da cavidade bucal. Muitas doenças e condições sistêmicas têm manifestação bucal. Da mesma forma, as infecções microbianas bucais podem também afetar o estado de saúde geral. De fato, estudos baseados em animais, inclusive seres humanos, sugerem que as doenças periodontais podem estar relacionadas a doenças e condições sistêmicas como as cardiopatias (AMAR & HAN, 2003).

Vários autores têm sugerido que o aumento do número de bactérias periodontais no interior da bolsa periodontal pode resultar na penetração de bactérias e de seus produtos nos tecidos gengivais. Assim, as bactérias subgengivais podem ter acesso aos tecidos subjacentes do hospedeiro e, finalmente, ao sistema vascular (CRUZ *et al.*, 2005; LAZO *et al.*, 2006).

Leivadaros *et al.* (2005) citam a presença de periodontopatógenos como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e

Actinobacillus actinomycetemcomitans nos pacientes com doenças cardiovasculares.

Machado *et al.* (2004) relatam que a doença periodontal e as doenças cardiovasculares são frequentemente encontradas e compartilham fatores de risco semelhantes, como idade, hábito de fumar, estresse emocional, situação socioeconômica e gordura corporal.

Um estudo efetuado no Norte de Portugal, em 2005, concluiu que nos fumadores há um risco acrescido de desenvolvimento de periodontites em seis vezes (SALAZAR, 2006).

A condição periodontal de pacientes gestantes verificada por meio de índices gengivais e periodontais tem sido relatada por inúmeros pesquisadores da área. Os conhecimentos obtidos através desses estudos mostram a importância do bem estar físico e emocional da gestante não só para uma melhor evolução da gestação do ponto de vista físico, mas também para o nascimento de crianças mais saudáveis e tranquilas, com perspectivas positivas de um desenvolvimento integral e seguro (HONKALA & AL-ANSARI, 2005).

Durante a gravidez, com muita frequência, têm-se relatado mudanças no aspecto gengival das pacientes, com uma tendência ao agravamento da gengivite, tornando-se mais perceptível frente à presença de irritantes locais. Tais mudanças, como hiperemia, edema e sangramento gengival, estão relacionadas a fatores como deficiências nutricionais, altos níveis hormonais, presença de placa bacteriana, assim como o estado transitório de imunodepressão (HONKALA & AL-ANSARI, 2005).

A associação significativa entre a gravidade da doença periodontal e recém-nascidos de baixo peso sugere a possibilidade de que a doença periodontal na gravidez seja fator de risco para o nascimento de recém-nascidos com baixo peso (MARIN *et al.*, 2005).

O mais famoso e citado estudo a respeito deste assunto foi realizado por Offenbacher *et al.* (1996) constando de 124 mulheres grávidas que foram examinadas após no máximo três dias em que deram a luz, chegando-se a conclusão de que as mulheres que tiveram bebês prematuros de baixo peso apresentavam um significativo grau de destruição periodontal, diferentemente daquelas que tiveram filho em tempo normal. Sendo assim, os autores apontaram uma hipótese em que patógenos anaeróbios gram-negativos do periodonto e a associação com endotoxinas e mediadores inflamatórios maternos poderiam ser um possível efeito adverso no desenvolvimento do feto.

A periodontia encontra-se atualmente, com um grande número de pesquisadores se concentrando em estudar as alterações que a doença periodontal pode causar em locais distantes levando ao aparecimento de uma nova linha de pesquisa denominada de “Medicina Periodontal” que, segundo conceito proposto por Williams e Offenbacher (2000) corresponde a uma ampla definição atribuída a um ramo emergente da Periodontia, preocupado em enaltecer dados científicos que apontem para um relacionamento bidirecional das doenças periodontais e condições gerais dos indivíduos, aonde uma pode afetar negativamente a outra e vice-versa.

Doença Periodontal Experimental – DPE

A experimentação animal contribui sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de enfermidades que acometem os seres humanos (CHORILLI *et al.*, 2007)

Em pesquisa periodontal, o cão beagle, o primata e o rato são os espécimes mais usados para o estudo da etiologia, patogênese e terapia de doenças periodontais inflamatórias crônicas. Dentre os animais citados, o rato (*Rattus norvegicus*) é o mais comumente empregado por constituir alternativa barata, de fácil obtenção e manuseio, o que propicia a utilização de grandes amostras. Além disso, existe entre esse animal e o homem uma similaridade anatômica, imunológica e bioquímica dos tecidos periodontais, bem como uma semelhança histopatológica e, em parte, microbiológica, no que diz respeito às doenças periodontais, podendo ser criado em condição livre de germes, favorecendo a indução de imunodeficiência (SUSIN & ROSING, 2002).

A anatomia dentária do rato é composta por quatro dentes incisivos, que apresentam crescimento contínuo e não têm raízes, e doze molares, em número de três em cada hemiarcada, com epitélios gengival, sulcular e oral, fibras colágenas, cemento celular e acelular e osso alveolar, semelhantes aos dentes dos humanos, existindo apenas uma diferença, o epitélio sulcular gengival do rato, que é queratinizado (CARVALHO, 2010).

Os aspectos clínicos, radiográficos e histológicos das doenças periodontais em ratos são parecidos com aqueles observados em humanos. As estruturas periodontais dos ratos podem ser modificadas de forma patológica, pela indução de doença periodontal ou pelos processos fisiológicos que continuamente remodelam o

osso alveolar ao longo do tempo. Essas alterações podem ser mensuradas pelos métodos histométrico, radiográfico e morfométrico. Esses métodos possibilitam de quantificar as alterações teciduais ocorridas nos animais até o momento de seu sacrifício (KLAUSEN, 1991).

Dentre os modelos utilizados na Doença Periodontal para indução de perda óssea alveolar em rato, destacam-se: i) o modelo de periodontite induzida por colocação de ligadura, utilizado por vários pesquisadores (SALLAY *et al.*, 1982; LIMA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2009); ii) o modelo por inoculação de toxinas bacterianas-lipopolissacarídeos (WADA *et al.*, 2004); iii) com introdução de microorganismos patogênicos (JORDAN; KEIS; BELLACK, 1972) e iv) por manipulação na dieta (GALVÃO *et al.*, 2003).

O modelo de progressão da doença periodontal em ratos pode ser obtido com a utilização de ligaduras de fio de algodão ou seda ao redor da cervical dos dentes, no nível do sulco gengival, permitindo o acúmulo de biofilme bacteriano e provocando inflamação gengival, independente do tipo de dieta (GALVÃO *et al.*, 2003).

Galvão *et al.* (2003) realizaram um estudo com o objetivo de apresentar a técnica e o método de descrição das características histológicas da doença periodontal induzida, através de ligaduras com ou sem dieta rica em sacarose, em ratos da raça Wistar. Os animais foram acompanhados por um período de 30 dias. A doença periodontal nos ratos foi induzida por bactérias periodontopatogênicas por meio da confecção de ligaduras com fio de seda na região cervical do dente, permitindo o acúmulo de microorganismos subgengivalmente. Os animais foram submetidos a uma dieta rica em sacarose, a qual favoreceu o acúmulo natural dos

microrganismos na região cervical. Pela análise histológica descritiva do estudo, foi possível constatar que o uso de ligaduras, na região subgengival dos molares foi capaz de promover o processo inflamatório crônico nos ratos, independente do tipo da dieta.

Cavagni *et al.* (2005) induziram inflamação periodontal ao redor dos segundos molares superiores, através da colocação de ligaduras, onde os lados contralaterais serviram de controle intra-grupo. O grupo experimental foi dividido em 2 subgrupos: Grupo teste, onde os ratos receberam 0,5 mg/kg de dexametasona subcutaneamente a cada 3 dias durante 30 dias e o grupo controle que recebeu solução salina estéril. A dexametasona foi associada ao aumento de perda óssea alveolar na periodontite induzida por ligadura em relação ao grupo controle. Os resultados, portanto, demonstram a capacidade de drogas anti-inflamatórias modularem a resposta do hospedeiro.

Gurgel (2003) utilizou um modelo de indução de doença periodontal em ratos Wistar, através da colocação de ligadura (fio de algodão) no nível do sulco gengival do primeiro molar inferior, para observar a influência de um antiinflamatório não esteroide (meloxicam), sobre a perda óssea inter-radicular. A reabsorção óssea foi evidente aos 15 e 45 dias de experimento nos dentes com ligaduras e na presença do meloxicam, sendo o volume de perda óssea menor no grupo que recebeu a ligadura e o meloxicam por 45 dias, indicando que estes modelos parecem reproduzir um processo inflamatório, tanto nas suas características clínicas, bem como na sua resposta frente a terapias antiinflamatórias.

Kuhr *et al.* (2004) avaliaram, através de 2 métodos, a destruição periodontal seguinte à periodontite induzida experimentalmente pela colocação de ligaduras de

seda ao redor da cervical dos segundos molares maxilares, em ratos Sprague – Dawley na idade de 4-5 meses. Foram formados 5 grupos: C1 – ratos sem ligadura, sacrificados no dia 1; C60 – sem ligadura, sacrificados no dia 60; grupos L15, L30 e L60 – ratos com ligadura, sacrificados nos dias 15, 30 e 60, respectivamente. Os dentes que receberam ligadura exibiram maior perda óssea do que as áreas controle. A perda óssea foi dependente do fator idade, sendo a maior perda óssea observada entre os grupos C1 e L15. Entre os grupos C60 e L60 foi observado suave aumento desta perda, somente por 1 dos métodos. Concluiu-se, portanto, que este modelo pode ser aplicado para pequenos períodos de observação (≤ 15 dias).

Nassar (2008) avaliou o efeito da Sinvastatina em ratos submetidos a periodontite experimental e imunossuprimidos por Ciclosporina-A e Tacrolimus (FK506). Foram utilizados 320 ratos divididos em 32 grupos e em diferentes períodos de 15, 30 e 60 dias associados ou não a periodontite experimental e/ou a administração diária de CsA (10mg/kg por peso corporal), FK506 (1mg/kg por peso corporal) e Sinvastatina (20mg/kg por peso corporal). Os resultados demonstram que a Sinvastatina parece promover um bom efeito protetor sobre a CsA, principalmente na presença de doença periodontal induzida, enquanto que com o FK506, ela não mostrou este efeito, uma vez que o mesmo parece minimizar a progressão da doença periodontal em modelos animais.

Botelho *et al* (2010) avaliaram o efeito antiinflamatório do Diclofenaco Dietilamônio gel (DD) na fase aguda da periodontite, utilizando um modelo experimental por ligadura em ratos. Os autores concluíram que o DD (10 mg/g) foi capaz de reduzir a inflamação gengival.

Na rotina odontológica veterinária, a radiografia intra-oral é o exame imagenológico de escolha, indicado para avaliação e diagnóstico de uma série de alterações dentárias e de outras estruturas da cavidade oral, devendo, sempre que possível, ser realizado por ocasião da primeira consulta odontológica dos animais (TSUGAWA & VERSTRAETE, 2000).

Apesar de a tomografia computadorizada de feixe cônico ser empregada na rotina de diagnósticos de enfermidades dentárias em pacientes humanos (SCARFE *et al.*, 2006), na Medicina Veterinária foi encontrada apenas a citação de ROZA *et al.* (2008), que padronizaram a técnica para auxiliar no diagnóstico de alterações estomatognáticas em cães e gatos. Devido ao sucesso obtido, os autores recomendaram o método como exame auxiliar no diagnóstico de enfermidades como lesão de reabsorção dentária dos felinos, alterações na articulação têmporo-mandibular, traumas faciais, doença periodontal e planejamento implantodôntico.

A Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico surgiu como alternativa diagnóstica viável de fácil execução e custo acessível, possibilitando a identificação de diversas alterações orais dos animais domésticos (ROZA *et al.*, 2008).

Diagnóstico da Doença Periodontal:

Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico (“Cone Beam”)

Na Odontologia, o processo diagnóstico é realizado rotineiramente, desde diferenciar processos de saúde/doença, até determinar o estágio/severidade da doença para escolher a melhor alternativa terapêutica e determinar de maneira mais acurada o prognóstico para o caso (ARMITAGE, 2004).

Os descritores do processo saúde/doença periodontal vêm sendo modificados, grande parte em função de um melhor entendimento dos eventos relacionados à etiopatogenia dessas doenças. Dentro desse novo processo diagnóstico, descritores puramente anatômicos vêm sendo questionados, crescendo em importância descritores diretamente associados ao modelo etiopatogênico vigente (OPPERMANN & ROSING, 2001).

Exames avaliando quantidade de gengiva inserida, contatos oclusais, mobilidade dental e a simples quantificação da profundidade de sondagem, vêm sendo substituídos por critérios de nível de inserção clínico, nível ósseo radiográfico, presença de sinais clínicos inflamatórios, dentre outros (OPPERMANN & ROSING, 2001).

As técnicas radiográficas constituem um meio auxiliar de diagnóstico imprescindível para as diferentes especialidades da odontologia. O exame radiográfico auxilia no diagnóstico da doença periodontal, na determinação do prognóstico e na avaliação do resultado do tratamento. A visualização e a medição da reabsorção óssea alveolar tornam-se possíveis por intermédio das radiografias (CARRANZA, 2007). A perda da crista óssea alveolar, medida em milímetros por intermédio de radiografias interproximais, da junção esmalte-cimento (JEC) até a crista óssea alveolar (COA), mostra-se uma forma de avaliar a doença periodontal (AASS *et al.*, 1994).

Entretanto, as radiografias convencionais não revelam pequenas alterações ósseas na doença periodontal (RAMADAN & MITCHELL, 1962). Apesar de serem utilizadas como complemento do exame clínico, as técnicas radiográficas intra e extra-orais oferecerem imagens limitadas, visualizadas em apenas dois planos. Além

da sobreposição dessas imagens, ocorrem pequenas distorções geométricas e volumétricas da imagem final.

A possibilidade de obtenção de imagens em três dimensões com a tomografia computadorizada (TC) aumentou, sobremaneira, a capacidade de diagnóstico e planejamento odontológico (SCARFE *et al*, 2006).

Tomografia é uma palavra formada pela junção de dois termos gregos, tomos e graphos que significam, respectivamente, camadas e escrita. Portanto a tomografia consiste na obtenção de imagens do corpo em fatias ou cortes. É uma técnica especializada que registra de maneira clara objetos localizados dentro de um determinado plano e permitem a observação da região selecionada com pouca ou nenhuma sobreposição de estruturas. Uma analogia comum é considerar a técnica como uma divisão do paciente em “fatias de pão”. Cada tomograma (ou “fatia de pão”) mostra os tecidos dentro de um corte claramente definido e em foco. A secção é então definida como o plano focal ou camada focal (WHAITES, 2003).

Segundo Cavalcanti (2008), o primeiro tomógrafo para o corpo todo foi instalado, em 1974, na Universidade de Georgetown, e as maiores vantagens desta técnica foram mudanças na obtenção de informações de dados analógicos para dados digitais, a eliminação da sobreposição de estruturas anatômicas, aumentando a capacidade de diferenciar tecidos moles e estruturas ósseas.

De maneira geral, as tomografias podem ser classificadas em dois tipos: tomografia convencional e tomografia computadorizada. Esta última pode ser classificada de acordo com o formato do feixe de raios X utilizado: tomografia computadorizada de feixe em leque (Fan-Beam Computed Tomography) e

tomografia computadorizada volumétrica de feixe cônico (Cone Beam Computed Tomography) (SCARFE *et al.*, 2006).

Essa tecnologia utiliza um conjunto composto por um feixe de radiação com formato cônico e um receptor de imagens bidimensional, que gira em 360°, uma única vez, ao redor da cabeça do paciente. De uma maneira geral, os exames são realizados em aproximadamente trinta segundos, dos quais somente cinco ou seis são utilizados para exposição à radiação X. Durante o único giro do aparelho, são obtidas imagens bidimensionais em diferentes ângulos, as quais são enviadas ao computador e recompostas em uma imagem tridimensional inicial, a partir da qual se é possível obter reconstruções panorâmicas e cefalométricas. Como as imagens são geradas a partir de um único escaneamento, não existe a formação de "gaps", ou seja, as imagens são compostas por voxels isotrópicos (altura = largura = profundidade) que resultam em imagens sem distorções e com maior nitidez (SCARFE *et al.*, 2006).

As Tomografias Computadorizadas por Feixe Cônico foram desenvolvidas especificamente para visualização e diagnóstico das estruturas dento-maxilo-faciais, permitindo a aquisição de imagens tridimensionais com maior qualidade, de forma mais simples, rápida, com menor custo e dose de radiação ao paciente (QUERESBY *et al.*, 2008). As principais vantagens da aquisição da imagem tomográfica pela tecnologia de feixe cônico são: 1) Reconstrução direta dos pontos radiografados por reconstruções axiais, coronais e sagitais sem reformatação; 2) Sofisticação tecnológica, em que a velocidade da totalidade do corte é controlada através de um programa eletrônico e não, por velocidade do tubo de raios X; 3) Mesmas condições

de tempo de escaneamento, através de uma simples aquisição, diminuindo, sobremaneira, a dose de radiação e dispensando o mecanismo de cortes.

A Tomografia Computadorizada por Feixe Cônico (TCFC) pode ser aplicada nas diversas áreas da Odontologia, tais como: implantodontia, cirurgia, traumatologia, periodontia; endodontia, ortodontia, no estudo das estruturas ósseas das articulações temporomandibulares (ATM), odontopediatria, pacientes especiais e fissurados e para detecção de cáries. Esse tipo de tecnologia permite a criação de protótipos, a realização de simulações cirúrgicas, análises cefalométricas e uma série de outros trabalhos sem a necessidade da presença física do paciente, oferecendo ao profissional a possibilidade de realizar um melhor diagnóstico bem como selecionar a terapia mais indicada para o caso (QUERESBY *et al.*, 2008; PATEL *et al.*, 2007; KORBMACHER *et al.*, 2007; HAITER-NETO *et al.*, 2008).

Segundo Ludlow *et al.*, (2006), a dose de radiação absorvida pelo paciente durante as TCFC é de 45 μ Sv, 135 μ Sv e 477 μ Sv para o NewTom-9000®(QR, Verona, Italy), i-CAT® (Imaging Sciences International, Hatfield, PA, USA) e Mercuray® (Hitachi Medical Systems America, Twinsburg, OH, USA), respectivamente.

A boa resolução da imagem de TC deve-se ao grande poder de contraste da técnica, já que pequenas diferenças na densidade tecidual podem ser percebidas e traduzidas em 5.000 tons de cinza em cada pixel. Para se ter uma idéia, os aparelhos atuais reconhecem diferenças de densidade de menos de 0,5%, enquanto as técnicas radiográficas convencionais detectam desigualdades mínimas de 10% (PARKS, 2000). Ademais, a natureza digital da TC permite introduzir melhoras na qualidade da imagem por meio da computação gráfica. E diferentemente das

radiografias convencionais, o fator de magnificação da tomografia computadorizada é nulo, ou seja, a imagem em TC reproduz o tamanho real do objeto escaneado (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

O desenvolvimento desta nova tecnologia está provendo à Odontologia a reprodução da imagem tridimensional dos tecidos mineralizados maxilofaciais, com mínima distorção e dose de radiação significativamente reduzida (SCARFE *et al.*, 2006).

3.2 *Antimicrobianos na Terapia Periodontal*

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

Vários benefícios têm sido associados às medicações de uso tópico na terapia periodontal, tais como redução da profundidade de sondagem, recuperação do ligamento periodontal, redução dos patógenos periodontais e diminuição da necessidade de cirurgia periodontal (MACHION *et al.*, 2006).

A Periodontia moderna utiliza-se da “Terapia Periodontal de Suporte” (TPS), antigamente denominada “Manutenção Periodontal”, que tem como objetivo monitorar a saúde periodontal e evitar a recorrência da gengivite e periodontite (LORENTZ & MOREIRA, 2003).

Os principais objetivos terapêuticos da TPS que a Academia Americana de Periodontia (2000) preconiza são: minimizar a recorrência e a progressão da doença periodontal em pacientes que tenham sido tratados previamente de gengivite e periodontite; reduzir a incidência de perda dentária através do monitoramento da dentição e qualquer substituição protética dos dentes naturais; aumentar a probabilidade de localizar e tratar, de uma maneira periódica, outras doenças ou condições encontradas dentro da cavidade oral.

A terapia convencional não-cirúrgica, que inclui a raspagem e o alisamento radicular, desenvolve um papel importante no travamento da progressão da doença periodontal. Estes procedimentos têm como objetivo a remoção, não só dos

depósitos moles e duros da superfície radicular, mas também de pequenas porções da estrutura dentária. A instrumentação subgengival visa resolver a inflamação gengival e interromper a destruição progressiva do aparelho de inserção, por meio da remoção do biofilme patogênico, aderido e não aderido, da bolsa gengival (POLIMENI *et al.*, 2006; LINDHE *et al.*, 2005; IVANOVSKI, 2009).

Geralmente, o sucesso do tratamento não-cirúrgico deve ser avaliado de acordo com os resultados obtidos na raspagem e alisamento radicular, e complementado, quando necessário pela administração de agentes anti-inflamatórios e/ou antimicrobianos. Esta abordagem terapêutica complementar tem por objetivo reduzir a inflamação e a quantidade de algumas populações microbianas específicas, em locais inacessíveis, onde a raspagem e o alisamento radicular não conseguem chegar. A cirurgia só deverá ser instituída quando os métodos convencionais não são, por si só, eficazes para a resolução do defeito periodontal e o bloqueio da progressão da patologia. (LINDHE *et al.*, 2005).

Para minimizar a ocorrência de insucessos terapêuticos, a adição de antimicrobianos liberados no interior da bolsa periodontal pode reduzir microrganismos patogênicos ou modular a resposta inflamatória, e dessa forma, limitar a destruição tecidual.

A Periodontite e a Gengivite são doenças dentárias mediadas por biofilmes (PENNISI, 2005). A remoção mecânica do biofilme dentário, normalmente, é por si só, mas nem sempre, suficiente para o controle destas doenças. Assim, a aplicação quimioterápica pode complementar a ação mecânica.

A terapia simples ou combinada adquirira uma importância crescente na prática odontológica, contudo, sempre que possível, um único fármaco deve ser

prescrito de forma a reduzir a incidência de efeitos colaterais e os custos da terapêutica. A prescrição de antibióticos deve ser baseada em testes microbiológicos para algumas doenças clinicamente diagnosticadas: periodontite agressiva, periodontite crônica grave, periodontite manifestando uma progressiva perda de controle apesar do tratamento adequado, e periodontite severa associada a doenças sistêmicas, como por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana (KRIGAR *et al*, 2007).

As penicilinas são os agentes antimicrobianos mais amplamente utilizados em Odontologia, sobretudo as de absorção oral, nomeadamente as aminopenicilinas. A amoxicilina é o antibiótico mais largamente utilizado, geralmente associado ao ácido clavulânico. Apresenta uma boa absorção oral atingindo-se elevados níveis séricos do antibiótico. É também frequentemente utilizado na profilaxia da endocardite bacteriana. Nos doentes alérgicos à penicilina, pode-se recorrer a outros grupos de antimicrobianos, nomeadamente tetraciclina, macrólidos, lincosamidas e metronidazol (SOUSA, 2006)

Clorexidina, tetraciclina e metronidazol são alguns antimicrobianos de uso local indicados como adjuntos terapêuticos em indivíduos acometidos por doença periodontal (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2000).

O Chip de Clorexidina apresenta uma concentração de 34% de gliconato de clorexidina contidos numa matriz gelatinosa na forma de chip. Esta matriz é biodegradável possuindo a capacidade de liberar clorexidina no interior da bolsa periodontal por um período de 7 a 10 dias. A droga é então mantida no interior da bolsa em proporções de até 125mg/mL (SOSKOLNE *et al.*, 1998).

Jeffcoat *et al* (2000) avaliaram a efetividade do chip de clorexidina na manutenção do osso alveolar durante um período de 9 meses através de parâmetros clínicos e subtração radiográfica digital. Tanto o grupo teste como o de controle foram tratados com raspagem dental e aplainamento radicular e depois receberam, respectivamente, o chip de clorexidina ou um chip placebo. Neste estudo, o chip de clorexidina utilizado como adjunto aos procedimentos mecânicos mostrou-se mais efetivo na redução da profundidade de sondagem, melhora no nível de inserção clínica e na redução da perda óssea alveolar.

Atualmente, dentre os antimicrobianos mais utilizados na terapia periodontal destaca-se a Doxiciclina. Derivada da Tetraciclina, a Doxiciclina apresenta vantagens com relação a outros antibióticos como ação efetiva contra anaeróbios associados à Doença Periodontal (LISTGARTEN *et al.*, 1978); substantividade às superfícies de dentina e cimento, sendo liberada, após sua absorção, em concentrações bacteriostáticas (CHRISTERSSON *et al.*, 1993), dificultando a aderência da película adquirida e a conseqüente formação do biofilme subgengival (BJORVATN *et al.*, 1985).

Além da atividade antibacteriana, a Doxiciclina apresenta também propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, imunossupressoras, supressão da produção de anticorpos nos linfócitos, redução da função fagocítica em leucócitos polimorfonucleares e redução da quimiotaxia de leucócitos e neutrófilos. Ainda são ativos como inibidores da atividade da lipase e da collagenase (ROBERTS, 2002).

O polímero de doxiciclina apresenta-se na forma biodegradável contendo 10% de doxiciclina, 33% de poliláctil e 57% de N-metil-2-pirrolidona. Na forma sistêmica, a doxiciclina tem a capacidade de concentrar-se no fluido gengival (2 a 3 mg/ml)

demonstrando também um amplo espectro de atividade contra diferentes patógenos periodontais (Walker, 1985). Quando utilizada na forma local, o polímero de doxiciclina se deposita nas superfícies radiculares sendo liberado lentamente, podendo atingir concentrações superiores a 10 mg/ml no fluido gengival (STOLLER *et al.*, 1998).

Associada ao tratamento mecânico convencional, a Doxiciclina apresenta vantagens no tratamento clínico onde demonstra efetividade na redução dos parâmetros clínicos e inibição na atividade colagenolítica (CROUT *et al.*, 1996).

O primeiro estudo que demonstrou a efetividade e biocompatibilidade do dispositivo de aplicação local de doxiciclina foi realizado em animais. Os pesquisadores avaliaram o efeito do gel contendo hclato 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 *in vivo*, Stoller *et al.*, (1998) estabeleceram que a Doxiciclina 10% na forma de gel pode alcançar concentrações superiores a 1200 mg/ml no fluido gengival, permanecendo por sete a oito dias em níveis mais elevados do que a mínima concentração inibitória da maioria dos patógenos periodontais.

De acordo com Garret *et al.* (1999), a doxiciclina 10% mostrou-se igualmente efetiva quanto à raspagem dental e aplainamento radicular como terapia periodontal de suporte. No modelo experimental tal fato também foi demonstrado por Bezerra *et al* (2002).

Machion *et al* (2006), em um estudo clínico com aplicação local do gel de doxiciclina demonstraram ser este procedimento um importante apoio para o tratamento de fumantes quanto à profundidade de sondagem e nível de inserção clínica.

A terapia periodontal convencional realizada com sucesso tem o objetivo de manter a saúde dos tecidos periodontais. Desta forma produtos naturais poderiam auxiliar no controle do crescimento do biofilme dental subgengival (JUIZ *et al.*, 2010).

3.3 *Produtos Naturais na Odontologia*

Uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade é o uso de extratos vegetais e fitoquímicos. Em torno de 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento, segundo a Organização Mundial da Saúde, dependem exclusivamente das plantas medicinais como forma de acesso aos cuidados básicos de saúde, particularmente na atenção primária (GONÇALVES *et al.*, 2005).

Os produtos naturais têm sido as principais fontes de diversidade química para matérias-primas enquanto conduziam descobertas farmacêuticas ao longo do século passado (Li *et al.* 2009).

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do planeta, com aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores e uma farmacopéia popular com uma grande variedade de plantas medicinais, graças a uma miscigenação cultural envolvendo africanos, europeus e indígenas, com introdução de espécies exóticas pelos colonizadores e escravos (MELO *et al.*, 2007).

Os efeitos adversos de fármacos sintéticos, a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, o maior conhecimento científico acerca da eficácia e segurança de espécies vegetais, o aprimoramento de novos métodos de controle de qualidade, de novas formas farmacêuticas e administrações de produtos fitoterápicos, além do menor valor de compra em comparação com os fármacos sintéticos têm estimulado o crescimento da fitoterapia (MELO *et al.*, 2007).

Cerca de 75% dos compostos puros naturais utilizados pela indústria farmacêutica foram obtidos a partir de informações da medicina popular (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

O surgimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas. A co-

evolução de plantas, insetos e microorganismos conduzem à síntese de metabólitos secundários com funções de defesa ou atração (CÂNDIDO, 2007).

A legislação brasileira em vigor define um fitoterápico como “aquele medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3” (BRASIL, 2004).

A legislação consegue reforçar o critério de segurança e eficácia dos fitoterápicos registrados no Brasil, mas também privilegia a incorporação de plantas exóticas, já que a maioria das obras colocadas como referência contempla resultados obtidos em estudos realizados com população de perfil epidemiológico diferente, sendo necessária cautela na adaptação dos resultados para nossa população. Os critérios ainda desvalorizam a medicina popular, considerando que a maioria das plantas utilizadas tradicionalmente ainda não foi avaliada do ponto de vista toxicológico e farmacológico, o que impede o seu registro como fitoterápico (RIBEIRO *et al*, 2005). Por outro lado, existe um número cada vez maior de estudos científicos que comprovam a toxicidade de plantas antes usadas sem restrições e de forma indiscriminada (OLIVEIRA & GONÇALVES, 2006).

A combinação entre as informações populares sobre uso das plantas medicinais e os estudos farmacológicos e químicos, permitiu a descoberta de inúmeros fármacos usados atualmente na clínica odontológica (BARREIRO, 1990). Desse modo, várias plantas de uso medicinal tiveram suas propriedades

antimicrobianas testadas e atualmente são empregadas como preventivo a algumas infecções, a exemplo da “amina”, da “camomila”, da “hortelã”, da “sálvia”, do “cravo-da-índia” e do “juá” que se constituem em alguns fitoterápicos de grande interesse no uso odontológico (WILLERSHAUSEN, 1994).

Os bochechos antimicrobianos reduzem o biofilme visível na superfície dos dentes. A aplicação clínica dos bochechos pode ser dividida em duas categorias: preventiva e terapêutica (FISCHMAN, 1994).

De acordo com Hood *et al.* (2003), o uso dos óleos essenciais como agentes terapêuticos tem se tornado comum popularmente.

Claffey (2003) esclareceu os benefícios dos bochechos com óleos essenciais como um componente seguro nos cuidados diários de higiene oral.

Além desses, outros trabalhos corroboram as indicações de plantas medicinais para tratamento de afecções bucais. Nesse sentido, Sampaio (1997) pesquisou plantas adstringentes brasileiras e relatou que, no Brasil, usava-se uma mistura do suco do tronco da bananeira (*Musa sapienten* Linn) com água, obtendo excelente ação em aftas. Também para aftas, indicava-se o decocto da casca do cajueiro (*Anacardium occidentale* Linn). Ele acrescenta ainda que o pó da madeira do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam) era aconselhado para o fortalecimento gengival, assim como as folhas da mangueira (*Mangifera indica* Linn), no caso de ulcerações bucais.

Silva (2001) relatou que na Odontologia o uso de plantas medicinais não é tão restrito e que plantas como “romã”, “pitanga” e “girassol” são utilizadas no serviço público e na clínica privada há mais de dez anos. O mesmo autor esclareceu que a fitoterapia não é uma terapia especificamente conduzida para as populações pobres,

não sendo uma alternativa, mas uma conduta clínica criteriosa pela qual o profissional opta por ser eficaz, por provocar efeitos colaterais mínimos e por estar ao alcance de todos.

Takahashi *et al* (2003) afirmaram que o uso da mastigação lenta de goma de mascar com extrato de “eucalipto” mostrou reduzir o número de bactérias da saliva, índice de biofilme e índice gengival. Sugeriram que a eficiência dos métodos de higiene oral tradicional pode ser devida, em parte, aos componentes antimicrobianos extraídos de plantas presentes nos produtos.

Milhões de Yemenitas e africanos do leste da África habitualmente mascam as folhas e ramos de *Catha edulis*, uma planta da família Celestraceae comumente conhecida como chá-da-absintia, que contém um complexo grupo de alcalóides, também vitamina C, tanino (8-19 mg/g), óleos essenciais (onze componentes diferentes), esteróis, triterpenos, tiamina, riboflavina, niacina, ferro e aminoácidos. Em um estudo realizado *in vivo* foi mostrado que o chá-da-absintia tem a capacidade de influenciar na prevalência de periodontopatógenos localizados sub e supragengivalmente, induzindo um perfil na microbiota adequado à saúde periodontal. Testes de susceptibilidade foram executados segundo normas do Clinical and Laboratory Standards Institute. Os resultados indicaram que a maioria das cepas de periodontopatógenos testados, incluindo *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *A. actinomycetemcomitans* foram sensíveis aos extratos de *Catha edulis* (CIM de 5 – 20 mg/mL). Apenas *Campylobacter rectus* e *Fusobacterium nucleatum* mostraram resistência (AL-HEBSHI *et al*, 2005).

O desenvolvimento tecnológico e industrial traz ao mercado diariamente produtos como escovas elétricas, irrigadores elétricos, que facilitam a higiene bucal e controle da placa (JUIZ *et al.*, 2010).

Propriedades farmacológicas de plantas e hortaliças como: “agrião”, “alecrim”, “alfavaca”, “amora”, “artemija”, “babosa”, “batata-doce”, “bardana”, “caju”, “calêndula”, “cambuí”, “camomila”, “cenoura”, “dormideira”, “erva-luiza”, “erva-escorpião”, “eucalipto”, “extremosa”, “figo”, “framboesa”, “fruta-pão”, “funcho”, “gelsêmico”, “gengibre”, “goiaba”, “guaco”, “guaçatonga”, “quando”, “guiné”, “hortelã”, “jabuticaba”, “Jamelão”, “joá”, “jucá”, “labaça”, “limão”, “macelinha”, “malva”, “manga”, “melissa”, “morango”, “mulungu”, “nêspera”, “pau-brasil”, “picão”, “ratânia”, “rebenta-cavalo”, “romã”, “sabugueiro”, “sálvia”, “suína”, “tanchagem”, “tomate”, “tomilho”, “vedelia”, “zedoária” são meios auxiliares na prevenção em odontologia (JUIZ *et al.*, 2010).

Carvalho (1999) e Cruz (2002) realizaram um levantamento etnofarmacológico no semi-árido de Sergipe e descreveram uma variedade de plantas utilizadas para diversos fins. Dentre as quais, Cruz (2002) mencionou o potencial antimicrobiano da “cabaceira” (*Lagenaria vulgaris* Ser.); da “sacatinga” (*Croton argirophyloides* Mull.), do “juazeiro” (*Ziziphus joazeiro* Mart.), da “quixabeira” (*Bumelia sartorum* Mart.), do “jatobá” (*Hymenaea courbaril* L.), da “catingueira” (*Caesalpinia pyramidalis* Tull.) e do “sambacaitá” (*Hyptis pectinata* (L.) Poit.).

O estudo conduzido por Carvalho (1999), no povoado de Curituba (SE), a respeito das plantas medicinais da caatinga, correlaciona aspectos sociais, culturais e farmacológicos sobre a fitoterapia na região. A autora identificou 44 espécies vegetais utilizadas como fitoterápicos e classificadas de acordo com os critérios de

atividade biológica. Uma das mais frequentes utilizações encontrada na comunidade foi o uso dermatológico como anti-séptico e cicatrizante, que justifica pela própria característica da flora da caatinga, que apresenta adaptações, entre as quais, a presença de espinhos. Quanto às formas de preparo, registraram-se dez técnicas: infusão, decocção, alcoolaturas, xarope ou lambedor, garrafadas, compressas, banhos, cataplasmas, tintura e unguento, além do uso na dieta e bochechos. O “sambacaitá” foi uma das plantas mais conhecidas e utilizadas, tendo indicação popular para os diversos tipos de inflamação, sob a forma de chás e bochechos.

***A Hyptis pectinata* L. Poit – “Sambacaitá”**

A família Lamiaceae é uma das mais representativas, tanto em número de espécies, como em resultados apresentados pela maioria dos levantamentos sobre plantas medicinais (TEIXEIRA & MELO, 2006). Ela tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais, sendo bem estudada do ponto de vista químico (MENEZES, 2007).

Essa família também inclui um grande número de plantas que são bem conhecidas por suas propriedades antioxidantes. Yesil-Celiktas *et al.* (2007) investigaram os extratos metanólicos obtidos de folhas de *Rosmarinus officinalis* L. coletadas na Turquia em diferentes localidades e épocas do ano. Foram investigadas com o uso de HPLC (“*high-performance liquid chromatography*”) e suas capacidades e atividades antioxidantes foram estudadas em vários experimentos. Os resultados foram correlacionados com os metabólitos ativos e os fenóis totais, sendo a atividade antioxidante mais eficiente nos meses mais quentes.

O gênero *Hyptis* Jacq., é constituído por aproximadamente 400 espécies distribuídas desde o sul dos Estados Unidos, através da região do Caribe e América Central, até o sul da Argentina. É composto por ervas subarbuscos, arbustos ou raramente, pequenas árvores. Os caules geralmente são quadrangulares, as folhas opostas, simples ou mais raramente partidas, pecioladas, sésseis ou curtamente pedunculadas, contendo substâncias aromáticas (BORDIGNON, 1990).

Um levantamento feito para o estado de Pernambuco por Almeida e Albuquerque (2002) revelou a presença de 20 gêneros, abrangendo 46 espécies, onde a *Hyptis* está representada com 17 excicatas.

De acordo com Falcão e Menezes (2003) o gênero *Hyptis* é rico em espécies de grande importância econômica e etnofarmacológica. Frequentemente utilizadas para fins medicinais no Brasil e em diversos países como México (FRAGOSO-SERRANO *et al.*, 2005), China, Índia, Oeste da África, Gana (ASASE *et al.*, 2005).

Neste gênero, a ocorrência dos metabólitos terpenoídicos é grande, predominantemente os triterpenos, apesar de um grande número de diterpenos com o esqueleto labdânico ter sido identificado. Além dos monoterpenos e sesquiterpenos (componentes principais dos óleos essenciais) outras substâncias também foram identificadas: hidrocarbonetos, ácidos graxos e esteróides (FALCÃO & MENEZES, 2003).

Algumas espécies destacam-se pela sua freqüente utilização em chás, decocções e infusões como antiinflamatório natural, como é o caso das espécies nativas *Hyptis pectinata* L. Poit., conhecida como “Sambacaitá” ou “Canudinho” (ARRIGONI-BLANK, 2005), e também *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth., conhecida como “Alecrim do Campo” (SANTOS *et al.* 2007; MENEZES *et al.*, 2007).

A *H. pectinata* é uma espécie aromática e em Sergipe e Alagoas ocorre naturalmente de forma selvagem em campos, matas e estradas e em volta de residências, sendo vastamente utilizada para problemas gastrintestinais. É um arbusto perene com galhos eretos e baixa densidade foliar (CARVALHO *et al.*, 1999).

A utilização dessa planta no uso popular é bastante comum, pois é facilmente encontrada em hortas e jardins, porém o extrativismo é a forma usual de obtenção, o que na maioria das vezes tem acarretado em perdas mesmo antes de serem estudadas. O seu uso mais freqüente é a ingestão na forma de chás (decocções ou infusões) e bochechos, sendo considerada um antiinflamatório natural (CARVALHO, 1999).

Blank *et al.* (2011) estudaram a influência do estágio de desenvolvimento de genótipos de Sambacaitá e concluíram que na fase de floração os genótipos apresentaram maior comprimento e largura das folhas.

Santos-Neto *et al.* (2007) avaliaram a influência do peso da semente e promotores químicos na qualidade fisiológica das sementes de Sambacaitá. Os resultados evidenciaram que as diferentes categorias de peso das sementes (leve e pesada) têm influência na qualidade fisiológica das sementes de Sambacaitá. Sementes “pesadas” germinam com maior percentual e velocidade. O tratamento químico com KNO_3 e GA_3 aumenta a porcentagem de germinação e a utilização de do promotor químico PEG prolonga o tempo médio de germinação das sementes.

A medicina popular usa a parte aérea da *H. pectinata* para tratamento de infecções no aparelho respiratório, congestão nasal e algumas manchas de pele. As

principais aplicações são como: bactericida, antimicótico e antiviral (MALAN *et al.*, 1988).

Bispo *et al.* (2001) foram pioneiros nas pesquisas sobre o extrato aquoso da *H. pectinata* na Universidade Federal de Sergipe. A espécie estudada foi coletada na farmácia viva do parque da Sementeira, em Aracaju/SE, sendo transformada em extrato vegetal. Os mesmos pesquisadores demonstraram em modelos animais que o extrato aquoso da *H. pectinata* apresentou efeito antinociceptivo nas doses de 200 e 400 mg/Kg e antiedematogênico nas doses de 300 mg/Kg e 600 mg/Kg. Também realizaram testes de toxicidade aguda onde doses de até 5 g/Kg não apresentaram letalidade, fato que sugere baixa toxicidade do extrato.

Silva *et al.* (2002) estudando os efeitos da *H. pectinata* sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos, através de imunohistoquímica, concluíram que o extrato aquoso das suas folhas pode estimular a regeneração hepática na concentração de 100 mg/kg.

Sher *et al.* (2003) avaliaram o efeito teratogênico do extrato aquoso das folhas da *H. pectinata* L. Poit em ratas Wistar gestantes. Os pesquisadores utilizaram como parâmetros o peso corporal, peso dos ovários, número de corpos lúteos e número de implantes por rata grávida. Os resultados evidenciaram que o extrato aquoso da *H. pectinata* (125, 250 e 500 mg/Kg) não teve efeito sobre a capacidade reprodutiva das ratas e não alterou a evolução dos embriões.

Fragoso-Serrano *et al.* (2005) avaliaram a atividade antibacteriana da *H. pectinata* L. Poit contra *Staphylococcus aureus* comparando essa atividade com medicamentos clínicos padrões. Tais autores isolaram quatro pectinolídeos do extrato clorofórmico da planta testada e como resultados correlacionaram poderosa

propriedade do pectinolídeo C contra cepas de linhagens resistentes aos medicamentos tradicionalmente potentes.

Nascimento (2005) avaliou *in vitro* o potencial antimicrobiano do óleo essencial da *H. pectinata* e de colutórios sobre os *Streptococcus mutans*. A pesquisa foi realizada na Universidade Federal de Sergipe e confirmou que a atividade antimicrobiana do óleo essencial do Sambacaitá é equivalente à clorexidina. Os dados obtidos demonstram o uso deste óleo essencial como alternativa promissora nos regimentos de saúde oral.

Bueno *et al* (2006) investigaram os efeitos do extrato aquoso obtido das folhas da *H. pectinata* sobre o sistema nervoso central de roedores. Foram utilizados como modelos experimentais a triagem farmacológica, campo aberto, nado forçado, hipotermia induzida por apomorfina, labirinto em cruz elevado e teste do sono induzido por barbitúrico. Os resultados sugerem um possível efeito antidepressivo do extrato aquoso das folhas da *H. pectinata*.

Melo *et al* (2005) avaliaram a associação da *H. pectinata* L. Poit com a terapia com laser na regeneração hepática e concluíram que 200 mg/Kg do extrato aquoso desta planta associado à terapia com laser pode estimular a regeneração hepática.

Em pesquisa realizada por Basílio *et al* (2006), há confirmação da presença de constituintes químicos no extrato aquoso da *H. pectinata*, como monoterpenos, sesquiterpenos, lactonas e triterpenóides, com importantes propriedades farmacológicas. Este mesmo autor relata a ação hemostática das folhas frescas da *H. pectinata*, assim como a ação bactericida frente a microrganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus sp*.

Lisboa *et al* (2006) investigaram o efeito antinociceptivo do extrato das folhas da *H. pectinata* L. Poit, utilizando as frações hexânica, acetato de etila e clorofórmica em roedores. A pesquisa foi realizada na Universidade Federal de Sergipe e comprovou que todas as frações administradas por via oral foram capazes de reduzir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e aumentar a resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente.

Melo *et al* (2006) estudaram o efeito do extrato aquoso da *H. pectinata* na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. Os autores demonstraram que o extrato aquoso da *H. pectinata* L. Poit, numa concentração de 100 mg/kg possui alguma atividade biológica estimulando a regeneração hepática e causando também um leve efeito hepatoprotetor numa concentração de 200 mg/kg.

Arrigoni-Blank *et al.* (2008) testaram a atividade antinociceptiva do óleo essencial (sesquiterpenos em sua maioria) de seis genótipos de *H. pectinata* utilizando modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e testes de placa quente. Todos os genótipos mostraram atividades antinociceptivas nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg.

Barbosa (2009) avaliou o potencial antineoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer por pacientes do estado de Alagoas. Os resultados apontaram que a *H. pectinata* possui potencial atividade antitumoral, além de ser atóxica.

Os resultados das diversas investigações em associação com os dados disponíveis na literatura demonstram o potencial das plantas medicinais como fonte de uma quase infinita variedade de compostos com atividades biológicas, podendo originar novos fármacos ou fitofármacos (FRANCO, 2010).

Estudos prévios mostram que tanto o óleo essencial como o extrato aquoso da *Hyptis pectinata* apresentam várias aplicações no tratamento de afecções inflamatórias e bacterianas. Porém, o efeito do tratamento tópico com o gel dental elaborado a partir do extrato aquoso das folhas da *H. pectinata* na Doença Periodontal Experimental ainda não havia sido demonstrado.

Devido ao exposto, o presente trabalho tem como objetivo investigar os mecanismos envolvidos no efeito do gel à base de produtos naturais na Doença Periodontal Experimental (DPE): gel elaborado a partir do extrato aquoso de *Hyptis pectinata*, em duas concentrações 5% e 10%, comparando seus efeitos com a Doxícliclina.

Capítulo I

Artigo científico:

Hyptis pectinata: Redox protection and orofacial antinociception

***Hyptis pectinata*: Redox protection and orofacial antinociception**

Paixão, M.S.^{a*}; Melo, M.S.^a; Oliveira, M.G.B.^a; Santana, M.T.^a; Lima; A.C.B.^a;
Damascena, N.P.^a; Dias, A.S.^a; Araujo, B.S.^a; Estevam, C.S.^a; Botelho, M.A.^b;
Quintans-Júnior, L.J.^a

^a*Departamento de Fisiologia. Universidade Federal de Sergipe (DFS/UFS), São Cristóvão, SE, Brazil.*

^b *Universidade Potiguar- UnP, Laboratório de Biotecnologia - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, RENORBIO, Natal,RN, Brazil.*

*Corresponding author. Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe-
UFS, Av. Marechal Rondon, s/n, São Cristóvão, Sergipe-Brazil. Tel.: +55-79-
21056645; fax: +55-79-3212-6640. E-mail addresses:
paixao.monicasilveira@gmail.com.

Abstract

Hyptis pectinata L. Poit, known as “sambacaitá”, is used in Brazil to treat inflammatory and painful disorders. In this study the antioxidant and orofacial antinociceptive properties of the aqueous extract of *H. pectinata* leaves (AEPH) was assessed *in vitro* and *in vivo* model. Thus, AEPH reduced the DPPH radical up to 72.1% with an EC₅₀ of 14.56 µg/mL. It also inhibited 40.8% of the lipoperoxidation induced by AAPH in the TBARS assay. The orofacial antinociceptive activity was evaluated in mice pre-treated with AEPH (100, 200 and 400 mg/kg, p.o.) and morphine (5 mg/kg, i.p.), which received afterwards formalin- (20 µL, 2% solution, s.c.), glutamate- (40 µL, 25 mM, s.c.) and capsaicin- (20 µL, 2.5 µg, s.c.) induced orofacial nociception. AEPH at all doses reduced ($p < 0.001$) the nociceptive response in the first (43-62%) and second (47-80%) phases of the formalin test. Besides, the effect of AEPH (400 mg/kg) was not changed in presence of naloxone (1.5 mg/kg, i.p.), an opioid antagonist. AEPH significantly inhibited mice face rubbing for capsaicin (23-69%, $p < 0.05$) and glutamate (48-77%, $p < 0.001$) at all doses. The findings suggested the AEPH has peripheral and central antinociceptive activities, which is not related to opioid receptors.

Keywords: *Hyptis pectinata*; antioxidant; orofacial pain; DPPH; TBARS.

INTRODUCTION

Among the disorders presenting painful manifestations, orofacial pain has high prevalence with signals and symptoms present up to 86% of the western population (BOVE *et al.*, 2005). Although, it can be considered as one of the important reasons for the population to find treatment in odontological clinics, there are difficulties to treat acute and chronic orofacial pain, which are mainly associated with the little knowledge on the mechanisms of the orofacial pain brain recognition. Pain control continues to be a great challenge in the medicine (Miranda *et al.*, 2009). In this context, the thousand years of human experience with plants put them in evidence as an alternative of treatment because they can be the source for the discovering of compounds with low toxicity and side effects, while highly effective against pain.

The genus *Hyptis* Jacq. consist of approximately 400 species distributed from the south of the United States to Argentina, and exhibit a major morphological diversity in the Brazilian Cerrado bioma (Harley, 1988). Plants of *Hyptis* spp. are of great economical and ethnopharmacological importance (Franco *et al.*, 2011a). It has been alleged that they possess medicinal properties and are recommended in folk medicine for the treatment of various conditions such as gastrointestinal disorders, skin infections, nasal congestion, fever, cramps, inflammation and pain (Bispo *et al.*, 2001; Franco *et al.*, 2011a,b). *Hyptis pectinata* L. Poit (Laminaceae), popularly known in Brazilian Northeast as ‘sambacaitá’ or ‘canudinho’, is a perennial aromatic bush with erect branches and low leaf density that occurs naturally in fields, forests, near highways, as well as in residential areas in states of Sergipe and Alagoas (Brazil) (Bispo *et al.*, 2001; Arrigoni-Blank *et al.*, 2005). Its presence is very common in gardens and it is frequently

used as tea (decocts or infusions) and mouthwash to treat inflammation due to being considered a natural antiphlogistic (Carvalho, 1999). Folk medicine practitioners in the Brazilian Northeast use the infusion of the fresh leaves for the treatment of gastrointestinal disturbs, inflammation, orofacial painful conditions and wound healing (Bispo *et al.*, 2001). However, little information about anti-inflammatory and orofacial analgesic properties of the plant species exists.

The aim of this study was to investigate the effect of aqueous extract from *H. pectinata* (AEPH) on orofacial nociceptive models and investigate the antioxidant potential.

MATERIAL AND METHODS

Drugs

Morphine chloridrate and 37% formaldehyde were from Merck (Brasil, São Paulo), while 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), (+)-epigallocatechin, gallic acid, capsaicin and glutamate were from Sigma (USA, St Louis). Naloxone chloridrate was from Research Biochemical Inc. (USA, Natick), while diazepam was from União Química (Brazil, SP). All other reagents and substances were of analytical grade or HPLC grade.

Plant material

H. pectinata leaves were collected during the florescence period, in the metropolitan area of Aracaju, Sergipe, Brazil (255 m, 10° 55' 56.1" South, 37° 06' 34.7" West). The plant material was identified by Dr Ana Paula Prata and a voucher specimen

was deposited in the herbarium of the Department of Biology of the Federal University of Sergipe under the number ASE 19005.

Aqueous extract preparation

Leaves were dried in an oven at 37 °C with air renewal and circulation for 48 h until complete dehydration. Then, they were triturated to give a fine powder (2 kg), which was extracted with distilled water (3:10 w/v) under constant agitation for 4 h at 35 °C. After filtration, the supernatant was lyophilized to give the crude aqueous extract (AEPH, 32 g), which was distributed in seven pots and kept in a desiccators in the *Laboratório de Farmacologia Pré-Clínica (LAPEC)* at the Federal University of Sergipe to be used in the subsequent experiments, when they were redissolved in water to give specific concentrations.

Total phenol quantification

The total phenolic content was spectrophotometrically determined using the Folin–Ciocalteu method (Sousa *et al.*, 2007). Briefly, the reaction mixture was composed of the extract (0.1 mL), distilled water (7.9 mL), Folin–Ciocalteu reagent (0.5 mL) and 20% sodium carbonate (1.5 mL). The absorbance of the reaction solution was measured at 750 nm after 2 h, interpolated against a gallic acid (GA) calibration curve, and expressed as milligram equivalents of gallic acid (mg EGA) per g of extract. All analyses were carried out in triplicate.

In vitro scavenger activity against the DPPH radical

The quantification of the antioxidant activity was carried out according to Soler-Rivas *et al.* (2000) with modifications. Gallic acid (GA, 500 µg/mL) and AEPH (500 µg/mL) were added to a solution of DPPH (40 µg/mL in methanol) to give the concentrations of 5, 10, 15 and 20 µg/mL in a final volume of 3 mL. Reaction mixture absorbance measurements were done at 515 nm in the first, fifth, and tenth minute, and then every 10 min up to 60 min. The extract absorbance was determined in methanol (3 mL) without the DPPH radical, while the blank was constituted of the DPPH radical (3 mL) treated with methanol. Results were expressed as inhibition percentage (IP), while the antioxidant amount necessary to decrease the DPPH concentration in 50% (IC₅₀) was calculated by plotting the percentage of DPPH remanent (%DPPH_{REM}) after 60 min versus extract concentrations.

In vitro lipid peroxidation inhibitory activity

The degree of lipid peroxidation prevented by the aqueous extract was monitored by measuring the production of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (Budni *et al.*, 2007). Briefly, egg yolk homogenate (1% w/v, 1000 µL) in phosphate buffer (pH 7.4) was sonicated (10 s) and mixed with freshly prepared solutions of the *H. pectinata* aqueous extract and positive controls at 5, 50, 100, 150, and 200 µg/mL. Lipid peroxidation was induced by adding AAPH (0.17M, 100 µL). Trolox and GA were used as positive controls, while the negative control was treated with water. The mixture was incubated for 30 min at 37 °C. Upon cooling, samples (500 µL) were mixed with trichloroacetic acid (15%, 500 µL) and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. Supernatant was taken, mixed with thiobarbituric acid (TBA, 0.67%, 500

μL), incubated for 60 min at 95 °C, and the formation of TBARS was measured by reading the supernatant absorbance at 532 nm after cooling. Results were expressed inhibition percentage.

Animals

Male Swiss mice (25-30 g), 2-3 months of age, were used throughout this study. The animals originated from the Central Bioterium of the Federal University of Sergipe. The animals were randomly housed in appropriate cages at 22 ± 2°C on a 12h light/dark cycle (lights on 06:00-18:00 h) with free access to food and water. All experiments were carried out between 09:00 am and 14:00 pm in a quiet room. All nociception tests were carried out by the same visual observer. Experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee (CEPA/UFS # 10/11) at the Federal University of Sergipe.

Formalin-induced orofacial nociception

Mice (n=8, per group) were pretreated with AEPH (100, 200 and 400 mg/kg, v.o), morphine (Reference drug, 5 mg/kg, i.p.) and vehicle (Control group, 0.2% Tween 80 in saline, p.o). After 60 minutes, formalin (2% formaldehyde in saline, 20 μL) was administered to the right upper lip of the mice and the animals were observed during the initial 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 40 min (inflammatory phase). The time they spent rubbing the area treated with formalin with their fore- or hindpaws was recorded and considered as indicative of nociceptive behavior (Luccarini *et al.*, 2006). The opioid antagonist naloxone was administered (1.5 mg/kg, i.p.) 15 minutes before the treatment with the highest dose of AEPH in a separate group of mice to check a

possible action of the extract mediated by the opioid system (Quintans-Júnior *et al.*, 2010).

Glutamate-induced orofacial nociception

The procedure followed the method previously described by Beirith *et al.* (2002) with some alterations. Male mice (n=8, per group) were treated with the AEPH, morphine and vehicle as previously described for formalin 1h before subcutaneous administration of glutamate (25 μ M, 40 μ L/paw) in the right upper lip. Animals were then observed individually for 15 min and the nociception quantification was performed by measuring the time (s) that the animals spent face-rubbing the injected area with fore- or hindpaws (Quintans-Júnior *et al.*, 2010).

Capsaicin-induced orofacial nociception

This orofacial pain test was induced by subcutaneous administration of capsaicin as described previously by Pellisier *et al.* (2002), with alterations (Quintans-Júnior *et al.*, 2010). Male mice (n=8, per group) received subcutaneous injection of capsaicin (20 μ L, 2.5 μ g) in the upper lip. In pilot studies performed in our laboratory, the animals showed the nociceptive behavior of rubbing the orofacial region with greater intensity for a period of 42 minutes after the injection of capsaicin. Therefore, the quantification of nociception was performed during this period, measuring the time (s) that the animals exhibited rubbing the orofacial region with the fore- or hindpaws. AEPH, morphine and vehicle were administered as previously described for formalin.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Evaluation of the motor activity (*Rota-rod test*)

To investigate if the treatments could influence the motor activity of the animals and consequently impair the assessment of the nociceptive behavior in the experimental models, the motor activity was evaluated in a Rota-rod apparatus. Initially, the mice able to remain on the Rota-rod apparatus (AVS[®], Brazil) longer than 180 s (7 rpm) were selected 24 h before the test. Then, the selected animals were divided into five groups (n=8, per group), which were treated with AEPH and vehicle as previously described for formalin, as well as diazepam (DZP, 3 mg/kg, i.p.). Each animal was tested on the Rota-rod apparatus 30, 60 and 120 min later and the time (s) remained on the bar for up to 180 s was recorded.

Statistics analysis

Data obtained from animal experiments were expressed as mean and standard error of the mean (mean $\pm$ S.E.M.). Statistical differences between the treated and control groups were evaluated by ANOVA followed by Dunnett's test. All statistical analyses were done using Graph Pad Prism 3.02 (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

DPPH scavenger potential, lipid peroxidation inhibitory activity and total phenol content.

When the antioxidant effects of the AEPH were investigated by the DPPH radical assay, the highest inhibition of the radical was 72.1% at 20 μ g/mL after 60 min

of reaction, while the control (+)-epigallocatechin neutralized 95.5% of the DPPH. Although AEPH and control showed slightly different IP values, there was no statistical difference for their EC₅₀ values (16.3 ± 1.4 and 16.7 ± 1.2 µg/mL, respectively, $p > 0.05$). In addition, *in vitro* lipoperoxidation of egg yolk was induced by AAPH to study the antioxidant effect of the AEPH against lipid oxidation. In presence of the inducer, the extract protected the egg yolk against lipoperoxidation with inhibitions of TBARS ranging from 8.1 to 40.8% (Figure 1). Although control gallic acid showed a highest TBARS inhibition (31.4%) at the lowest concentration (5 µg/mL) than AEPH, TBARS production was moderately inhibited at its highest concentration (60.4%). The total phenol content determined for the AEPH was 155.02 ± 11.33 mg EGA/g extract.

Formalin test

Results for the formalin test are show in Figure 2. When AEPH was administered to mice 30 min before formalin administration, it significantly ($p < 0.001$) reduced the time the animals spent rubbing their faces by 62%, 43.3% and 54% at 100, 200 and 400 mg/kg respectively, during the neurogenic phase of the assay (Figure 2A). In the inflammatory phase, which occurs between 15 and 40 min post-formalin administration, all doses significantly ($p < 0.01$) reduced the face rubbing by 47.4%, 63.7% and 79.2%, respectively (Figure 2B). Morphine, used as control drug, was able to reduce the nociceptive behavior of mice in over 97% on both phases. Although naloxone reversed the effects of morphine on both phases, the pretreatment with this opioid receptor antagonist did not reverse sigificantly ($p > 0.05$) the AEPH (400 mg/kg) antinociceptive effect in mice.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Capsaicin test

Figure 3 shows the results for the capsaicin orofacial pain model. Pre-treatment of mice with the AEPH reduced significantly ($p < 0.05$) the animal nociceptive behaviour of face rubbing in a dose-dependent manner by 23.4%, 39.8% and 68.9% at 100, 200 and 400 mg/kg, respectively. Morphine reduced over 96% of the face rubbing.

Glutamate test

Mice nociceptive behavior was significantly reduced ($p < 0.001$) for all doses of AEPH (Figure 4). When compared with capsaicin, glutamate-induced nociception was more inhibited with the two lowest doses of AEPH (48.7% and 62% for 100 and 200 mg/kg, respectively) than observed for capsaicin, while at 400 mg/kg, glutamate nociception inhibition was similar to capsaicin (66.3%). Morphine reduced over 98% of mice face rubbing.

Rota Rod test

At the evaluation of the motor activity (Rota-rod test), AEPH-treated mice, all doses, did not show any significant motor performance alterations (Data no shown).

DISCUSSION

Formalin administration in the orofacial region induces a biphasic behavioural nociceptive response. The first phase is neurogenic and corresponds to the direct stimulation of nociceptors, predominantly of the C fibers by influence of the pain mediators substance P, glutamate and bradykinin. This phase is sensitive to analgesics

that act on the CNS (Luccarini *et al.*, 2006). The second phase of nociception is inflammatory and is resultant of the central sensitization of nociceptors and second order neurons, as well as the action of inflammatory mediators like histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandins, which are liberated due to tissue lesions. This phase is said to be peripheral and can be inhibited by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and substances that act on the CNS. Therefore, a drug that acts mostly as central analgesics inhibit both the first and the second phase, while drugs that act peripherally act just inhibiting in the latter phase (Tjølsen *et al.*, 1992, Venâncio *et al.*, 2011). The results of the present study showed that AEPH is active against neurogenic and inflammatory pain since it inhibited the mice face-rubbing nociceptive behavior in both phases. In addition, when the mechanism of AEPH action was investigated using naloxone, a well-know opioid antagonist, its effect was not reversed, suggesting it analgesic activity does not involve opioid receptors. In addition, AEPH seems to be more active against orofacial pain than hind paw pain according to the comparison with the results of Bispo *et al.* (2001). In that study, pre-treating mice with AEPH had no significant effect on the first phase of pain, while it was able to reduce 70% of the nociceptive behavior in the second phase of the formalin test at 200 mg/kg similar to our results (63.7%). However, at 400 mg/kg, while AEPH reduced almost 80% of the face rubbings in the present study, it reduced the licking time of the hind paw in only 30.2%. AEPH have also shown antiedematogenic activity in the study of Bispo *et al.* (2001) by reducing paw edema induced by carrageenan and arachidonic acid, suggesting it can also inhibit the release of substance P and the production of inflammatory molecules such as serotonin, histamine, bradykinin and prostaglandins.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

To further investigate the mechanism by which AEPH act against orofacial pain, capsaicin was used. Capsaicin directly activates Type C fibers through vanilloid receptors (TRPV1), which induces a cation inflow to produce neuron depolarization and excitation (Pelissier *et al.*, 2002). This will release initially neuropeptides such as tachykinins (neurokinin A), substance P, calcitonin peptide, and latter excitatory aminoacid (aspartate and glutamate), nitric oxide, and other pro-inflammatory substances from peripheral terminals, which will then transfer the painful stimulus through the trigeminal nerve (fifth cranial nerve), the facial nerve responsible for the detection of chemical and thermal painful stimulus in the orofacial region (Waning *et al.*, 2007; Honda *et al.*, 2008). AEPH was able to reduce capsaicin nociceptive effect in a dose-dependent manner, which indicates it is acting as an antagonist of vanilloid receptors, possibly by inhibiting the initial release of substance P or bounding into its receptor neurokinin 1 (NK-1)

AEPH effect on the nociception mediated by excitatory aminoacids was also investigated using glutamate orofacial model to evoke episodes of human pain and mechanical hyperalgesia (Cairns *et al.*, 2001). Excitatory aminoacids are involved in the nociceptive transmission in the spinal cord and caudal trigeminal subnucleus (Bonjardim *et al.*, 2011). When primary afferent fibers are sensitized by nerve or tissue injury or by response to noxious stimuli, amino acids are released from the central and spinal afferents trigeminal (Keast and Stephens, 2000; Lam *et al.*, 2005). AEPH exhibited significant antinociceptive activity when the glutamate model was used. Therefore, it can be suggested that it interfere with the glutamatergic system. This may be associated with interferences in nociceptive peripheral , spinal and supraspinatus sites through metabotropic receptors coupled with second messenger G protein or

ionotropic receptors including those selectively sensitive to N-Methyl-D-aspartic acid (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-4-propionic metilisoxazol (AMPA) acid and kainite (Fundytus, 2001; Beirith *et al.*, 2002).

Since drugs that interfere with motor activity or induce sedation can give false-positive nociceptive tests, we decided to confirm the results observed for the antinociceptive tests by performing the Rota-rod test, which provides subsidies for a good index for neurological deficits including sedation, muscle relaxant and decreased motor activity (Novas *et al.*, 1988; Pu *et al.*, 1995). Mice treated with AEHP did not show any alteration of their motor performance, which showed that the plant extract do not have any muscle relaxation effect. Therefore, the results in the nociceptive tests can be solely attributed to the extract at the used doses.

It is known that inflammatory processes generate free radical as byproducts, which will propagate the symptoms of the inflammation, as well as the time it will take in the body (Hofseth and Ying, 2006). Free radicals are unstable and reactive towards membrane essential molecules such as fatty acids, besides nucleic acids, because they are chemical species having one or more unpaired electrons allowing them to take electrons of these molecules to stabilize their structure by attacking double bonds (Hofseth and Ying, 2006; Sousa *et al.*, 2007). This will damage the cell metabolism and create ideal conditions for the development of radical-related diseases. Antioxidants are able to inhibit or reduce lesions caused by free radical in the cells and can reduce the risk of chronic diseases development such as cardiovascular illnesses, cancer, diabetes, Alzheimer's and Parkinson's (Hofseth and Ying, 2006; Hu *et al.*, 2012). Therefore, they should be neutralized before they can act upon the cell structure. *In vitro* studies in the present study showed AEHP can significantly inhibit free radicals and may protect the

organism, although moderately, against membrane lipid oxidation that if not prevented can destabilize the plasmatic membrane and damage the cell metabolism.

Together, our results suggest that AEPH has an important neurogenic and inflammatory orofacial antinociceptive effect, without interference in the motor performance. The precise mechanisms through which the AEPH exerts its action are currently under investigation, but seems it is related to the vaniloid and glutamate receptors. The opioid system seems unlikely to participate in the antinociception caused by the extract. Furthermore, the orofacial antinociceptive activity demonstrated in the present study supports, at least partly, the ethnomedical use of this plant in painful facial.

Acknowledgments

We thank Mr Osvaldo Andrade Santos for the technical support. We would like to thank the the National Council of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq/Brazil) for the fellowship support. Author Mônica S. Paixão has scholarships from Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

Conflict of Interest

There are no conflicts of interest.

References

Arrigoni-Blank MF, Silva-Mann R, Campos DA, Silva PA, Antonioli AR, Caetano LC, Sant’Ana AEG, Blank AF. 2005. Morphological, agronomical and pharmacological

- characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. *Rev Bras Farmacogn* **15**: 298-303.
- Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* **924**: 219-228.
- Bispo MD, Mourão RH, Franzotti EM, Bomfim KB, Arrigoni-Blank MF, Moreno MP, Marchioro M, Antonioli AR. 2001. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol* **76**: 81-86.
- Bonjardim LR, Silva AM, Oliveira MGB, Guimarães AG, Antonioli AR, Santana MF, Serafini MR, Santos RC, Araújo AAS, Estevam CS, Santos MRV, Quintans-Júnior LJ, Azevedo EG, Botelho MA. 2011. *Sida cordifolia* leaves extract reduces orofacial nociceptive response in mice. *Phytother Res* **25**: 1236-41.
- Bove SR, Guimarães AS, Smith RL. 2005. Characterization of patients in a temporomandibular dysfunction and orofacial pain outpatient clinic. *Rev Lat Am Enferm* **5**: 686-691.
- Budni P, Petronilho FC, Zanette VC, Marcondes C, Zoch AN, Reginatto FH, Dal-Pizzol F. 2007. Estudos preliminares da atividade antioxidante do extrato hidroetanólico de folhas jovens e adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). *Latin Am J of Pharm* **26**: 394-398.
- Cairns BE, Hu JW, Arendt-Nielsen L, Sessle BJ, Svensson P. 2001. Sex-related differences in human pain and rat afferent discharge evoked by injection of glutamate into the masseter muscle. *J Neurophysiol* **86**:782-91.

Franco CR, Antonioli AR, Guimarães AG, Andrade DM, Jesus HC, Alves PB, Bannet LE, Patrus AH, Azevedo EG, Queiroz DB, Quintans-Júnior LJ, Botelho MA. 2011a Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*. *Phytother Res* **25**: 1693-1699.

Franco CRP, Alves PB, Andrade DM, Jesus HCR, Silva EJS, Santos EAB, Antonioli AR, Quintans-Júnior LJ. 2011b. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. *Rev Bras de Farmacogn* **21**: 24-32.

Fundytus ME. 2001. Glutamate receptors and nociception. *CNS Drugs* **15**: 29-58.

Hofseth LJ, Ying L. 2006. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochem et Biophys Acta* **1765**: 74-84.

Honda K, Kitagawa J, Sessle BJ, Kondo M, Tsuboi Y, Yonehara Y, Iwata K. 2008. Mechanisms involved in an increment of multimodal excitability of medullary and upper cervical dorsal horn neurons following cutaneous capsaicin treatment. *Mol Pain* **19**: 4-59.

Hu W, Huang C, Wang M.-H. 2012. Chemical composition, nutritional value, and antioxidant constituents of *Kalopanax pictus* leaves. *Food Chemistry* **131**: 449-455.

Karthikeyan M, Deepa K. 2011. Anti-inflammatory activity of *Premna corymbosa* (Burm.f.) Rottl. & Willd. leaves extracts in Wistar albino rats. *Asian Pac J of Trop Med* **4**: 510-513.

Keast JR, Stephensen TM. 2000. Glutamate and aspartate immunoreactivity in dorsal root ganglion cells supplying visceral and somatic targets and evidence for peripheral axonal transport. *J Com Neurol* **424**: 577-87.

- Lam DK, Sessle BJ, Cairns BE, Hu JW. 2005. Neural mechanisms of temporomandibular joint and masticatory muscle pain: a possible role for peripheral glutamate receptor mechanisms. *Pain Res & Manag* **10**: 145-52.
- Luccarini P, Childeric A, Gaydier AM, Voisin D, Dallel R. 2006. The orofacial formalin test in the mouse: a behavioral model for studying physiology and modulation of trigeminal nociception. *Pain* **7**: 908-914.
- Marlière LDP, Ribeiro AQ, Brandão MGL, Klein CH. 2008. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn* **18**: 754-760.
- Miranda HF, Sierralta F, Prieto JC. 2009. Synergism between NSAIDs in the orofacial formalin test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **92**: 314-318.
- Nascimento PF, Alviano WS, Nascimento AL, Santos PO, Arrigoni-Blank MF, de Jesus RA, Azevedo VG, Alviano DS, Bolognese AM, Trindade RC. 2008. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. *Oral Dis* **14**: 485-9.
- Novas ML, Wolfman C, Medina JH, De Robertis E. 1988. Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl- β -carboline-3-carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacol, Biochem and Behav* **30**: 331-336.
- Oliveira HB, Kffuri CW, Casali VWD. 2010. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Farmacogn* **20**: 256-260.
- Pelissier T, Jacques P, Radhouane D. 2002. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine. *Pain* **96**: 81-87.

- Pu XC, Wong PT, Gopalkrishnakone P. 1995. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Phiophagus hannah*). *Toxicon* **33**: 1425-1431.
- Quintans-Júnior LJ, Melo MS, De Sousa DP, Araújo AAS, Onofre ACS, Gelain DP, Gonçalves JCR, Araújo DAM, Almeida JRGS, Bonjardim LR. 2010. Antinociceptive activity of citronellal in formalin-, capsaicin- and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. *J Orofacial Pain* **24**: 305-312.
- Raymundo LJ, Guilhon CC, Alviano DS, Matheus ME, Antonioli AR, Cavalcanti SC, Alves PB, Alviano CS, Fernandes PD. 2011. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *J Ethnopharmacol* **134**: 725-32.
- Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ. 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytocheml Anal* **11**: 330-338.
- Sousa CMM, Silva HR, Viera-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. 2007. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Quim Nova* **30**: 351-355.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JN, Hole K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **51**: 5-17.
- Venâncio AM; Marchioro M, Estevam CS, Melo MS, Santana MT, Onofre ASC, Guimarães AG, Oliveira MGB, Alves PB, Pimentel HC, Quintans-Júnior LJ. *Ocimum basilicum* leaf essential oil and (-)-linalool reduce orofacial nociception in rodents: a behavioral and electrophysiological approach. *Rev Bras Farmacog* **21**: 1043-1051.

1
2
3
4 Waning J, Vriens J, Owsianik G, Stüwe L, Mally S, Fabian A, Frippiat C, Nilius B,
5
6 Schwab A. 2007. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels. *Cell*
7
8 *Calcium* **42**: 17-25.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

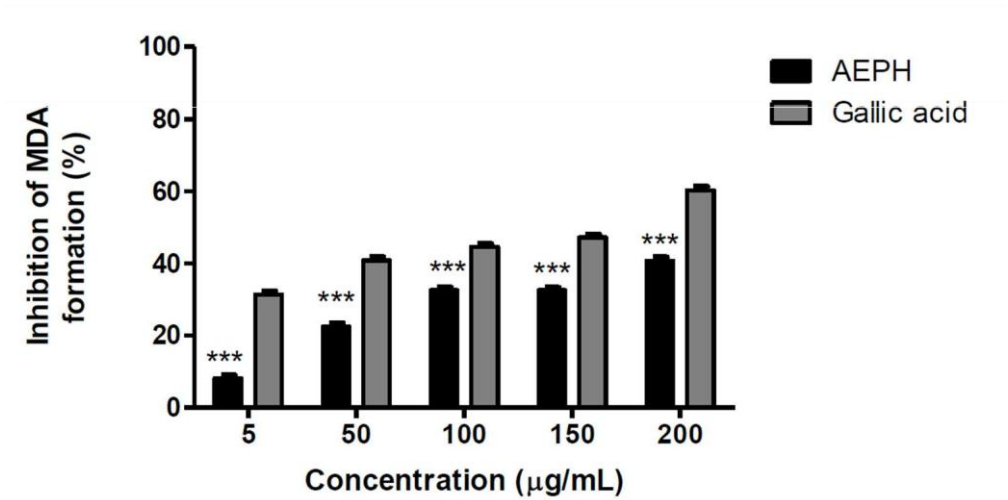
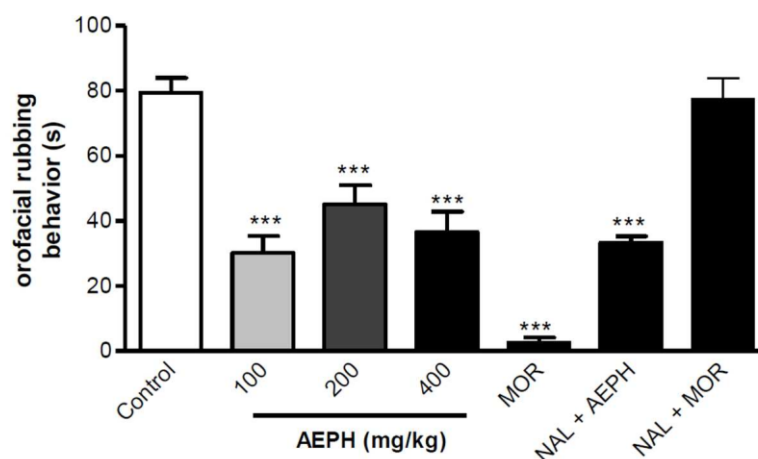


Figure 1. Inhibition effect of AEPH on the formation of malondialdehyde (MDA). Significant differences were found by comparing AEPH with control (ANOVA followed by Tukey’s post hoc test): ***p < 0.001. Asterisks denotes comparison between AEPH and control for each concentration.
102x54mm (300 x 300 DPI)

Review

A)



B)

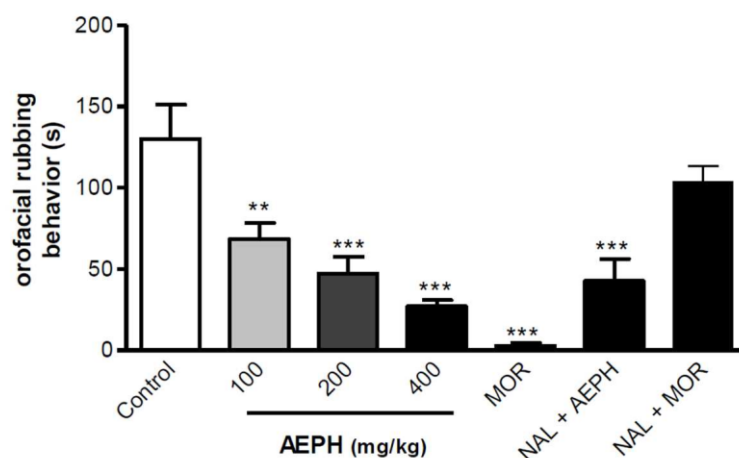


Figure 2. Effect of pretreatment of animals with control (vehicle, p.o.), AEPH (100, 200 and 400 mg/kg, p.o.), morphine (5 mg/kg, i.p.), AEPH (400 mg/kg, p.o.) plus naloxone (1.5 mg/kg, i.p.) and morphine (5 mg/kg, i.p.) plus naloxone (1.5 mg/kg, i.p.) in the nociception induced by 2% formalin (s.c.). A: first phase (0 to 5 min); B: second phase (15 to 40 min). Significant differences were found by comparing group (n=8) means with control (ANOVA followed by Dunnet's post hoc test): **p < 0.01 and ***p < 0.001.

96x132mm (300 x 300 DPI)

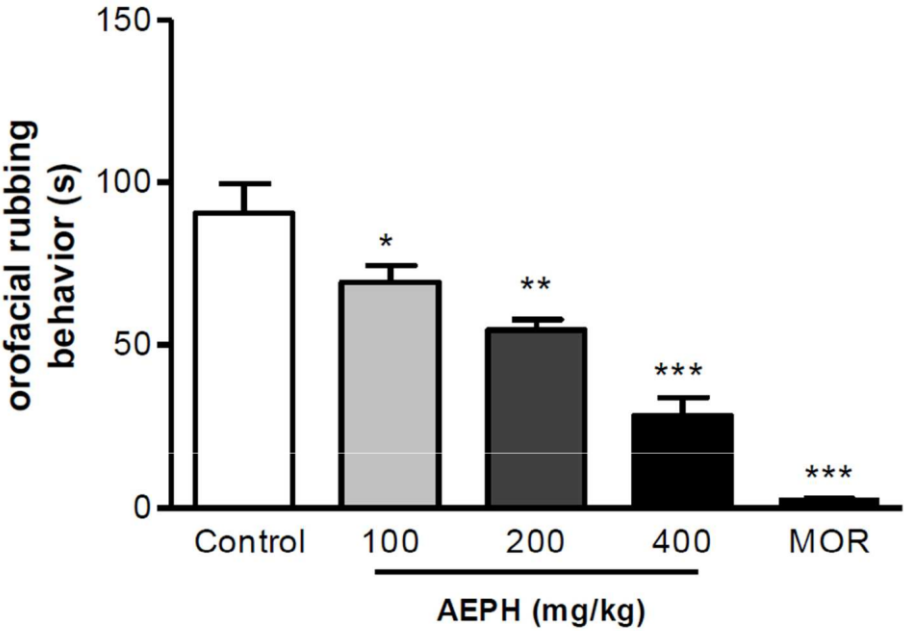


Figure 3. Effect of pretreatment of animals with control (vehicle, p.o.), AEPH (100, 200 and 400 mg/kg, p.o.) and morphine (5 mg/kg, i.p.) in the nociception induced by injection of capsaicin (20 μ L) in the orofacial region. Significant differences were found by comparing group (n=8) means with control (ANOVA followed by Dunnet's post hoc test): *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.
80x55mm (300 x 300 DPI)

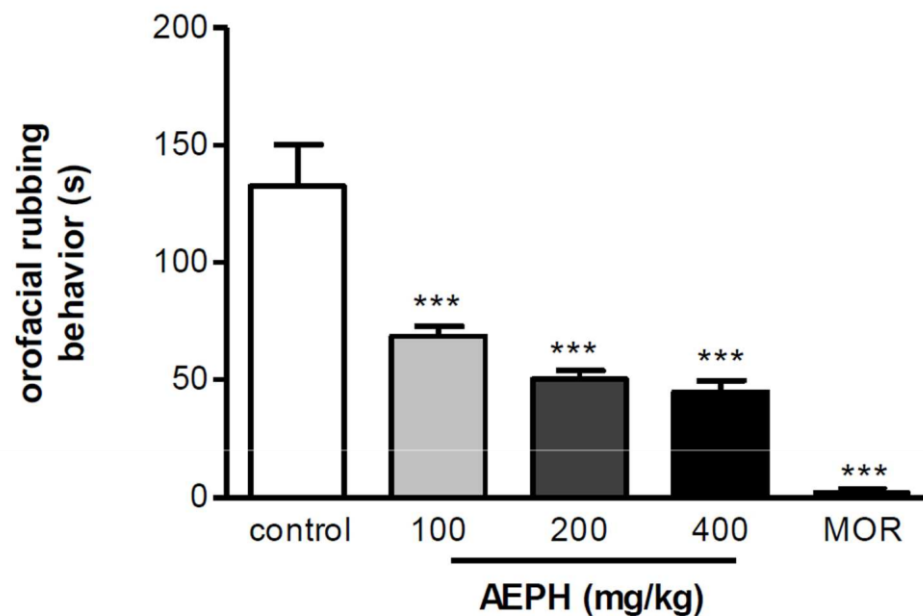


Figure 4. Effect of pretreatment of animals with control (vehicle, p.o.), AEPH (100, 200 and 400 mg/kg) or morphine (5 mg/kg) in the nociception induced by injection of glutamate (25 μ M, 40 μ L/paw) in the orofacial region. Significant differences were found by comparing group (n=8) means with control (ANOVA followed by Dunnet's post hoc test): ***p < 0.001.
88x58mm (300 x 300 DPI)

Capítulo II

Artigo científico:

Hyptis pectinata gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats

***Hyptis pectinata* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats**

Mônica Silveira. Paixão^{*1}, Nicole Prata. Damascena³, Andrea Ferreira Soares¹, Denise Viana de Andrade Oliveira¹, Francilene Souza Amaral³, Adriano Antunes de Souza Araújo³, Brancilene Silva Araújo³, Marco Antonio. Botelho⁴, Lucindo José. Quintans. Junior²

¹Department of Odontology, Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brazil

²Laboratory of Natural Product Pre-clinical Pharmacology, Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brazil

³Laboratory of Biochemistry and Natural Product Chemistry, Federal University of Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, Rosa Elze, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brazil

⁴Laboratory of Chemistry Technology, Federal Institute of Education, Science and Technology of Ceará, Av. Treze de Maio, 2081, Benfica, 60040-531, Fortaleza-CE, Brazil

*Corresponding author:

Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, Rosa Elze, 49100-000 São Cristóvão-SE Brasil. Tel.: +55 79 (3214-0604), Fax: +55 79 32140604, paixao.monicasilveira@gmail.com

Abstract

Hyptis pectinata L. Poit (Lamiaceae) is an aromatic, abundant and broadly used plant species in Sergipe. The aim of the present study was to analyze the relation between periodontitis and changes in the corporal mass and alveolar bony structure after induction of Experimental Periodontal Disease (EPD) in rat treated or not treated with *H. pectinata* L. Poit gel at 5% (GS5%) and 10% (GS10%), comparing their effects with doxycycline gel at 10% (GD – positive control) and vehicle gel (GV – negative control). The gels were locally applied in the gingival region immediately after the EPD induction for ligature (3x/day, 11 days). Bone destruction was determined through clinical exam, histopathological analysis and cone beam computed tomography (CBCT) of the experimental animals (n=36). After 11 days of periodontitis induction, all groups that received ligature presented a decrease on the corporal mass, while the naive group (Group I - without EPD) showed an increase in the corporeal weight ($p<0.05$). CBCT results have shown healthy bony structure in the group I and bony resorption for the test groups. Histopathological analysis confirmed the healthy bony structure for group I animals, while the test groups exhibited bony loss in several degrees. VI group (non-treated) in particular had an intense inflammatory process represented by acute infiltration due to PMN and vasculatization, resorption lacunae rounded by clastic cells. When the periodontium of the animals treated with GS10% was histopathologically analyzed, insertion periodontium was preserved, although a discreet gingival inflammatory process due to infiltration was observed, which was similar to GD. The results for these groups were significantly different of the vehicle group ($p<0.05$). According to the results, the gel based in the aqueous extract of *H. pectinata* at 10% can prevent bony loss in EPD similarly to doxycycline 10%.

Keywords: Experimental Periodontal Disease, *Hyptis pectinata* ge, antiinflammatory activity, doxycycline.

Introduction

Oral bacteria are associated to many systemic diseases such as pneumonia and cardiovascular diseases. Therefore, it has been emphasized the need to oral care in the systemic control of health (TAKARADA *et al.*, 2004). In this context, pathological cases of gingivitis and periodontitis, the oral illnesses more prevalent in Brazil, are target of special attention in needy communities, especially in the Brazilian Northeast, where the individuals with these pathologies normally have evolved cases, which are accompanied of deterioration of the dental unit as well as their bony support (BOTELHO *et al.*, 2007).

Periodontitis, an important cause of teeth loss in adults, is a chronic inflammatory disease characterized by located bony resorption (CHAMBRONE & CHAMBRONE, 2006). Recent researches have indicated the local utilization of doxycycline gels as an isolated treatment, which prevent tooth scaling and root planning and are effective in combating the periodontal disease (TINOCO & TINOCO, 2000). In addition, it has been suggested that the association of natural products with preventive care can reduce the high incidence of diseases that affect the dental element as the periodontal disease (JUIZ *et al.*, 2010).

Hyptis species are very aromatic plants that present important pharmacologically active substances with antimicrobial, antifungal, anti-HIV and antiinflammatory activities, and cytotoxicity and insecticide properties. According to FALCÃO & MENEZES (2003), terpene metabolites are the main class of substances responsible for these biological activities.

Hyptis pectinata (L.) Poit (Lamiaceae) is an aromatic perennial bush species with low foliar density and erect branches that is widely spread in Sergipe and Alagoas states. It can be found in fields, forests, highway borders and around residences in the cities to be used for treating gastrointestinal problems (CARVALHO *et al.*, 1999). Its aqueous extract has previously shown antinociceptive and antiedematogenic effects by reducing symptoms up to 54% at 400 mg/kg, which validate the popular use of the plant (BISPO *et al.*, 2001; LIRA, 2006).

The aim of the present study was to analyze the relation between periodontitis and changes in the corporal mass and alveolar bony structure after induction of Experimental Periodontal Disease (EPD) in rat treated or not treated with *H. pectinata* L. Poit gels compared with the standard drug doxycycline.

Material and Methods

Plant material

H. pectinata leaves were collected during the florescence period in the metropolitan area of Aracaju, Sergipe, Brazil (255 m, 10°55'56.1" South, 37°06'34.7" West). The plant material was identified, and a voucher specimen was deposited in the herbarium of the Department of Biology in the Federal University of Sergipe, under the number 19005.

Aqueous extract preparation

Leaves were dried in an oven at 37 °C with air renewal and circulation for 48 h until complete dehydration. Then, they were triturated to give a fine powder (2 kg), which was extracted with distilled water (3:10 w/v) under constant agitation for 4 h at 35 °C. After filtration, the supernatant was lyophilized to give the dry crude aqueous extract (CAE, 32 g). CAE was distributed in seven pots and kept in a desiccator in the Laboratory of Natural Product Pre-clinical Pharmacology of the Federal University of Sergipe to be used in the subsequent experiments, when they were redissolved in water to give specific concentrations.

Gel preparation

CAE was maintained under dark to avoid the possible light degradation of some of the compounds present in it. For the gel base production, 0.2% Nipagim® (Batch GBG0020625, Pharma Special), 0.05% EDTA disodium (Batch 090707#2, DEG) and purified water were measured and heated together in a water-bath up to 70°C. When the temperature was reached, the mixture was removed from the water-bath and slowly added to hydroxyethyl cellulose, which was stirred until complete homogenization and solubilization of the polymer. When this previous mixture reached 40°C, Germal® previously solubilized in water was added to complete homogenization until the gel formation. Afterwards, triethanolamine was added for pH adjustment to the range 5.0-6.0 at environment temperature. *H. pectinata* (L.) Poit extract was mixed with propilenoglicol (Batche 10030930C, Pharma Nostra) and incorporated in the gel at 5% or 10% considering gel mass.

The gels were stored in white polyethylene containers kept hermetically sealed at 8°C until use. Stability studies to evaluate gel consistency on a 2 month period were performed with the formulations being kept in different conditions (4°C, 37°C and environment temperature) and the gel formulation viscosity was measured in regular intervals. The study

indicated that gel viscosity, color and consistency did not change significantly during the period analyzed in the specified circumstances.

Animals

A previous training with the research team on anesthesia procedures, adaptation and handling of the animals and gels and convenient placement of the bondages was done before the beginning of the experiment. The animals were positioned on the surgery table to allow the rat oral opening maintenance, facilitating the access to the maxilla posterior region teeth.

Thirty-six male Wistar rats (100-200g) were housed in temperature controlled rooms and received water and food *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with local guidelines on the welfare of experimental animals and with the approval of the Committee on Ethics in Animal Research of the Federal University of Sergipe (#47/09).

The experimental groups were divided in naive (animals non-treated and not submitted to EPD), non-treated group (NT, animals subjected to EPD, but without treatment), vehicle-treated group (V, animals subjected to EPD and treated with vehicle gel), GS5% group (animals subjected to EPD and treated with local *H. pectinata* gel at 5%, w/w), GS10% group (animals subjected to EPD and treated with local *H. pectinata* gel at 10%, w/w) and DG group (animals subjected to EPD and treated with local doxycycline gel at 10%, w/w). Doxycycline was utilized as a reference drug. The local treatment with the gel was first performed immediately after the surgical procedure and then three times/day until the animal sacrifices on the 11th day.

The animals in the test groups with periodontal diseases (n=30 total) received a ligature, while the animals in the control group (naive, n=6) were not induced for periodontitis, although they were submitted to capture, hold, daily weighing and sacrifice similarly to the test groups.

Induction of experimental periodontal disease (EPD).

A sterilized nylon (3.0) thread ligature was placed around the cervix of the second upper-left molar of rats anesthetized with 10% ketamina (0.08 mL/100 g, i.p.) and xilazyne chloridrate (0.04 mL/100 g). The ligature was knotted on the buccal side of the tooth, resulting in subgingival position palatinally and in supragingival position orally. The contralateral right side was used as the unligated control. Animals were weighted daily.

Histopathological analysis

After sacrifice under anesthesia, animals had their maxillae excised. The specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin and demineralized in 7% nitric acid. These specimens were then dehydrated, embedded in paraffin and sectioned along the molars in a mesio-distal plane for hematoxylin and eosin staining. Sections of 6 µm thickness, which included the roots of the first and second molars, were used. The areas between the first and second molars, where the ligature was placed, were analyzed under light microscopy using a 0 to 3 score grade, considering the inflammatory cell influx, and alveolar bone and cementum integrity, as described previously (Botelho *et al.*, 2007): score 0, absence or only a discrete cellular infiltration (inflammatory cell infiltration is sparse and restricted to the region of the marginal gingival) with preserved alveolar process and cementum; score 1, moderate cellular infiltration (inflammatory cellular infiltration present all over the gingival insert) with some minor alveolar resorption process and intact cementum; score 2, accentuated cellular infiltration (inflammatory cellular infiltration present in both gingival and periodontal ligament) with accentuated degradation of the alveolar process and partial destruction of cementum; and score 3, accentuated cellular infiltrate, complete resorption of the alveolar process and severe destruction of cementum.

Weight loss analysis

All the animals had their corporal mass measured before the surgery and in the 11 subsequent days, which was the experimental period. Values observed were expressed as the variation of the corporal mass (g) regarding the initial mass.

Cone-beam computed tomography

Prior the cone-beam computed tomography (CBCT), animals were sacrificed and their hemiarcades were dissected. These hemiarcades were submitted to CBCT using a tomography scanner model i-Cat (Imaging Sciences International) with an exposition area of 6 cm and exposition time of 40 sec with voxel of 0.2 mm (maximum resolution). The digital images were analyzed using their axial, sagital and coronal cuts in the program i-Cat Cone-Beam 3D Dental Imaging System, version 3.1.62. Results were expressed as escores, in accordance with standardization performed to LAPEC – Laboratory of Pre-clinical Pharmacology of

Natural Products to Federal University of Sergipe (2011): 0, absence or discreet bony reabsorption; 1, bony reabsorption moderated; and 2, severe bony reabsorption.

Statistical analysis

The data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. Differences between groups were evaluated by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Bonferroni's tests using GraphPad Prisma v5.0 when means were compared. Statistical differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

Results

Macroscopic analysis

Before the histopathological analysis, the analysis of gingiva alterations with the odontological magnifying glass Bioart 4x allowed to note macroscopic texture modifications, absence of interproximal papilla and changes in the position or outline of gingiva in the animals of the groups with induced periodontal disease (NT, V, GS5%, GS10% and DG), which were not present in the naive group.

Gingiva of the upper second molar teeth in vestibular, palatine and interproximal regions of the naive animals had similar clinical aspects. It rounded the cervical portion of the teeth and finished in a pointed form similar a knife edge. Interdental papillas were sharp and finished in triangular form. However, when the animals in the groups with induced periodontal disease (NT, V, GS5%, GS10% and DG) were evaluated, it was shown that they had flaccid gingiva in the region of the upper first molar with apical migration of gingival margin and absence of interdental papillas, characterizing an inflammatory process in the gingival vestibular and palatine faces.

Histopathological analysis

The histopathological analysis of the region between the first and second molars of the normal periodontium shows periodontal ligament (pl), alveolar bone (ab), dentin (d), cementum and gingiva, (Fig. 1A). The histopathology of the periodontium of the animals subjected to periodontitis in the Vehicle group revealed intense inflammatory cell infiltration

coupled with cementum destruction and complete alveolar process resorption (Fig. 1C), whose median received score 3. A reduction of inflammatory cell infiltration with a partial preservation of the cementum and alveolar process was found in the periodontium of animals in GS10% and DG (Fig. 1E and 1F, respectively), whose medians received score 1. These values were statistically significant ($P < 0.05$, respectively) when compared to the Vehicle (Fig. 2).

Weight loss analysis

As of general, all animals in the experimental groups presented variation in their weight after the experimental analysis period. Animals in the experimental groups treated with *H. pectinata* and doxycycline gels had an increased weight after 11 days ($P < 0.05$), while a decrease in the corporeal body mass was observed for animals in the NT and V groups (Fig. 3). However, animals in the normal group, which did not have periodontal disease, showed the highest increase in the body weight (Fig. 3).

CBCT

CBCT images of the animal hemiarcades showed alveolar bony losses in varied degrees (Fig. 4) when compared to the naive group, after 11 days of experiment. Severe alveolar bony losses were observed in the animal hemiarcades of the NT and V groups. In the other hand, the hemiarcades obtained from the animals treated with *H. pectinata* gels (GS5% and GS10%) had a significantly lower bony loss ($P < 0.05$), which was similar to the one observed for the DG group (Fig 5).

Discussion

This study demonstrates that the local application of a dental gel based on *H. pectinata* (L) Poit has anti-inflammatory effect and also prevents alveolar bone resorption and weight loss in animals with periodontitis.

Periodontal diseases are still considered the main oral health problems in the majority of the industrialized countries, affecting 60-90% of children in schools as well as adults. In spite of the great advances, periodontitis is frequent in many communities not only in Brazil, but also in the developing world, particularly between less favored economically groups (PETERSEN, 2005). As it is frequently seem in these countries, where natural products are used to treat several illnesses, it has been suggested the use of gels based in natural products

in local application as supporting in the periodontal therapy (PAI *et al.*, 2004). In this context, previous studies have shown that some natural products such as propolis (rich in flavonoids) and essential oils have cariostatic activity by inhibiting the enzymes that facilitate microbial aggregation and biofilm production as well as the growth of *Streptococcus mutans* (DUARTE *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2006).

The use of systemic drugs in periodontal disease treatment has been demonstrated in several studies (LIMA, 2000; BEZERRA *et al.*, 2002; MENEZES *et al.*, 2005). However, few studies involving the treatment with local application of antimicrobial drugs as adjunct to the treatment of the experimental periodontal disease. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of the local application of gels based in *H. pectinata* (5% and 10%) in the gingival region, as well as to elucidate the mechanisms by which these phytodrugs act in an animal model periodontitis, comparing them with a well-known antimicrobial drug, doxycycline (positive control) and a gel vehicle (negative control). For that, the model of induced periodontal disease developed by using the technique of ligature placement around the tooth was used due to its easy setup and high reliability during the development of the periodontal disease (Johnson, 1975; Nassar *et al.*, 2003; 2004). This periodontal disease model is characterized by a progressive accumulation of bacterial biofilm in the ligature with consequent increase of the inflammatory infiltrate, which will destroy the periodontal tissue (conjunctive and bony tissue).

The structure and the organization of the periodontal tissue in the molar tooth region in rats, including oral gingival epithelium, oral sulcular epithelium, junctional epithelium, collagen periodontal fibers, cellular and acellular cementum and alveolar bone, are very similar to the human. The biggest difference consists in the fact that the gingival sulcular epithelium of rats is keratinized. Studies have shown that the gingival functional barrier is not different in rats and humans, although the extension of the affected area is larger in the later. Thus, the model used in the present study is able to reproduce the main characteristics found in human periodontitis and as such is appropriated for the study of this disease (BOTELHO, 2007).

Ligature placement around the first upper molar in the animals of the experimental groups provided an initial gingival lesion characterized by a microvascular dilation of the region with an increase on the hydrostatics pressure and fluid permeability, besides leukocyte displacement to the furrow. In this study, the groups that did not receive treatment with *H.*

pectinata gels or doxycycline behaved accordingly, as demonstrated by NT and V groups, which were not statistically different when compared with each other and presented the symptoms of an acute lesion in the periodontal tissues according to HOLZHAUSEN (2002).

The macroscopic results presented here suggest that the ligature placement around of the animal teeth caused significant alterations in the gingival macroscopic characteristics, like redness, bleeding and curved papilla. These findings corroborate with HOLZHAUSEN *et al.* (2002), which affirmed that in the development of the induced inflammatory periodontal disease, biofilm accumulation in the dental surfaces near the gingiva is the direct cause of the inflammation.

One of the possible regulatory pathways for the inflammatory response in the periodontal diseases could be cytokine production by the different sub-populations of auxiliary T lymphocytes (T helper, Th), which would attenuate or increase the inflammatory reaction in the periodontal tissues, and determine the activity or latency of the periodontal diseases (GEMMEL and SEYMOUR, 2006). Cytokines are mediators that act on several cell types to stimulate, inhibit or destroy the periodontal tissues (LINDHE, 1999) as demonstrated by the histopathological analysis of the animals in the groups with EPD (NT, V, GS5%, GS10% and DG), where alveolar bony losses in varied degrees were present, while the normal group (without EPD) did not show any sign of bony loss. These results corroborate with NASSAR *et al.* (2003), NASSAR *et al.* (2004) and BOTELHO *et al.* (2007). It is believed that in normal physiologic situations, bony formation and resorption progression are in equilibrium that is regulated so that bony resorption by osteoclasts precedes new bony formation by osteoblasts (CUETO-MANZANO *et al.*, 1999).

Leaf aqueous extract of the *Hyptis pectinata* L. Poit (CAE) at 10% was used in the present study due to the easy access that the low income population has to this natural product as well as the easiness by which it can be manipulated for topic administration. Doxycycline was chosen not only due to its antimicrobial action, but also due to its anti-collagenolytic effect. Several authors demonstrated that the use of this drug is efficient as supporting agent in the periodontitis treatment because it acts by inhibiting metalloproteinases, consequently, reducing the destruction of the periodontal tissues. However, it is well-known that very high doses of this drug do little against the alterations in the susceptibility of the periodontal microflora, which in turn reduces the occurrence of bacterial resistance (BEZERRA *et al.*, 2000; CATON *et al.*, 2001; GOLUB *et al.*, 2001).

According to TOMASI and WENNSTROM (2004), MACHION *et al.* (2006) and BOTELHO *et al.* (2007), the topic application of the doxycycline gel was previously performed to treat periodontitis. The drug was proved effective by reducing bony resorption, bony turnover and number of microorganisms in the affected sites as well as the osteoclast activity. Thus, doxycycline was used as positive control. Administration of *H. pectinata* at 10% (GS 10%) immediately after the EPD induction significantly prevented the alveolar bony resorption similarly to the doxycycline gel (GD).

Histopathological analysis and CBCT images evidenced tissue alterations and bone resorption in all groups with periodontal disease, although groups treated with GS 5%, GS10% and DG showed mild alterations when compared to NT and V groups, which presented intense cell inflammatory infiltrate after 11 days of EPD induction with total destruction of the alveolar bone, which is in accordance with the results found by BEZERRA *et al.* (2000), LIMA *et al.* (2000) and MENEZES *et al.* (2005). In a study evaluating the periodontal destruction due to the ligature placement when used together with antibiotics for the control of the bacterial film, the inhibition of the alveolar bony loss and the infectious feature of the experimental periodontitis were demonstrated (SALLAY *et al.*, 1982). The findings in the present study suggest that *H. pectinata* gel may be inhibiting bony loss probably by controlling the formation of bacterial film.

Several studies have been done on the use of medicinal plants associated to the conventional periodontal treatment so that the anti-inflammatory effect can be observed as well as the reduction in the counting of the microorganisms responsible for tissue destruction of the dental element (Bakri *et al.*, 2005; Feres *et al.*, 2005; Lee & Chung, 2004). In this context, a previous study involving *H. pectinata* showed the plant aqueous extract has monoterpenes, sesquiterpenes, sesquiterpenic lactones and tripterpenes with important pharmacological activities. The hemostatic effect of the plant fresh leaves as well as the antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus sp* were demonstrated (BASÍLIO *et al.*, 2006). According to JUIZ *et al.* (2010), plants with activity against periodontopathogens would be more effective if they also inhibited *S. mutans* growth because this organism facilitates the bacterial biofilm installation. NASCIMENTO (2005) evaluated the *in vitro* antimicrobial potential of *H. pectinata* essential oil and found that its antimicrobial activity against *S. mutans* was equivalent to chlorhexidine. Moreover, the antinociceptive and antiedematogenic

effects of the *H. pectinata* aqueous extract at 5 mg/kg with low extract toxicity was also shown (BISPO *et al.*, 2001).

Thus, considering the results of studies on the antimicrobial and anti-inflammatory properties of *H. pectinata*, the findings here presented showed that *H. pectinata* CAE gels developed in the Laboratory of Pharmacotechnique of the Federal University of Sergipe decrease the initial inflammatory response, which reflect in the posterior consequences of the periodontal disease such as the bony resorption. This accentuated reduction of the neutrophil inflammatory infiltrate induced by the treatment with GS5%, GS10% and GD in topical form could better explain the preservation of the collagen fibers in the periodontal ligament, as well as the minor resorption of the alveolar bone.

A significant loss of body weight was observed for the animals in the NT and V groups, which was probably caused by the surgery trauma and acute inflammatory process that followed it, complicating animal chewing and feeding. However, treatment with *H. pectinata* and doxycycline reduced or prevented the inflammatory process, which in turn reduced the time its effect lasted in the animals, which were able to chew and eat fairly normally when compared with the NT and V groups. Animals treated with GS5%, GS10% and GD progressively gained body weight from the 6th day after EPD induction. These findings are in accordance with the study of LIMA *et al.* (2000), where the animal lost around 10% of their weight in the first day after EPD induction, but returned to their initial weight upon treatment. According to BOTELHO *et al.* (2007), the gel topic application have benefits by decreasing both the pain and the bacterial account as well as promoting oral conditions for a better feeding of the rats treated with gels based in natural products (BOTELHO, 2007).

Conclusions

This study demonstrates that the local application of a dental gel based on *H. pectinata* (L.) Poit at 10% has anti-inflammatory effect and also prevents alveolar bone resorption and weight loss in animals with experimental periodontitis. The study revealed the great potential of the gel to combat periodontal diseases, although further studies are needed to clarify its usefulness in clinical situations.

References

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.

ASASE, A.; OTENG-YEBOAH, A.A.; ODAMTTEN, G.T.; SIMMONDS, M.S.J. Ethnobotanical study of some Ghanaian antimalarial plants. Journal of Ethnopharmacology. V.99, p.273-279, 2005.

BAKRI, I.M., DOUGLAS, C.W.I. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. Arch Oral Biol 50: 645-651, 2005.

BASÍLIO, I. J. L. D.; Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) acta farmacéutica bonaerense - vol. 25 n° 4 - año 2006

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.

BISPO, M.D.; MOURÃO, R.H.; FRANZOTTI, E.M.; BOMFIM, K.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; MORENO, M.P.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. Jornal of Ethnopharmacology, v.76, p.81-86, 2001.

BOTELHO, M. A. *et al.* Lippia sidoides and Myracrodruon urundeuva gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. J. Ethnopharmacol., 2007.

BOTELHO, M.A., PAIXÃO, M.S., ALLEGRETTI, C., ARGENTINO JR, J, ARAÚJO, R., RODRIGUES, K., MARTINS, E., MARINHO, G, QUEIROZ, D., RUELA, R., CORREIA, J.M., QUINTANS JR, L.J. Anti-Inflammatory Effect of Diclofenac Diethylammonium Gel on Acute Phase of Ligature Induced Periodontitis in Rats. Lat. Am. J. Pharm. 29 (8): 1371-6 2010.

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.

CHAMBRONE, L. A.; CHAMBRONE, L. Tooth loss in well-maintained patients with chronic periodontitis during longterm supportive therapy in Brazil. J Clin Periodontol, v. 33, p. 759 – 764, 2006.

CHUNG, J. Y. *et al.* Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. Phytomedicine, v. 4, n. 13, p. 261-266, 2006.

CUETO-MANZANO AM, KONEL S, HUTCHISON AJ, CROWLEY V, FRANCE MW, FREEMONT AJ, *et al.* Bone loss in long-term renal transplantation; histopathology and densitometry analysis. Kidney Int. 1999;55:2021-9.

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.

FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S. Revisão etnofarmacológica, química e farmacológica do gênero *Hyptis*. *Revista Brasileira de Farmácia*. V.84, n.3, p.69-74, 2003.

FERES, M; FIGUEIREDO, L.C.; BARRETO, I.M.; COELHO, M.H.; ARAÚJO, M.W.; CORTELLI, S.C. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and própolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. *J Int Acad Periodontol* 7: 90-96, 2005.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta médica*, 71:278-280 (2005).

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

GEMMEL E, SEYMOUR GJ. Regulação immune dos perfis de citocinas Th1/ Th2 na doença periodontal. *Periodontol* 2000. 2006;10:21-41.

GOLUB, L.M. *et al.* 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.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de alcingivaas árvores nativas. *Arquivos do instituto Biológico*. V.72, p.353-358, 2005.

HOLZHAUSEN, M. Efeito do celecoxib sobre o desenvolvimento de doença periodontal induzida em ratos. 2002. 123 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

JOHNSON, J.H. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J. Periodontal Res.*, Copenhagen, v. 10, n. 6, p. 236-244, Dec. 1975.

JUIZ, P. J. L.; ALVES, R. J. C.; BARROS, T. F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. *Braz. J. Pharmacogn*, v. 20, p. 134-139, 2010.

LEE, J. H.; CHUNG, M.S. In vitro anti-adhesive activity of an acidic polysaccharide from *Panax ginseng* on *Porphyromonas gingivalis* binding to erythrocytes. *Planta Med* 70: 566-568, 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. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 720 p.

LIRA, A.F. Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do extrato aquoso e óleo essencial da *Hyptis pectinata* (L.) Poit (Sambacaitá), em modelo murinho de artrite induzida por cristais de urato de sódio. (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Sergipe, 2006.

MACHION, L. *et al.* 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.

MENEZES A. M. *et al.* Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J. Periodontol.*, v. 76, n. 11, p. 1901-1909, 2005.

NASSAR CA, NASSAR PO, SPOLIDORIO DMP, SPOLIDORIO LC. Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. *Ver Odontol UNESP*. 2003;32:125-30.

NASSAR CA, NASSAR PO, ABI RACHED RS, HOLZHAUSEN M, MARCANTONIO E JR, SPOLIDORIO LC. Effect of cyclosporin A on alveolar bone homeostasis in rat periodontitis model. *J Periodontal Res*. 2004;39:143-8.

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.

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.

SALLAY K, SANAVI F, RING I, PHAM P, BEHLING UH, NOWOTNY A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res*. 1982;17:263-74.

SIMÕES, C. M. O. (Org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. Rio Grande do Sul: Editora da UFRGS e UFSC, 2000. 821p.

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 Microbiology Immunology*, v. 19, p. 61-64, 2004.

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

TINOCO, E. M. B.; TINOCO, N. M. B. Diagnóstico e Prevenção das Doenças Periodontais. In: BUISCHI, Y. P. Promoção de Saúde Bucal na Clínica Odontológica. São Paulo: Artes Médicas, p. 99-123, 2000.

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.

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.

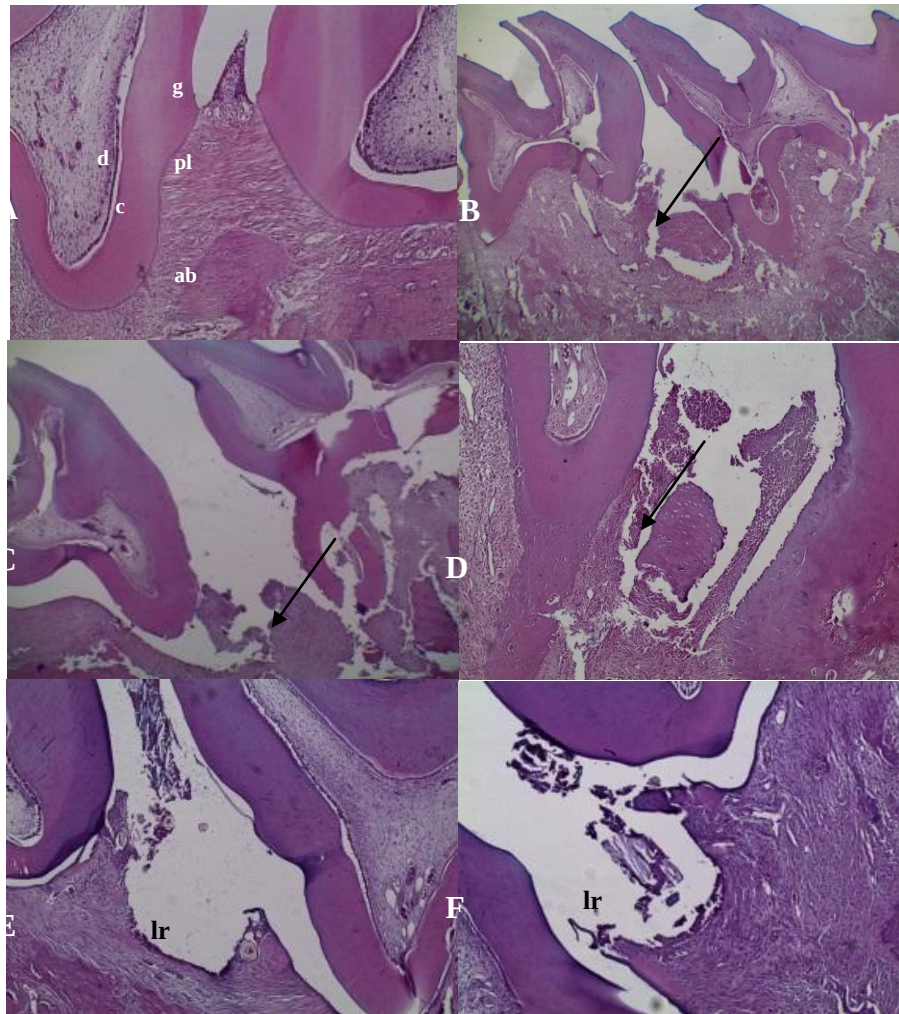


Figure 1. Histopatological images of the naive (A), non treated EPD (B), vehicle EPD (C), 5% *H. pectinata* (D), 10% *H. pectinata* (E) and 10% Doxycycline gel - DG (F) groups. Mesial region of the left second upper molar after 11 days of EPD induction. (A): inteproximal region shows a normal periodontal ligament (pl), alveolar bone (ab), dentin (d), cementum (c) and gingiva (g) with health sulcular and junctional epithelia in normal conformation (HE 100x). (B) and (C): intense insertion loss and bony resorption (arrow) in the interproximal and furcation regions (HE 40x). (D): loss of insertion and bony resorption in the interproximal region with formation of bone sequestration (arrow) involved with inflammatory infiltrate (HE 40x). (E) and (F): flat gingival papilla with apical migration of the junctional epithelium and discreet resorption of insertion periodontite to the ligature region (lr) (HE 100x).

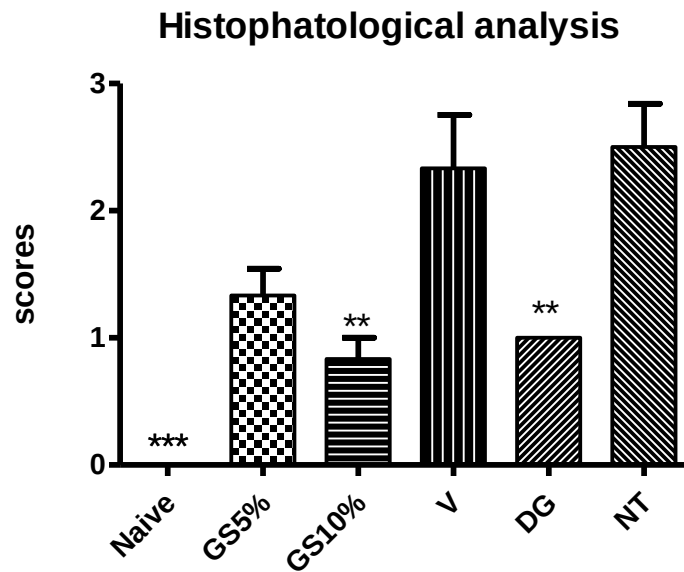


Figure 2. Effect of the treatment with 5% *H. pectinata* gel (GS5%), 10% *H. pectinata* gel (GS10%), 10% doxycycline (DG) and vehicle gel (V) on the EPD. Significant differences between means were found in comparison with the V group by ANOVA followed by the Bonferroni's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

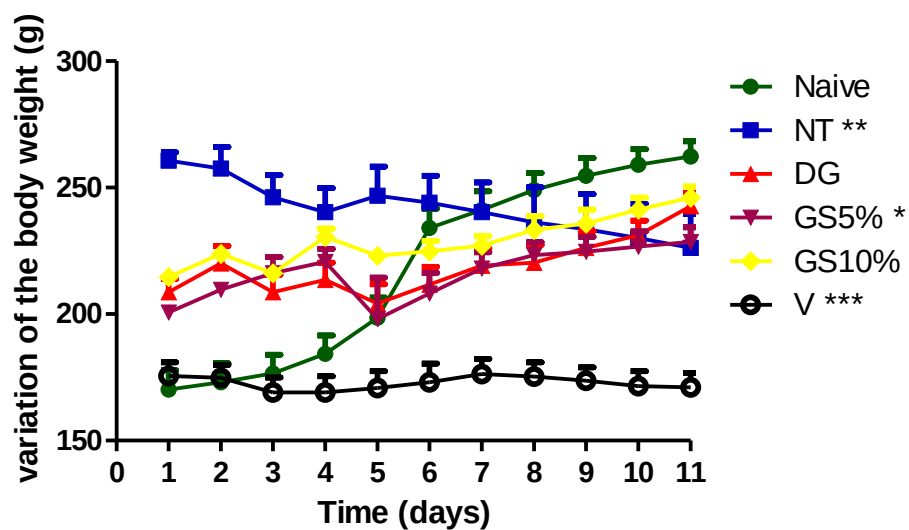


Figure 3. Effect of the 10% doxycycline (DG), 5% *H. pectinata* (GS5%), 10% *H. pectinata* (GS10%) and vehicle gel (V) in the variation of the body weight of rats submitted to EPD after 11 days of its induction. Data values are expressed as mean $\pm$ SEM (n=6) and were measured each Day before and after the EPD induction during 11 days. Significant differences between means were found in comparison with the naive group by ANOVA followed by the Dunnett's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

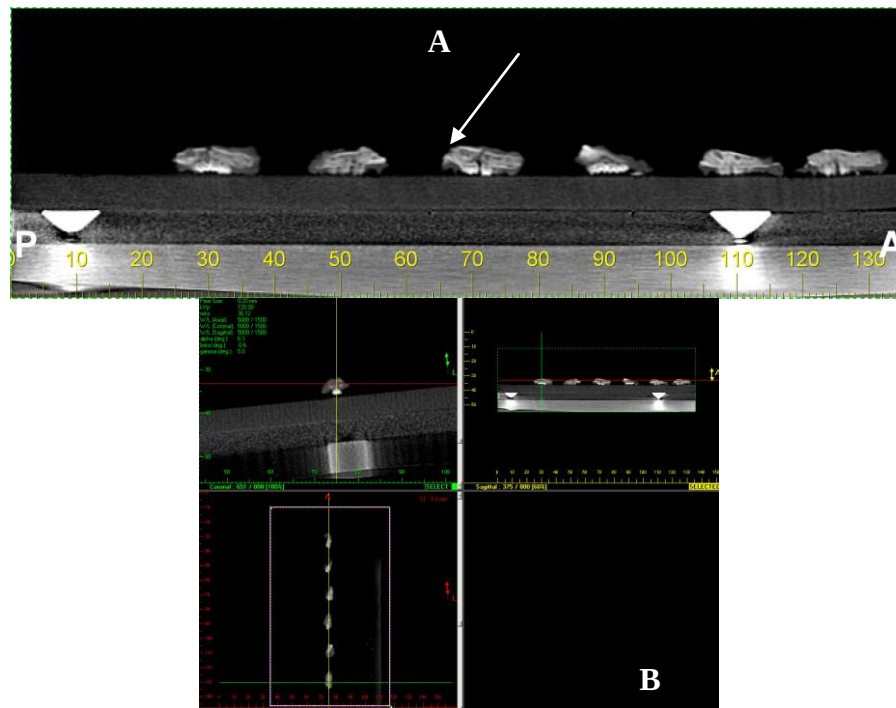


Figure 4. Cone-beam computed tomography images analyzed through three cuts: axial, sagittal and coronal. (A) Sagittal view evidencing the tomography of the six pieces of the NT group. The presence of bone resorption in the ligature region can be seen (arrow). (B) MPR screen of the classical i-Cat scanner (Imaging Sciences International). An exposition area of 6 cm and exposition time of 40 sec with voxel of 0.2 mm (maximum resolution) was used. Images for the NT group.

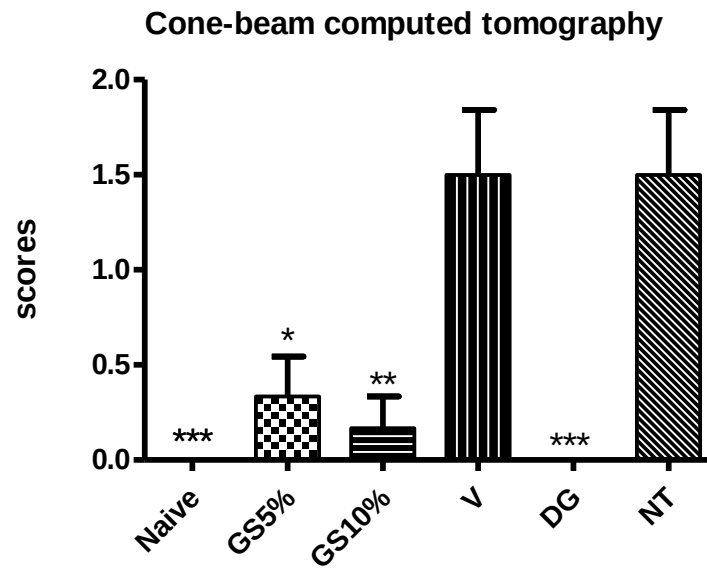


Figure 5. Effect of the 5% *H. pectinata*, 10% *H. pectinata*, 10% doxycycline and vehicle gels in the bony resorption caused by the EPD. Significant differences between means were found in comparison with the V group by ANOVA followed by the Bonferroni's test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Capítulo III

Artigo científico:

Phytochemistry and antibacterial activity of *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae) aqueous extract

Phytochemistry and antibacterial activity of *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae)
aqueous extract

Mônica S. Paixão^{*1}, Isamar D. Oliveira², Fabrício T. da Cunha³, Amanda do C. B. de
Lima⁴, Ximene A. Fernandes⁴, Nicole P. Damascena⁴, Antônio S. Dias⁴, Brancilene S.
de Araujo⁴, Charles S. Estevam⁴, Marco A. Botelho⁵, Lucindo J. Quintans-Júnior²

¹Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal
Rondon s/n, 49100-000 São Cristóvão-SE Brasil

²Laboratório de Farmacologia Pré-clínica de Produtos Naturais, Departamento
de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n,
49100-000 São Cristóvão-SE Brasil

³Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Fisiologia, Universidade
Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, 49100-000 São Cristóvão-SE, Brasil

⁴Laboratório de Bioquímica e Química de Produtos Naturais, Departamento de
Fisiologia,
Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon s/n, 49100-000 São
Cristóvão-SE,
Brasil

⁵Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Br 020/Km 303,
62700000 Canindé-CE, Brasil

*Corresponding author:

Monica S. Paixão, Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Sergipe, Av.

Marechal Rondon s/n, Rosa Elze, 49100-000 São Cristóvão-SE Brasil. Tel.: +55 79

32140604, Fax: +55 79 99929199, paixao.monicasilveira@gmail.com

For Peer Review Only

Abstract

Hyptis pectinata L. Poit (Lamiaceae), known as “sambacaitá”, is used by the population in the northeast of Brazil to treat respiratory and digestive diseases, fever, inflammations, and microbial infections. The present study evaluated the phytochemistry of the crude aqueous extract (CAE) of *H. pectinata* leaves by colorimetric methods and high-performance liquid chromatography (HPLC), which detected the presence of phenols, tannins (condensed and catechinic), saponins, alkaloids and free pentacyclic triterpenes. The antibacterial activity of *H. pectinata* leaf CAE was tested against strains of *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* by the agar-well diffusion technique. The growth of all bacterial strains tested was inhibited by the extract, with inhibition zone diameter varying from 15 to 36 mm and minimum inhibitory concentration values ranging from 12.5 to 1000 µg/mL. The results showed that the aqueous extract of *H. pectinata* leaves has a strong antibacterial activity against Gram-positive bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC#25923) and *Streptococcus mutans* (ATCC#27923).

Keywords: *Hyptis pectinata*; Lamiaceae; natural products; phytochemical screening; antibacterial activity

Introduction

After the discovery of penicillin by Flemming in 1929 and sulfonamide-based chemotherapies by Domagk in 1935, numerous compounds with antibacterial and antifungal activities have been obtained by biosynthesis or organic synthesis (Gonçalves et al. 2005). Due to microbial infections, an increasing number of studies have been developed to obtain compounds at a low cost and that are safe and efficacious for humans (Botelho et al. 2009). The antimicrobial activity against resistant strains is the main interest for pharmaceutical industries and health management. In this context, plants can fill these requisites because they have a high diversity of molecules, which are produced by the secondary metabolism and can be considered as promising antimicrobial agents against those resistant strains (Leitão et al. 2006; Silva et al. 2007; Coutinho et al. 2008; Silva et al. 2008). Considering this potential, the natural plant product market is growing at a rate of 15% per year, while the synthetic pharmaceutical market annual growth is around 3-4%. Thus, phytotherapies is an effective therapeutic option and culturally appropriate for treating microbial illnesses (Mahady 2005).

The *Hyptis* genus is comprised of 300 species with a wide distribution, occurring in Tropical Semi-Arid climates of America and Africa (Stevens 2001), mainly found in the Fiji islands, West African, India (Pietschmann et al. 1998), and the Brazilian Northeast (Bispo et al. 2001; Franco et al. 2011). *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae), popularly known in Brazil as “sambacaitá” or “canudinho”, is an herbaceous herb with opposite, crossed, and aromatic leaves. Its flowers are small, grouped into: inflorescences, hermaphrodites, pentamers, zygomorphics, and bilabiates (Arrigoni-Blank et al. 2005). The plant is cultivated in gardens and is popularly used by the population as a tea, either obtained by decoction or infusion, and as a mouth rinse (Carvalho 1999). It is known for being a natural antiphlogistic and is used to treat respiratory diseases such as rhinopharyngitis and nasal congestion, skin and gastric diseases, fever, and fungal and bacterial infections (Nascimento et al. 2008).

H. pectinata leaf aqueous extract was previously evaluated for its antinociceptive properties by the abdominal writhings, hot plate and formalin tests, which showed that the extract applied orally had a significant effect on mice by reducing abdominal writhings caused by acetic acid up to 54% at 400 mg/kg with a latency time increase up to 47% (Bispo et al. 2001). In addition, studies have shown that the aqueous extract is able to reduce paw edema induced by carrageenan up to 67% (Bispo et al. 2001; Arrigoni-Blank et al. 2005) and edema induced by arachidonic acid by 32.8% (Bispo et al. 2001). The extract was also effective in the liver regeneration of hepatectomized rats (Melo et al. 2001) and showed antidepressant activity (Bueno et al. 2006). Despite the wide commercialization of this plant in markets in the state of Sergipe, Brazil, and its medicinal use by the population to treat microbial infections, there are few laboratory studies on the antimicrobial potential of the species, mainly concerning its crude aqueous extract. Therefore, the present study is a contribution to the ethnopharmacological knowledge of *H. pectinata* by demonstrating the phytochemical constituents of the plant leaf aqueous extract as well as its *in vitro* antibacterial activity.

Results and discussion

The Lamiaceae family is relatively well studied from the chemical point of view. Plants of this family present a great variety of metabolites, which can be derivative of the mevalonate and shikimate pathways as well as mixed biosynthesis (Menezes 1994; Franco et al. 2011). Although there are several studies on the chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of the *Hyptis* species (Nascimento et al. 2008; Botrel et al. 2009; Bhuiyan et al. 2010; Moreira et al. 2010), little is known about the composition of polar extracts of the plant parts, mainly the leaf aqueous extract, which is used by the population to treat illnesses. In the present study, the phytochemical evaluation of CAE by colorimetric methods and HPLC showed the presence of phenols, tannins (condensed and catechinic),

saponins, alkaloids and free pentacyclic triterpenes. Alkaloids were previously found in the leaf aqueous extract of *H. suaveolens* (Edeoga et al. 2006).

HPLC chromatograms of the aqueous extract of *H. pectinata* showed different peak profiles, which further corroborate with the presence of these classes of secondary metabolites. At 225 nm, two peaks were observed separately, at 5 and 25 min of run time, while a set of seven peaks were found between 45 and 70 min (Figure 1A). This cluster of peaks after 40 min may be associated with free pentacyclic triterpenes, which are chemically classified as hydrocarbons and as such have absorptions around 225 nm of the UV-C region [200-280 nm] (Silverstein and Webster 1997). Saponins, which have a lipophilic aglycone such as the triterpenes, are attached to glycoside moieties, lack a strong chromophore group, and usually absorb at lower UV wavelengths ranging from 200 to 210 nm (Kite et al. 2007). Therefore, these compounds have an apolar nature and will likely be retained in the C₁₈ column when the mobile phase is polar, as the methanol/water used in the present study. The reduction of absorbance in the region with the increase in wavelength also corroborates with these suggestions (Figure 1B). The absorbance of the peak at 25 min increased with the wavelength increase (Figure 1B and 1C) between 25 and 40 min. In addition, a new set of peaks was found in the chromatogram at 330 nm. The peak with retention time of 25 min may be associated with phenolic compounds, such as the catechins, which are known for their absorption around 280 nm in the UV-C region of the UV/Vis spectrum, as well as in the UV-A and UV-B regions, due to the resonance associated with the fused aromatic rings, which is an important chromophore group (Silverstein and Webster 1997; Lee and Ong 2000; Saito et al. 2006). Alkaloids, basic compounds absorbing between 210 and 330 nm, may be associated with the small peaks observed at 225, 284 and 330 nm around 5 min due to their polar nature, which enables them to run with the mobile phase and leave the column early.

In the last few years, there is an increasing interest in testing plant extracts for their antimicrobial properties, mainly because the number of microorganisms resistant to the drugs

in use is steadily rising (Jones et al. 2008). It is believed that the complex nature of a plant extract can minimize the adaptability of microorganisms and their consequent resistance (Coutinho et al. 2008). In the present study, the antibacterial activity of the leaf CAE was determined by the inhibitory zone and MIC values, and the results are shown in Table 1. *H. pectinata* leaf CAE was tested against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains by the agar-well diffusion technique. The growth of all bacterial strains tested was best inhibited by the extract at 200 mg/mL since the inhibition zone diameters were over 10 mm and varied 140% (from 15 to 36 mm). Gram-positive *S. aureus* and *S. mutans* strains were more susceptible to the CAE and showed the highest inhibition zones, 36 and 33 mm, which in the case of *S. aureus* was 80% higher than chloramphenicol. For the Gram-negative strains, CAE was able to inhibit the growth of *P. aeruginosa* at the same level as polymyxin, the standard antibiotic used as control for this bacterium. In general, CAE was not as effective in preventing the growth of Gram-negative bacteria because the inhibition zone diameters were not of the same magnitude. The results of the present study differ significantly from the ones observed for *H. suaveolens* leaf aqueous extract, which showed an inhibition zone for *S. aureus* 67% (12 mm) smaller than *H. pectinata* and did not inhibit the growth of *E. coli* (Satish et al. 2010). When other polar extracts are considered, *H. martisuii* showed similar results to the present study for its crude ethanol extract against *E. coli* and *P. aeruginosa*, with inhibition zones ranging between 10-20 mm, although it was not as effective against the *S. aureus* strains as *H. pectinata* CAE (Coutinho et al. 2008).

MIC values ranged from 12.5 to 1000 µg/mL. Gram-positive *S. aureus* and *S. mutans* strains also showed the lowest values of MIC, which characterizes the lowest concentration for the extract to inhibit the visible growth of these bacteria. As it can be seen in Table 1, the MIC for *S. aureus* was at the same level as for the antibiotic chloramphenicol. CAE showed a moderate MIC by inhibiting the visible growth of *E. coli* and *K. pneumoniae* strains, whose values were between 100 and 500 µg/mL. The MIC value was too high for *C. freundii* and *P.*

1 aeruginosa, which indicates CAE is not good for treating infections caused by these two
2 Gram-negative bacteria when compared with the other tested bacteria. MIC classification for
3
4 *E. coli* and *P. aeruginosa* was in accordance with that observed for the ethanol extract of *H.*
5
6 *martisuii* leaves (Coutinho et al. 2008), while MIC values for *S. aureus* in that study were
7
8 higher than observed for *H. pectinata* CAE.
9
10
11
12

13
14 The higher sensitivity to the *H. pectinata* leaf CAE showed by *S. aureus* in this study is
15
16 important because some strains of this bacteria are usually refractory to therapy by
17
18 antimicrobial agents due to their increasing resistance to microbial compounds (Mahady
19
20 2005; Jones et al. 2008; Klein and Goulart 2008). Regarding the difference found in the
21
22 sensitivity of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, it might be associated with the
23
24 cell wall composition. Gram-negative bacteria have higher lipid content in their cell wall, and it
25
26 is well known that hydrophilic substances often cross the outer membrane by water-
27
28 filled channels of porins because they cannot diffuse through the lipid bilayer. However,
29
30 porin channels are too small to allow the penetration of large polar compounds, such as
31
32 tetracyclines, which can reduce the antibiotic efficiency against microorganisms. The aqueous
33
34 extract of *H. pectinata* leaves was shown to have a higher phenolic content (155.02 ± 11.33 mg
35
36 EGA/g CAE) and is comprised mostly of large polar compounds, such as phenols and tannins,
37
38 that cannot cross the cell wall, and thus were less effective against the Gram-negative strains
39
40 (Godoy 2008). Moreover, other mechanisms may be contributing to the resistance of
41
42 Gram-negative bacteria. It is well known that these bacteria own the periplasmic space where
43
44 enzymes that inactivate antibiotics (nucleases, β -lactamases, proteases, etc) can be found
45
46 (Schmitt et al. 2003; Klein and Goulart 2008). In addition, it has been shown that efflux
47
48 bombs can withdraw xenobiotics from the cytoplasm, which prevents antimicrobial agent
49
50 accumulation and impedes these xenobiotics from reaching the necessary concentration to be
51
52 lethal to the bacteria (Clarke et al. 2001; Klein and Goulart 2008).
53
54
55
56
57
58
59
60

In conclusion, the results of the present study contribute to the ethnopharmacological knowledge of *H. pectinata* by demonstrating the antimicrobial potential of the leaf crude aqueous extract of this plant, which was shown to have a strong antibacterial activity against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC#25923) and *Streptococcus mutans* (ATCC#27923).

Experimental

Plant material

H. pectinata leaves were collected during the florescence period in the metropolitan area of Aracaju, Sergipe, Brazil (255 m, 10° 55' 56.1" South, 37° 06' 34.7" West). The plant material was identified, and a voucher specimen was deposited in the Department of Biology herbarium, Federal University of Sergipe, under the number 19005.

Aqueous extract preparation

Leaves were dried in an oven at 37 °C with air renewal and circulation for 48 h until complete dehydration. Then, they were triturated to give a fine powder (2 kg), which was extracted with distilled water (3:10 w/v) under constant agitation for 4 h at 35 °C. After filtration, the supernatant was lyophilized to give the dry crude aqueous extract (CAE, 32 g). CAE was distributed in seven pots and kept in a desiccator in the Laboratory of Natural Products Pre-Clinical Pharmacology at the Federal University of Sergipe to be used in the subsequent experiments, when they were redissolved in water to give specific concentrations.

Phytochemical screening

The following classes of secondary metabolites were screened by colorimetric methods (Wagner and Bladt 1995; Matos 1997): alkaloids, anthocyanidins, anthocyanins, aurones, catechins, chalcone, cyanogenic heterosides, fixed acids, flavonoids, flavonols, leucoanthocyanidins, phenols, quinones, resins, saponins, steroids, tannins, and xantones.

Total phenol quantification

The total phenolic content was determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu method (Sousa et al. 2007). Briefly, the reaction mixture was composed of the extract (0.1 mL), distilled water (7.9 mL), Folin-Ciocalteu reagent (0.5 mL), and 20% sodium carbonate (1.5 mL). The absorbance of the reaction solution was measured at 750 nm after 2 h, interpolated against a gallic acid (GA) calibration curve, and expressed as milligram equivalents of gallic acid (EGA) per g of extract. All analyses were carried out in triplicate.

Chromatographic analysis

The separation profile of the aqueous extract of *H. pectinata* was obtained using high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Vis in a Shimadzu Prominence chromatographic system (Shimadzu, Kyoto, Japan) consisting of two LC-6AD pumps, a DGU 20 A5 degasser, a SPD M20A PDA detector, a SIL 10 AF10 auto-sampler, and a Shim-PACK PREP-ODS C₁₈ column (250 x 4.6 mm i.d.; 5 µm particle size). The system was connected to a computer running the Shimadzu LC solution through a CBM 20A interface to collect chromatographic data. Separation was achieved on the column at room temperature using a mobile phase consisting of methanol and water under gradient elution (0-60 min, 5-100% methanol; 60-70 min, 100% methanol) at a flow rate of 1 mL/min. The extract diluted in

HPLC grade methanol (0.5 mg/mL) was filtered through 0.22 μ m Millipore nylon membrane and aliquots (20 μ L) were injected in the chromatographic system.

Microorganisms

Bacterial strains of *Citrobacter freundii* (ATCC#25929), *Escherichia coli* (ATCC#25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC#25935), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC#25935), *Staphylococcus aureus* (ATCC#25923), and *Streptococcus mutans* (ATCC#27923) were used in the present study. They were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC).

Microorganisms were grown in Mueller-Hinton medium supplemented with agar (38 g/L) in a bacteriological oven at 35 ± 2 °C for 24 h. The medium was prepared according to the manufacturer instructions, sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min, and dispersed in Petri dishes (150 x 10 mm, 25 mL). The same medium was prepared and afterwards dispersed in test tubes (200 x 20 mm, 12.5 mL, P1) and maintained at 40 °C to avoid solidification until use in the agar-well diffusion experiment. Liquid Mueller-Hinton broth media was also prepared in accordance with the manufacturer directions and sterilized as above to be distributed in test tubes (100 x 10 mm, 2.5 mL) to cultivate the microorganisms.

Agar-well diffusion antimicrobial assay

The tests to verify the sensibility of the microorganisms to the *H. pectinata* leaf CAE were based on protocols of the Clinical and Laboratory Standard Institute (Groove and Randall 1955; NCCLS 2003). Antimicrobial assays were carried out by the agar-well diffusion method in aseptic conditions. Microorganism strain suspensions were prepared by diluting the liquid Mueller-Hinton media with saline to give 0.5 on the MacFarland scale and

at 5×10^{-4} CFU/mL. The fresh bacterial suspensions (2.5 mL) were added to the P1 tubes, and the mixture was spread in Petri dishes containing Muellen-Hinton nutrient agar, which were then maintained at room temperature for 2 h to solidify and allow the diffusion of the microorganisms. Sterilized filter paper was used between the bottom and cover of the Petri dishes to avoid water condensation. Wells (6 mm diameter) were punched off into the agar media with a sterile cork borer and filled with CAE (50, 100, and 200 mg/mL, 10 μ L), and the antibiotics chloramphenicol and polymyxin were used as control (0.02 mg/mL each, 10 μ L), separately, using a micropipette. Afterwards, the Petri dishes were incubated at 35 ± 2 °C for 24 h, and the inhibition zone was measured. Diameters greater or equal to 10 mm were considered a good indication of antibacterial activity.

Microplate antimicrobial assay

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microplate method. In a 96 well microplate, each well received the microorganism suspensions (10 μ L) prepared by diluting the liquid Muellen-Hinton media with saline to give 0.5 on the MacFarland scale and at 5×10^{-4} CFU/mL, liquid Muellen-Hinton media (90 μ L), and CAE (0.078 to 300,000 μ g/mL, 10 μ L). Negative controls (microorganism suspension, liquid Mueller-Hinton medium, and water) and positive controls (microorganism suspension, liquid Mueller-Hinton, and chloramphenicol or polymyxin as antibiotics) were used. After inoculation, the microplates were incubated at $35 - 2$ °C, and the growth was determined after 24, 48, and 72 h. MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial to inhibit the visible growth of the microorganism after overnight incubation. The criterion used to classify the extract activity was: MIC smaller than 100 μ g/mL is considered to be a good antimicrobial activity, MIC from 100 to 500 μ g/mL is considered to be a moderate antimicrobial activity,

and MIC greater than 1000 µg/mL is considered inactive, as proposed by Holetz et al. (2002) and Pretto et al. (2004).

Acknowledgments

The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) for financial support of this research.

References

- Arrigoni-Blank MF, Silva-Mann R, Campos DA, Silva PA, Antonioli AR, Caetano LC, Sant'Ana AEG, Blank AF (2005) Morphological, agronomical and pharmacological characterization of *Hyptis pectinata* (L.) Poit germplasm. *Rev Bras Farmacogn* 15:298-303.
- Bhuiyan MNI, Begum J, Nandi NC (2010) Chemical component studies on the leaf and inflorescence essential oil of *Hyptis brevipes* (Poit.). *J Med Plants Res* 4:2128-2131.
- Bispo MD, Mourão, RHV, Franzotti EM, Bomfim KBR, Arrigoni-Blank MF, Moreno MPN, Marchioro M, Antonioli AR (2001) Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 76:81-6.
- Botelho MA, dos Santos RA, Martins JG, Carvalho CO, Paz MC, Azenha C, Ruela RS, Queiroz DB, Ruela WS, Marinho G, Ruela FI (2009) Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. *Phytother Res* 23:1214-1219.

- Botrel PP, Pinto JEBP, Figueiredo FC, Bertolucci SKV, Ferri PH (2009) Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubiodes* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. *Rev Bras Pl Med* 11:164-169.
- Bueno AX, Moreira ATS, Silva FT, Estevam CS, Marchioro M (2006) Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. *Rev Bras Farmacogn* 16:317-323.
- Carvalho IBM (1999) O uso popular de plantas medicinais da caatinga do povoado de Curitiba: município do Canindé do São Francisco, Sergipe. Dissertation, Federal University of Sergipe.
- Clarke JM, Gillings MR, Altavilla N, Beale AJ (2001) Testing natural products for antimicrobial activity - potencial problems with fluorescein diacetate assays of cell viability. *J Microbiol Methods* 46:261-267.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Júnior JP, Lima EO (2008) In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Rev Bras Farmacogn* 18:670-675.
- Edeoga HO, Omosun G, Ucle LC (2006) Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria. *African J Biotechnol* 5:892-895.
- Franco CRP, Antonioli AR, Guimarães AG, Andrade DM, Jesus HCR, Alves PB, Bannet LE, Patrus AH, Azevedo EG, Queiroz DB, Quintans-Júnior LJ, Botelho MA (2011) Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*. *Phytother Res*. doi: 10.1002/ptr.3455.
- Godoy MFP, Daniel JFS, Rodrigues-Filho E, Pascholati SF (2008) Atividade antimicrobiana in vitro de extratos de *Cyperus sublineo*. *Summa Phthopathol* 34:171-179.
- Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H (2005) Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol* 72:353-358.

- Groove DC, Randal W (1955) Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. Medical Enciclopedia, New York.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswald Cruz 97:1027-1031.
- Jones KR, Cha JH, Nerrek DS (2008) Who's winning the war? Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Cur Drug Ther 3:190-203.
- Kite GC, Porter EA, Simmonds MS (2007) Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 1148:177-83.
- Klein G, Goulart LS (2008). Multiresistant *Staphylococcus aureus* biological materials prevalence from Osvaldo Cruz Laboratory, Uruguaiana-RS. Rev Bras Farm 89:121-124.
- Lee B-L, Ong C-N (2000) Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. J Chromatogr A 881:439-447
- Leitão SG, Castro O, Fonseca EM, Julião LS, Tavares ES, Leo RRT, Vieira RC, Oliveira DR, Leitão GG, Martino V, Sulsen V, Barbosa YAG, Pinheiro DPG, Silva PEA, Teixeira DF, Lourenço MCS (2006) Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. Rev Bras Farmacogn 16:6-11.
- Mahady GB (2005) Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. Curr Pharm Des 11:2405-2427.
- Matos FJ (1997) Introdução a fitoquímica experimental. UFC, Ceará.
- Melo GB, Silva RL, Antoniolli AR, Melo VA, Lima SO, Silva PM, Silva Jr OC (2002) Efeitos do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial de 70%: resultados preliminares. Acta Cir Bras 16:13-15.

- Menezes FS (1994) Base química de tendências filogenéticas em Lamiiflorae. Dissertation, Federal University of Rio de Janeiro.
- NCCLS (2003) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically - NCCLS document M7-A6. NCCLS, Wayne
- Moreira ACP, Lima EO, Wanderley PA, Carmo ES, Souza EL (2010) Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. *Braz J Microbiol* 41:28-33.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC (2008) Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. *Braz J Microbiol* 31:247-256.
- Pietschmann M, Vostrowsky O, Bestmann HS, Pant AK, Mthela CS (1998) Volatile constituents of *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae). *J Essential Oil Res* 10:550-52.
- Pretto JB, Cechinel-Filho V, Noldin FV, Sartori KMR, Buffon D, Cruz AB (2004) Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). *J Biosci* 59:657-662.
- Saito ST, Welzel A, Suyenaga ES, Bueno F (2006) A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. *Ciênc Tecnol Aliment* 26:394-400.
- Satish V, Ravichandrian VD, Gavani U, Paarakh PM (2010) Antimicrobial studies on the extracts of *Coculus hirsutus* Linn and *Hyptis suaveolens* Poit. *Indian J Nat Prod Res* 1:49-52.
- Schmitt AC, Almeida ABPF, Silveira TA, Iwakura CT, Mendes KF, Silva MC (2003) Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz ("Folha-da-fortuna") colhida em Várzea Grande, Mato Grosso/Brasil. *Acta Sci Veter* 31:55-58.

- Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira-Junior JP, Pereira JV, Pereira MSV (2007) Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn* 17:572-577.
- Silva MAR, Higino JS, Pereira JV, Siqueira-Júnior JP, Pereira MSV (2008) Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Farmacogn* 18:209-212.
- Silverstein RM, Webster FX (1997). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley & Sons, New York.
- Sousa CMM, Silva HR, Viera-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH (2007) Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova* 30:351-355.
- Stevens PF (2001). *Angiosperm Phylogeny Website*.
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/>. Accessed 31 October 2010.
- Wagner H, Bladt S (1995) *Plant drug analysis - a thin layer chromatography atlas*. Springer, Berlin.

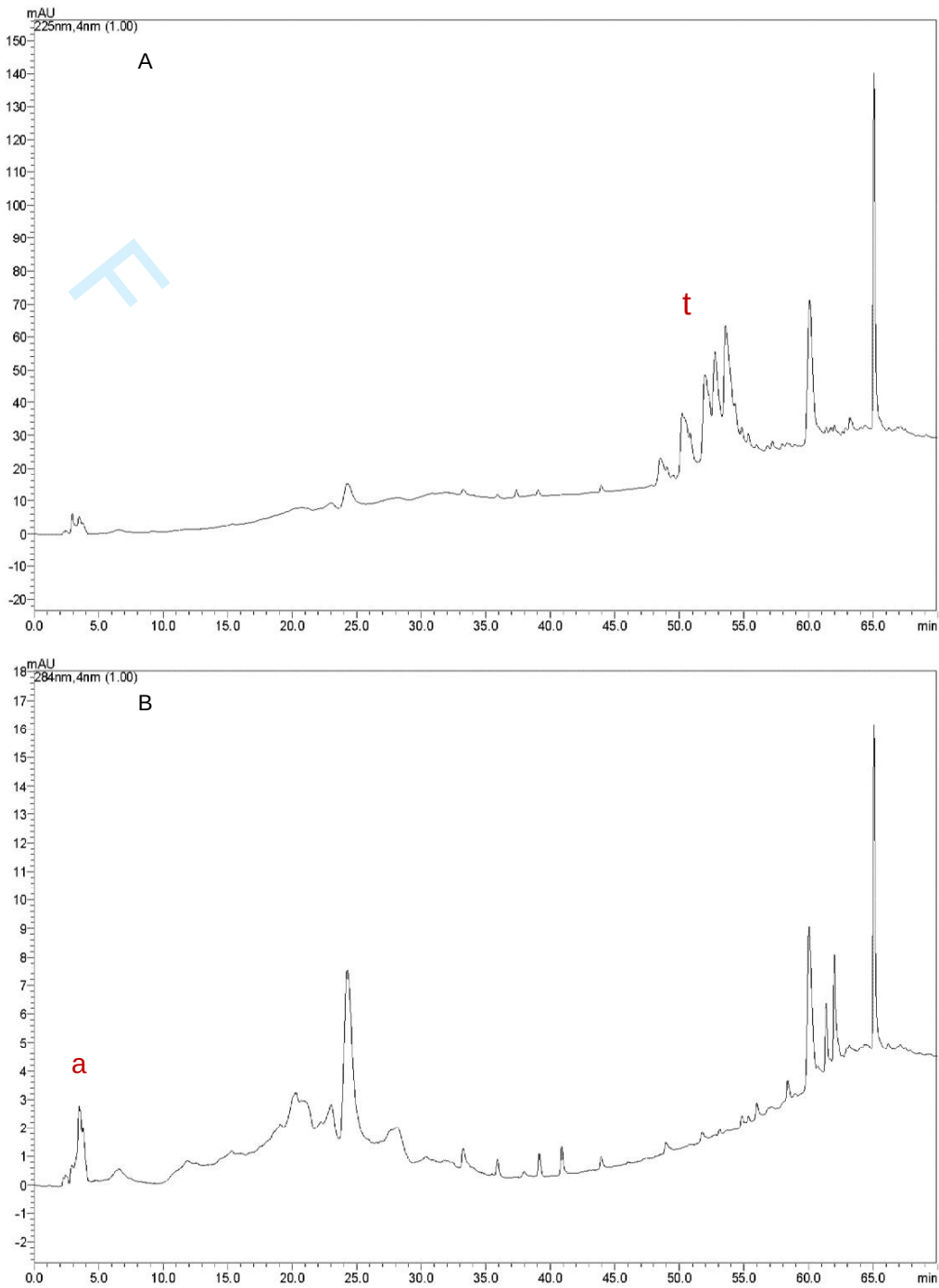
Table 1. Antibacterial activity of *H. pectinata* leaf crude aqueous extract by the agar-well diffusion method against Gram-positive and Gram-negative microorganisms.

Antibiotic /Extract AEPH /Microorganisms	Inhibition zone*		
	Gram	(mm)	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Chloramphenicol	NA	20	1.48
(<i>S. aureus</i>)			
Polymyxin (<i>P. aeruginosa</i>)	NA	16	5.9
AEPH + <i>S. aureus</i>	+	36	12.5
AEPH + <i>S. mutans</i>	+	33	18.7
AEPH + <i>C. freundii</i>	-	16	1000
AEPH + <i>E. coli</i>	-	19	200
AEPH + <i>K. pneumoniae</i>	-	18	200
AEPH + <i>P. aeruginosa</i>	-	15	1000

NA = Not Applicable

*Extract (AEPH) at 200 mg mL, and antibiotics chloramphenicol and polymyxin at 0.02 mg mL.

Figure captions



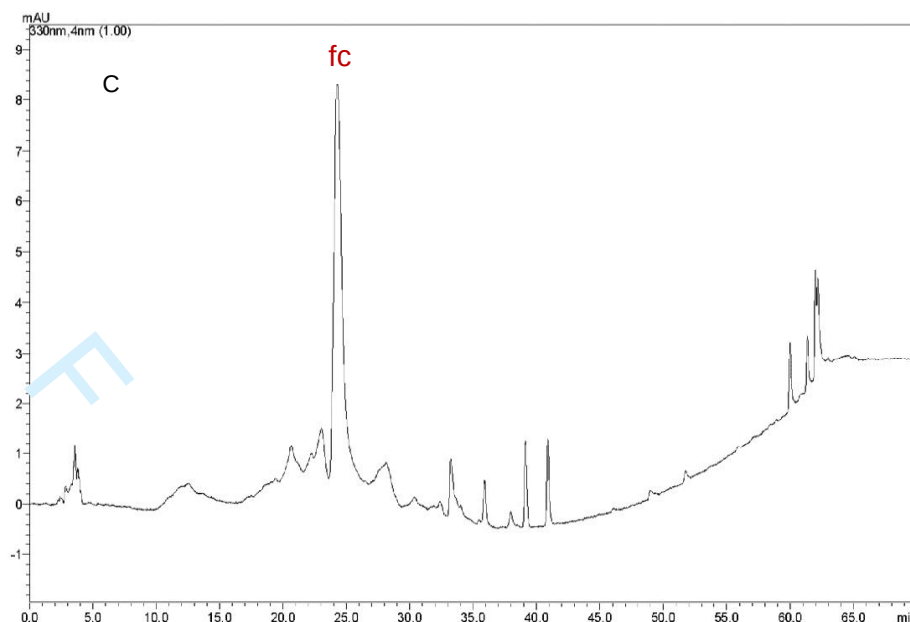


Figure 1. UV/Vis HPLC profile of the aqueous crude extract of *H. pectinata* leaves. A) 225 nm. This cluster of peaks after 40 min may be associated with free pentacyclitriterpenes (**t**), which are chemically classified as hydrocarbons and as such have absorptions around 225 nm of the UV-C region [200-280 nm] B) 284 nm. Alkaloids (**a**), basic compounds absorbing between 210 and 330 nm, may be associated with the small peaks observed at 225, 284 and 330 nm around 5 min due to their polar nature, which enables them to run with the mobile phase and leave the column early C) 330 nm. The peak with retention time of 25 min may be associated with phenolic compounds (**fc**), such as the catechins. Gradient elution (0-60 min, 5-100% de methanol; 60-70 min, 100% methanol) at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

7 Referências

AASS, A.M.; TOLLEFSEN, T.; GJERMO, P. A cohort study of radiographic alveolar bone loss during adolescence. **J Clin Periodontol.** v. 21, p.133-8, 1994.

AL-HEBSHI, N., AL-HARONI, M., SKAUG, N. In vitro antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. **Arch Oral Biol**, v. 51, p.183–188, 2005.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Check-list of the Family laminaceae in Pernambuco, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Thechnology.** v.45, p.343-353, 2002.

AMAR, S. & HAN, X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. **Med Sci Monit.** v. 9, p. 291-9, 2003.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Periodontal disease managment. Chicago. p. 115 – 125, 1999.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. The role of controlled drug delivery for periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, p. 125-140, 2000.

ARMITAGE, C.G. The complete periodontal examination. **Periodontol. 2000.** v. 34, p. 22 – 33, 2004.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; MORENO, M. P. N.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antidematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 81-86, 2001.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; ANTONIOLLI, A.R.; CAETANO, L.C.; CAMPOS, D.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, p. 334-339, 2008.

ASASE, A.; OTENG-YEBOAH, A.A.; ODAMTTEN, G.T.; SIMMONDS, M.S.J. Ethnobotanical study of some Ghanaian antimalarial plants. **Journal of Ethnopharmacology.** v..99, p.273-279, 2005.

BAKRI, I. M. & DOUGLAS, C. W. I. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. **Arch Oral Biol**, v. 50, p. 645 – 651, 2005.

BARBOSA, C.V. Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL. (Tese de doutorado). Maceió-AL, 2009. 98p.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.

BASÍLIO, I. J. L. D.; Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta farmacéutica bonaerense**. v. 25 n. 4, 2006.

BERNIMOULIN, J.P. Recent concepts in plaque formation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, suppl. 5, p. 7-9, 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, 2002.

BEZERRA, C.F.R. Avaliação dos níveis de proteína C-reativa ultra-sensível em pacientes com e sem periodontite crônica severa generalizada [dissertação]. Natal (RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.

BEZERRA, B.B.; CASATI, M.Z.; NOCITI, F.H.J.; SALLUM, E.A.; SALLUM, A.A. Dieta hiperlipídica e sua influência na evolução da doença periodontal experimental em ratos – resultados preliminares. **Rev. Periodontia**, v. 19, n. 1, p. 65-69, 2009.

BISPO, M. D.; MOURÃO, R. H. V.; FRANZOTTI, E. M.; BONFIM, K. B. R.; CARVALHO, I. B. M. de. **O uso popular de plantas medicinais da caatinga do povoado de Curituba: município de Canindé do São Francisco, Sergipe. 2001.** 128f. [Dissertação] (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Núcleo de Pós-Graduação em Estudos do Semi-Árido, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju/SE, 1999.

BISPO, M.D.; MOURÃO, R.H.; FRANZOTTI, E.M.; BOMFIM, K.B.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; MORENO, M.P.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Jornal of Ethnopharmacology**, v.76, p.81-86, 2001.

BJORVATN, K; SKALG, 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.

BLANK, A.F.; SANTANA, T.H.B.; BLANK, M.F.A; CRUZ, E.M.O. Influência do estágio de desenvolvimento em Genótipos de Sambacaitá (*Hyptis pectinata* L. Poit). **Scientia plena**. v. 1., 2011.

BORDIGNON, S.A.L. **O Gênero *Hyptis* Jacq. (Laminaceae) no Rio Grande do Sul.** (Dissertação de Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 1990. 123p.

BOTELHO, M. A.; RAO, V.S.; CARVALHO, C.B.M.; BEZERRA-FILHO, J.G.; FONSECA, S.G.C.; VALE, 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. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 471-478, 2007.

BOTELHO, M.A., PAIXÃO, M.S., ALLEGRETTI, C., ARGENTINO JR, J, ARAÚJO, R., RODRIGUES, K., MARTINS, E., MARINHO, G, QUEIROZ, D., RUELA, R., CORREIA, J.M., QUINTANS JR, L.J. Anti-Inflammatory Effect of Diclofenac Diethylammonium Gel on Acute Phase of Ligature Induced Periodontitis in Rats. **Lat. Am. J. Pharm.** v.29, p. 1371-6, 2010.

BUENO, A.X., MOREIRA, A.T.S., SILVA, F.T., ESTEVAM, C.S. MARCHIORO, M. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 3, 2006.

CÂNDIDO, E.A.F. Caracterização parcial dos efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas da *Hyptis fruticosa* Salzm, (ex) Benth. No Sistema Nervoso Central de camundongos. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Sergipe. Aracaju-SE, 2006.

CÂNDIDO, A.C.S. **Potencial alelopático da parte aérea de *Senna occidentalis* (L) Link (Leguminosae, Caesalpinioideae): Bioensaios em laboratório e em casa de vegetação.** (Dissertação de mestrado) Campo Grande – MS, 2007.

CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G.; TAKEY, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R. **Periodontia clínica**. 10 ed, Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2007.

CARVALHO, I. B. M. de. O uso popular de plantas medicinais da caatinga do povoado de Curituba: município de Canindé do São Francisco, Sergipe. 1999. 128f. [Dissertação] (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Núcleo de Pós-Graduação em Estudos do Semi-Árido, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju/SE, 1999.

CARVALHO, R.A.; LACERDA, J.T.; OLIVEIRA, E.F.; SANTOS, C.E. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas no inhame (*Dioscorea* sp). No Nordeste. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO. João Pessoa-PB. Anais...João Pessoa: Emepa, v. 1, p. 99-112, 2002.

CARVALHO, R.S. **Efeitos da venlafaxina e da vitamina E na periodontite experimental induzida por ligadura em ratos. Avaliação do estado de ansiedade, depressão e perda óssea alveolar.** (Tese de doutorado) Fortaleza-CE, 2010.

CAVAGNI, J.; SOLETTI, A.C.; GAIO, E.J.; ROSING, C.K. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Braz. Oral Res.**, v. 19, n. 4, p.290-294, 2005.

CAVALCANTI, M. G. P.; RUPRECHT, A.; VANNIER, M. W. Evaluation of an ossifying fibroma using three-dimensional computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol, Houndsmills*, v. 30, no. 6, p. 342-345, Nov. 2001.

CAVALCANTI, M. P. G. Diagnóstico por imagem da face. 1ªed. São Paulo: SANTOS, 2008.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**. v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CHAMBRONE, L. A.; CHAMBRONE, L. Tooth loss in well-maintained patients with chronic periodontitis during longterm supportive therapy. **Brazil. J Clin Periodontol**, v. 33, p. 759 – 764, 2006.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.28, n.1, p.11-23, 2007.

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.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, suppl. 5, p. 22-24, 2003.

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

CRUZ, M. da C. S. **Avaliação da atividade antifúngica de plantas utilizadas popularmente pela comunidade de Curitiba, Município de Canindé de São Francisco/SE**. 2002. 145f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Núcleo de Pós-Graduação em Estudos do Semi-Árido, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2002.

CRUZ, S.S.; COSTA, M.C.N.; GOMES FILHO, I.S.; VIANNA, M.I.P.; SANTOS, C.T. Maternal periodontal disease as a factor associated with low birth weight. **Rev Saúde Pública**. v. 39, p. 1-6, 2005.

FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S. Revisão etnofarmacológica, química e farmacológica do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.84, n.3, p.69-74, 2003.

FERES, M. FIGUEIREDO, L. C., BARRETO, I. M., COELHO, M. H., ARAÚJO, M. W., CORTELLI, S. C. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and própolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. **J Int Acad Periodontol**, v. 7, p. 90 – 96, 2005.

FISCHMAN, S. L. A clinician's perspective on antimicrobial mouthtrinses. **Journal of the American Dental Association**, v. 125, p. 20s-22s, 1994.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. **Planta médica**, v. 71, p. 278-280, 2005.

FRANCO, C.R.P. *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth. (Laminaceae): caracterização botânica, química, avaliações ecofisiológicas e atividades farmacológicas. (Tese de Doutorado). Aracaju-SE, 2010.

GALVÃO, M. P. A.; CHAPPER, A. ROSING, C. K.; FERREIRA, M. B. C.; SOUZA, M. A. L. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v. 17, p. 56 – 62, 2003.

GARCIA, R.I.; NUNN, M.E.; VOKONAS, P.S. Epidemiologic associations between periodontal disease and chronic obstructive pulmonary disease. **Ann Periodontol** v. 6, p. 71-7, 2001.

GARRETT, S. et al. Two multi-center studies evaluating locally delivered doxycycline hyclate, placebo control, oral hygiene, and scaling and root planing in the treatment of periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 70, p. 490 – 503, 1999.

GENCO, R. Placa dental microbiana. In: GENCO, R.; COHEN, D.W.; GOLDMAN, H. M. *Periodontia Contemporânea*. 1.ed. São Paulo: Santos, cap. 9, p. 162-134, 1996.

GOLDMAN, H.M. & COHEN, W.D. The infrabony pocket: classification and treatment. **J Periodontol**. v. 29, p. 272, 1958.

GURGEL, B.C.V. **Influência do meloxicam sobre a perda óssea alveolar em periodontite experimental: avaliação histométrica em ratos**. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2003.

HAITER-NETO, F.; WENZEL, A.; GOTFREDSEN, E. Diagnostic accuracy of cone beam computed tomography scans compared with intraoral images for detection of caries lesions. **Dentomaxillofac Radiol** v. 1, p. 18-22, 2008.

HONKALA, S.; AL-ANSARI, J. Self-reported oral health, oral hygiene habits, and dental attendance of pregnant women in Kuwait. **J Clin Periodontol**. v. 32, p. 809–14, 2005.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M. ; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal Essential Oil Research**, v. 15, p. 428-433, 2003.

IVANOVSKI, S. Periodontal regeneration. **Aust Dent J.** v. 54, Suppl 1:S118-28, 2009.

JEFFCOAT, M. *et al.* Use of biodegradable chlorhexidine chip in the treatment of adult periodontitis: clinical and radiographic findings. **J. Periodontol.**, v. 71, p. 256 – 262, 2000.

JESSE, W.H. Li, *et al.* Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

JORDAN, H.V.; KEYES, P.H.; BELLACK, S. Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. **J. Periodontal Res.**, v. 7, n. 1, p. 21-28, 1972.

JUIZ, P. J. L.; ALVES, R. J. C.; BARROS, T. F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. **Braz. J. Pharmacogn**, v. 20, p. 134-139, 2010.

KLAUSEN, B. Microbiological and imunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**, v. 62, p. 59 – 73, 1991.

KORBMACHER, H.; KAHL-NIEKE, B.; SCHOLLCHEN, M.; HEILAND, M. Value of two cone-beam computed tomography systems from a orthodontic point of view. **J Orofac Orthop** v. 4, p. 278-89, 2007.

KRIGAR, D.M.; KALTSCHMITT, J.; KRIEGER, J.K.; EICKHOLZ, P. Two subgingival plaque-sampling strategies used with RNA probes. **J Periodontol.** v. 78, p. 72 – 78, 2007.

KUHR, A. *et al.* Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J. Periodont. Res.**, v. 39, p. 101-106, 2004.

KWOK, V. & CATON, J. Prognosis revisited: a system for assigning periodontal prognosis. **J Periodontol**, v. 78, p. 2063-71, 2007.

LAZO, M.E.P.; NAVARRO, M.A., NÚÑEZ, M.O. El estado periodontal y la higiene bucal en los pacientes cardiopatas Del Policlínico “Plaza de la Revolución”. **Rev Cubana Estomatol** v. 43, p. 3, 2006.

Disponível em:http://bvs.sld.cu/revistas/est/vol43_3_06/est06306.htm. [acesso 11 set 2011]

LEIVADAROS, E.; VAN DER VELDEN, U.; BIZARRO, S.; TEN HEGGELER, J.M.; GERDES, V.E.; HOEK, F.J. A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. **J Periodontol**, v. 76, p. 121 – 128, 2005.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; MENEZES, A. V. B.; VIDAL, F. D.; DA ROCHA, F. A.; DE CASTRO, B.G. A.; DE ALBUQUERQUE, R.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, 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.

LINDHE, J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

LINDHE J, KARRING T, LANG NP. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 4 ed: Guanabara Koogan; 2005.

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.

LORENTZ, T.C.M. & MOREIRA, A.N. *Terapia Periodontal de Suporte*. Belo Horizonte: Centro de Extensão da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2003, 8p. Relatório.

LUDLOW, J.B.; DAVIES-LUDLOW, L.E.; BROOKS, S.L.; HOVERTON, W.B. Dosimetry of 3 CBCT devices for oral and maxillofacial radiology: CB Mercuray, NewTom 3G and I-Cat. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 4, p. 219–26, 2006.

MACDONALD, R.E. & AVERY, D.R. *Odontopediatria*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 2, p. 310 – 341, 1995.

MALAN, K.; PELISSIER, Y.; MARION, C.; BLAISE, A. ; BESSIERE, J. M. The essential oil of *Hyptis pectinata*. **Planta Medica**, v. 54, n. 6, p. 531-532, 1988.

MACHADO, A.C.P.; VADENAL, R.; CORTELLI, J.R. Doença periodontal e doença cardíaca: uma revisão dos mecanismos. **Rev Biociên.** , p. 153 – 159, 2004.

MACHION, L. et al. 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.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n.3, p.429-438, 2002.

MARIN, C.; SEGURA-EGEA, J.J.; MARTINEZ-SAHUQUILLO, A.; BULLÓN, P. Correlation between infant birth weight and mother's periodontal status. **J Clin Periodontol.**, v. 32, p. 299-304, 2005.

MASCARENHAS, P.; GAPSKI, R.; AL-SHAMMARI, K.; WANG, H.L. Influence of sex hormones on the periodontium. **J Clin Periodontol**, v. 30, p. 671-681, 2003.

MELO, G.B.; SILVA, R.L.; MELO, V.A.; LIMA, S.O.; ANTONIOLLI, A.R.; CASTRO-E-SILVA, T.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S.; ZUCOLOTO, S.; RAMALHO, L.N.Z.; RAMALHO, F.S.; CASTRO-E-SILVA JR., O. Enhancement of Liver Regeneration by the Association of *Hyptis pectinata* with Laser Therapy. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 5, p. 949–954, 2005.

MELO, G.B.; SILVA, R.L.; MELO, V.A.; ANTONIOLLI, A.R.; MICHELLONE, P.R.T.; ZUCOLOTO, S.; SOUZA, M.E.J.; GOMES, M.C.J.; CORREIA, R.B.; CASTRO-E-SILVA, O. Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.21, (suplemento 1), 2006.

MELO, J.G.; MARTINS, J.D.G.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializadas no Brasil: “castanha-da-índia” (*Aesculus hippocastanum* L.), “capim-limão” (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e “centela” (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**. v. 21, n.1, 2007.

MENEZES, A.M.S.; RAO, V.S. Effect of astronium urundeuva on gastrointestinal transit in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n. 21, p. 531-533, 1988.

MENEZES, I.A.C.; MARQUES, M.S.; SANTOS, T.C.; DIAS, K.S.; SILVA, A.B.L.; MELO, I.C.M.; LISBOA, A.C.C.D.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; MARÇAL, R.M.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive effect and acute toxicity of the essential oil of *Hyptis fruticosa* Salzm. Ex Benth. in mice. **Fitoterapia**. v.78, p.92-195, 2007.

MISHRA, B.B; TIWARI, V.K. Natural Products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46. p. 4769-4807, 2011.

NASCIMENTO, P. F. C. Avaliação *in vitro* do potencial antimicrobiano do óleo essencial *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e de colutórios sobre os *Streptococcus mutans*. 129f. [Dissertação]. (mestrado em Ciências da Saúde) – Núcleo de Pós-Graduação em Medicina: Universidade Federal de Sergipe, Aracaju/SE, 2005.

NASCIMENTO, P.F.C.; ALVIANO, W.S.; NASCIMENTO, A.L.C.; SANTOS, P.O.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; JESUS, R.A.; AZEVEDO, V.G.; ALVIANO, D.S.; BOLOGNESE, A.M.; TRINDADE, R.C. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**. v. 14, p. 485-489, 2008.

NASSAR, P.O. **Avaliação do efeito da Sinvastatina em ratos submetidos a periodontite experimental e imunossuprimidos por Ciclosporina-A e Tacrolimus**. 115f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2008. .

OFFENBACHER, S. *et al.* Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **J Periodontol**, v. 67, p. 1103-1113, 1996.

OLIVEIRA, F.Q.; GONÇALVES, L.A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.3, p.6-41, 2006.

OPPERMANN, R.V. & ROSING, C.K. Fundamentos da prática clínica periodontal: tratamento da patologia – quuais os limites, riscos e previsibilidade ao longo do tempo. In: **Periodontia Ciência e Clínica**, Porto Alegre, v. 4, p. 121 -131, 2001.

ÖVER, C. *et al.* 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.

PAIVA, J.S. & ALMEIDA, R.V. Periodontia: a atuação clínica baseada em evidências científicas. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

PAN, P.; BARNETT, M. L.; COELHO, J.; BROGDON, C.; FINNEGAN, M. B. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 4, p. 256-261, 2000.

PAPAPANOU PN & TONETTI MS. Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions. **Periodontol 2000**. v. 22, p. 8-21, 2000.

PARKS, E.T. Computed tomography applications for dentistry. **Dent Clin North Am**, v. 44, no. 2, p. 371-394, Apr. 2000.

PATEL, S.; DAWOOD, A.; PITT-FORD, T.; WHAITES, E. The potential applications of cone beam computed tomography in the management of endodontic problems. **International Endodontic Journal**. v.10, p. 818-30, 2007.

PENNISI, E. A mouthful of microbes, **Science**, v. 307, p. 1899 – 1901, 2005.

PEREIRA, JV. Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn sobre Microrganismos Formadores de Placa Bacteriana. [Dissertação]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 1998.

PETERSEN, P.E.; YAMANOTO, 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.

POLIMENI G, XIROPAIDIS AV, WIKESJO UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. **Periodontol 2000**, v. 41, p. 30-47, 2006.

POLSON, A. M. et al. Multi-center comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis. II Clinical results. **J. Periodontol.**, v. 68, p. 119 – 126, 1997.

QUERESBY, F.A.; SAVELL, T.A.; PALOMO, M. Applications of cone beam computed tomography in the practice of oral and maxillofacial surgery. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 4, p. 791-6, 2008.

RAMADAN, A.B.; MITCHELL, D.F. A roentgenographic study of experimental bone destruction. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v.15, p. 934-43, 1962.

RIBEIRO, A.Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 15, p. 65-70, 2005.

ROBERTS, M. C. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. **Periodontol 2000**, v. 28, p. 280 – 297, 2002.

RODRIGUES, L.V.; FERREIRA, F.V.; REGADAS, F.S.; MATOS, D.; VIANA, G.S.; Morphologic and morphometric analysis of acetic acid-induced colitis in rats after treatment with enemas from *Myracrodruon urundeuva* Fr all. **Phytother. Res.**, v.3, n. 16, 2002.

ROSAN, B. & LAMONT, R.J. Dental plaque formation. **Microbes and infection.** v. 2, p. 1599 – 1607, 2000.

ROXO JÚNIOR, P. & GABRIELLI, M.F.R. Alterações imunológicas na doença periodontal: Revisão de literatura. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, v. 27, p.195-198, 2004.

ROZA, M. R., SILVA, L. A. F., JANUÁRIO, A. L., BARRIVIERA, M., OLIVEIRA, A. C. A., FIORAVANTI M. C. S.; Tomografia computadorizada de feixe cônico em odontologia veterinária: descrição da técnica e indicações; Anais do XXIX Congresso Brasileiro da Anclivepa, Fortaleza – Ceará, 2008.

SALAZAR, F. Contribucion al conocimiento de las periodontitis en la norte de Portugal: aspectos clínicos e microbiológicos. *Tesis doctoral*, Universitat de Barcelona 2006.

SAEKI, Y.; ITO, Y.; SHIBATA, M.; SATO, Y.; OKUDA, K.; TAKAZOE, I. Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria. **Bull Tokyo Dent Coll**, v. 30, p. 129-135, 1989.

SALLAY K, SANAVI F, RING I, PHAM P, BEHLING UH, NOWOTNY A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J Periodontal Res.** v. 17,. P. 263-74, 1982.

SAMPAIO, F. C. *Fitoterapia em Odontologia*: Das plantas medicinais aos fitoterápicos. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba, 1997.

SANTOS, A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol*, v. 30, p. 13 – 16, 2003.

SANTOS, M. R.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**. v. 78, p. 186 – 191, 2007.

SANTOS-NETO, A.L.; MEDEIROS-FILHO, S.; BLANK, A.F.; SANTOS, V.R.; ARAÚJO, E. Influência do peso da semente e promotores químicos na qualidade fisiológica de sementes de Sambacaitá. **Revista Caatinga**. v. 22, p. 187-192, 2009.

SASTRAVAHA, G., GASSMANN, G., SANGTHERAPITIKUL, P., GRIMM, W. D. Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts in supportive periodontal therapy. **J Int Acad Periodontol**, v. 7, p. 70 – 79, 2005.

SCARFE, W.C.; FARMAN, A.; SUKOVIC, P. Clinical applications of Cone-Beam Computed Tomography in dental practice. **J Can Dent Assoc**; v. 72, p. 75-80, 2006.

SHER, R.; CONCEIÇÃO, A.C.V.; PANTALEÃO, S.M.; FREIRE, E.R.; FARIAS, S.A.; UMBELINO, L.A, Avaliação do efeito teratogênico do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* (L) Poit. (Lamiaceae) em ratas Wistar. **Biologia Geral e Experimental**. v. 3, p. 5-8, 2003.

SIMÕES, C.M.O. (Org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Rio Grande do Sul: Editora da UFRGS e UFSC, 2000.

SILVA, R. C. Plantas medicinais na saúde bucal. Vitória/ES: [s.n.], 2001.

SILVA, R.L.; MELO, G.B.; ANTONIOLLI, A.R.; LIMA, S.O.; MELO, V.A.; RAMALHO, F.S.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO E SILVA JR, O. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, suplemento 3, 2002.

SLOTS, J; RAMS, T. E. Microbiology of periodontal disease. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. (ed.). *Contemporary oral microbiology and immunology*. St. Louis: C V Mosby Co., p. 425 – 443, 1992.

SOSKOLNE, W. A. et al. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. **J. Periodontol.**, v. 25, p. 1017 – 1021, 1998.

SOUSA, J.C. *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. 2 ed. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2006.

STOLLER, N. H. et al. 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, p. 1085 – 1091, 1998.

SUSIN, C.; ROSING, C. O rato como modelo para o estudo das repercussões do estresse nas doenças. **Rev. Periodontia.**, v. 13, n.6, p.5-10, 2002.

TAKAHASHI, N.; FUKUZAWA, M.; MOTAHIRA, H.; OCHIAI, K.; NISHIKAWA, H.; MIYATA, T. A pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in oral cavity. **J Periodontol**, v. 40, p. 501-505, 2003.

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

TEIXEIRA, S.A.; MELO, J.I.M. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil. **IHERINGIA**. Sér. Bot., Porto Alegre, v.61, n.1-2, p.5-11, 2006.

TOMAR, S.L. & ASMA, S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. **J Periodontol**. V.71, p.743-751, 2000.

TONETTI, M.S.; D´AIUTO, F.; NIBALE, L.; DONALD, A.; STORRY, C.; PARKAR, M. Treatment of periodontitis and endothelial function. **N Engl J Med**. v. 356, p. 911-20, 2007.

TSUGAWA, A.J. & VERSTRAETE, F.J. How to Obtain and Interpret Periodontal Radiographs in Dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 15, n. 4, p. 204-210. 2000.

WADA, N.; MAEDA, H.; YOSHIMINE, Y.; ALCAMINE, A. Lipopolysaccharide stimulates expresión of osteoprotegerin and receptor activator of NF-Kappa B ligandin periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. **Bone**, v. 35, n 3, p. 629-635, 2004.

WALKER, C. B. Antibiotic susceptibilities of periodontal bactéria: in vitro susceptibilities to eight antimicrobial agents. **J. Periodontol.**, v. 56, p. 67 – 74, 1985.

WHAITES, E. *Princípios de Radiologia Odontológica*. São Paulo: ARTMED; 2003. 444 p.

WIKESJO, U.M.; LIM, W.H.; THOMSON, R.C.; HARDWICK, W.R. Periodontal repair in dogs: gingival tissue occlusion, a critical requirement for GTR? **J Clin Periodontol**. v. 30, p. 655-64, 2003.

WILLERSHAUSEN, B. Índice de placa bacteriana e sangramentos gengivais: a influência de ingredientes herbáceos. **Rev. APCD**, v. 48, n. 3, p. 1335-1340, 1994.

WILLIAMS, C.E.C.S. & OFFENBACHER, S. Periodontol medicine: the emergence of a new branch of periodontology. **Periodontol 2000**, v. 23, p. 9-12, 2000.

WILSON, M.; Bacterial biofilms and human disease. **Science Progress**. v. 3, p. 235 – 254, 2001.

8. APÊNDICE - PATENTE

“FORMULAÇÃO TÓPICA DE SAMBACAITÁ (*Hyptis pectinata* L. Poit) PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL E PROCESSO DE OBTENÇÃO DA MESMA”

< Uso exclusivo do INPI >

INPI-RESE
16 AVO **15 27** **000104**
Espaço reservado ao protocolo

Espaço para etiqueta

PROTOCOLO GERAL
DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
1.2 Qualificação:
1.3 CNPJ/CPF: 13031547000104
1.4 Endereço Completo: AV. MARECHAL RONDON S/N, CONJUNTO ROSA ELZE, SÃO CRISTÓVÃO-SE
1.5 CEP: 49100-000 1.6 Telefone: 79 2105-6865 1.7 Fax: 79 2105-6493
1.8 E-mail: cintec.ufs@gmail.com

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):
"FORMULAÇÃO TÓPICA DE SAMBACAITÁ (HYPTIS PECTINATA L. POIT) PARA TRATAMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL E PROCESSO DE OBTENÇÃO DA MESMA".

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° Data de Depósito:

5. Prioridade: ☐ interna ☐ unionista
O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):
☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: LUCINDO JOSÉ QUINTANS JUNIOR
6.2 Qualificação: PROFESSOR 6.3 CPF: 930961434-04
6.4 Endereço completo: AV. MURILO DANTAS, N° 1409, ED. ELIAS SANTOS, BAIRRO: FAROLANDIA
6.5 CEP: 49032-490 6.6 Telefone: 79 3217-9196 6.7 Fax:
6.8 E-Mail: lucindo_jr@yahoo.com.br

☒ continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- ☐ Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
☐ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
☐ Listagem de seqüências em formato impresso: fls.
☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o n° total de somente uma das vias de cada documento)

☒	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	8 fls.
☐	11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	1 fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	☐	11.7 Desenhos	fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Xerox: Termo de Posse, RG e CPF, Diário Oficial da União, Declaração do Inventor.				4 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 15 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Março, 16 de Agosto de 2011
Local e Data

Prof. Dr. Josué Modesto dos Passos Sub. inh.
Assinatura e Carimbo
Reitor

CONTINUAÇÃO

6. INVENTORES (72):

Nome: Mônica Silveira Paixão
CPF: 587.325.435-49
Data de Nascimento: 02/10/1970
Vínculo: Professor
Nacionalidade: Brasileira
Endereço: Rua Aloísio Braga, nº 200, bairro: Suissa
Cidade: Aracaju UF: SE País: Brasil
CEP: 49050-050
Telefone Residencial: (79) 3214-0604 Telefone comercial: (79) 2105-1821
E-mail: paixão.monicasilveira@gmail.com

Nome: Charles dos Santos Estevam
CPF: 609.567.985-00
Data de Nascimento: 15/01/1971
Vínculo: Professor
Nacionalidade: Brasileira
Endereço: Rua Evaldo Campos Junior, nº 580, bairro: Aruana
Cidade: Aracaju UF: SE País: Brasil
CEP: 49.160-000
Telefone Celular: (79) 9163-9721 Telefone Comercial: (79) 3254-4237
E-mail: cse.ufs@gmail.com

Nome: Adriano Antunes de Souza Araújo
CPF: 831.349.484-00
Data de Nascimento: 16/03/1975
Vínculo: Professor
Nacionalidade: Brasileira
Endereço: Av. Melício Machado, Condomínio Maria Rezende Machado, nº 4000, Casa 08, Lote 21, bairro: Aruana
Cidade: Aracaju UF: SE País: Brasil
CEP: 49.160-000
Telefone Celular: (79) 9192-4545 Telefone Comercial: (79) 2105-6841
E-mail: adriasa2001@yahoo.com.br

Nome: Francilene Amaral da Silva
CPF: 410.286.942-53
Data de Nascimento: 15/02/1974
Vínculo: Professor
Nacionalidade: Brasileira
Endereço: Rua Ecologista Chico Mendes, nº 78, apto. 802, bairro: Farolândia
Cidade: Aracaju UF: SE País: Brasil
CEP: 49.032-280
Telefone celular: (79) 3243-1881 Telefone Comercial: (79) 2105-6841
E-mail: farmsilva@uol.com.br

Nome: Mairim Russo Serafini
CPF: 008.937.850-40
Data de Nascimento: 11/11/1984
Vínculo: Aluno Doutorado
Nacionalidade: Brasileira

Endereço: Rua B, nº 50, bloco 2, apto. 307, bairro: Farolândia

Cidade: Aracaju

UF: SE

País: Brasil

CEP: 49.000-000

Telefone Celular: (79) 8805-9977

Telefone Comercial: (79) 2105-6841

E-mail: maiserafini@hotmail.com

São Cristóvão, de de 2011.

Assinatura e Carimbo

Prof. Dr. Josué Modesto dos Passos Cub. L.H.
Reitor

9. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo do efeito do gel de Sambacaitá (*Hyptis pectinata*) e seus princípios ativos na Doença Periodontal Experimental", sob coordenação do Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (protocolo CEPA 47/2009), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 05/11/2010.

São Cristóvão, 12 de novembro de 2010

Prof.ª. Dr.ª. Flavia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *HYPTIS PECTINATA* EM UM MODELO DE DOR OROFACIAL EM ROEDORES”**, sob coordenação do **Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior** (protocolo **CEPA 10/2011**), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 24/03/2011.

São Cristóvão, 24 de março de 2011.

Prof.ª. Dr.ª. Flávia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

Análise Histopatológica

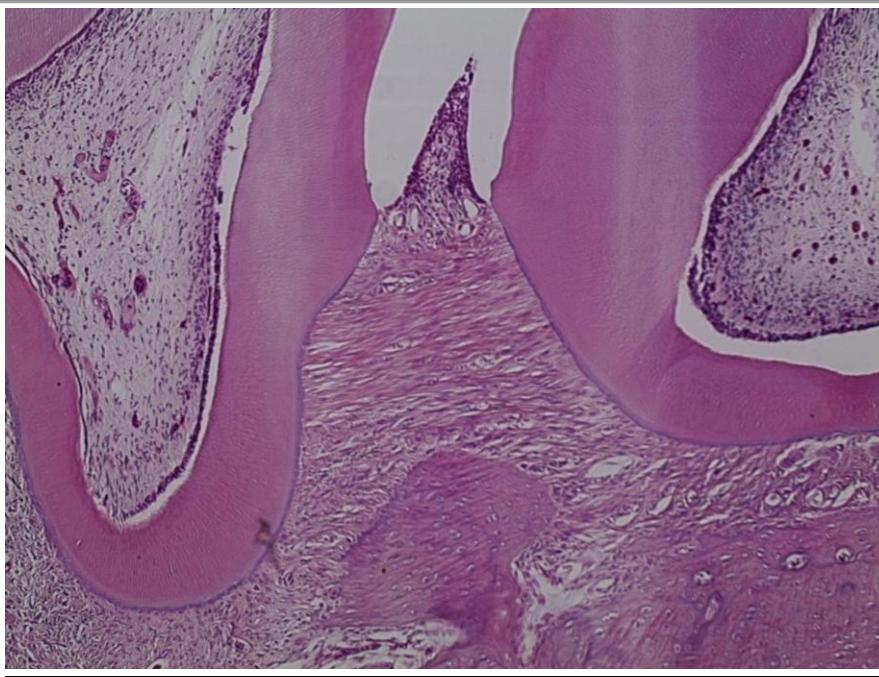


Fig. 1. Grupo Normal: espaço interproximal exibindo epitélio sulcular e juncional com aspecto saudável e conformação normal. (H/E, aumento de 100x).

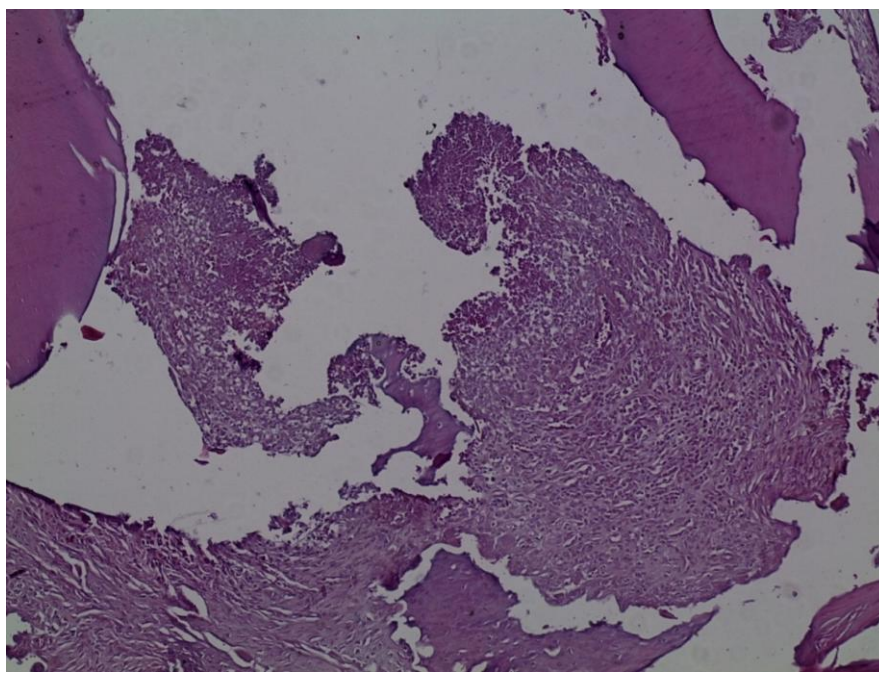


Fig. 2. Grupo Gel Veículo. Nota-se intensa perda de inserção e reabsorção óssea nas regiões interproximal e de furca. (H/E, aumento 100x).

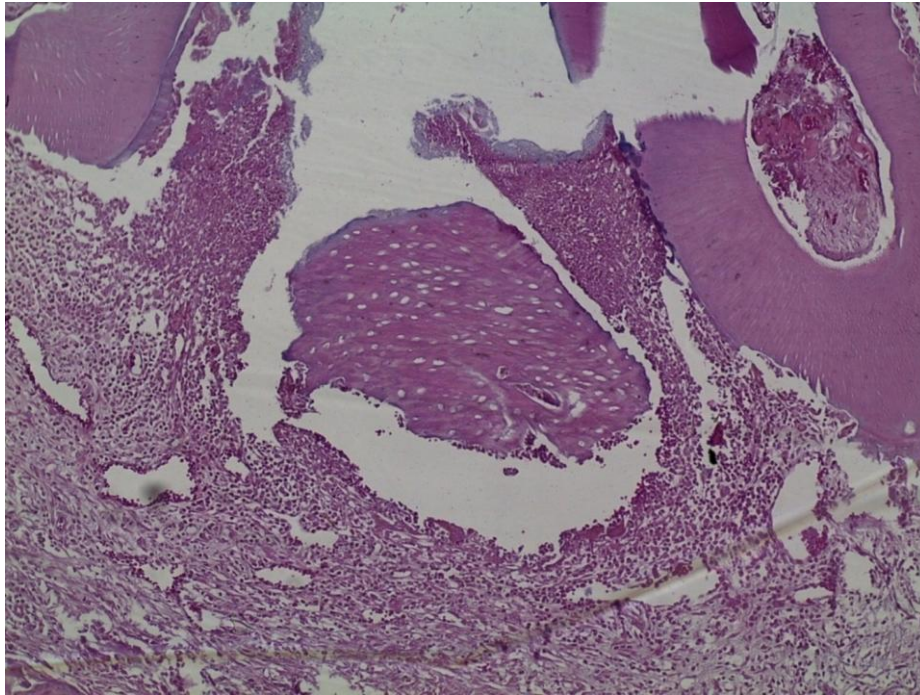


Fig.3. Grupo Não Tratado. Perda de inserção e reabsorção óssea na região interproximal, estendendo-se para a região de furca. Destruição de cripta óssea alveolar, com formação de sequestro ósseo envolvido por intenso infiltrado inflamatório por PMNs. Presença de epitélio juncional em posição mais apical, com formação de extensa bolsa periodontal. (H/E, aumento 100x)

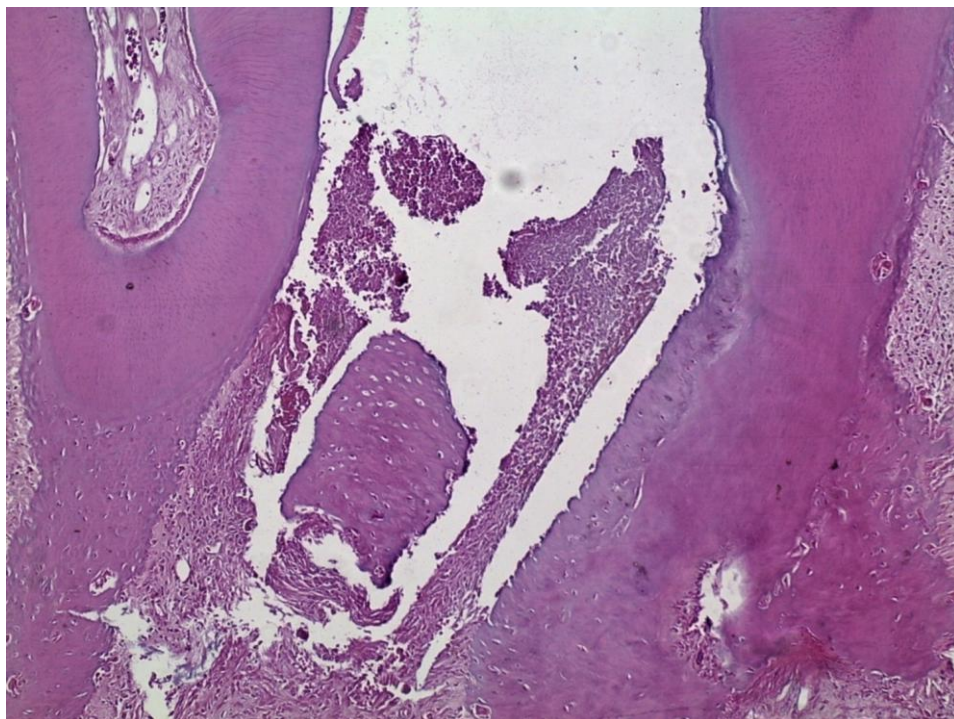


Fig. 4. Grupo Gel Sambacaitá 5%. Nota-se perda de inserção e reabsorção óssea na região interproximal, com destruição de cripta óssea alveolar e formação de sequestro ósseo envolvido por moderado infiltrado inflamatório por PMNs. Presença de epitélio juncional em posição mais apical, com formação de bolsa periodontal.(H/E, aumento 100x).

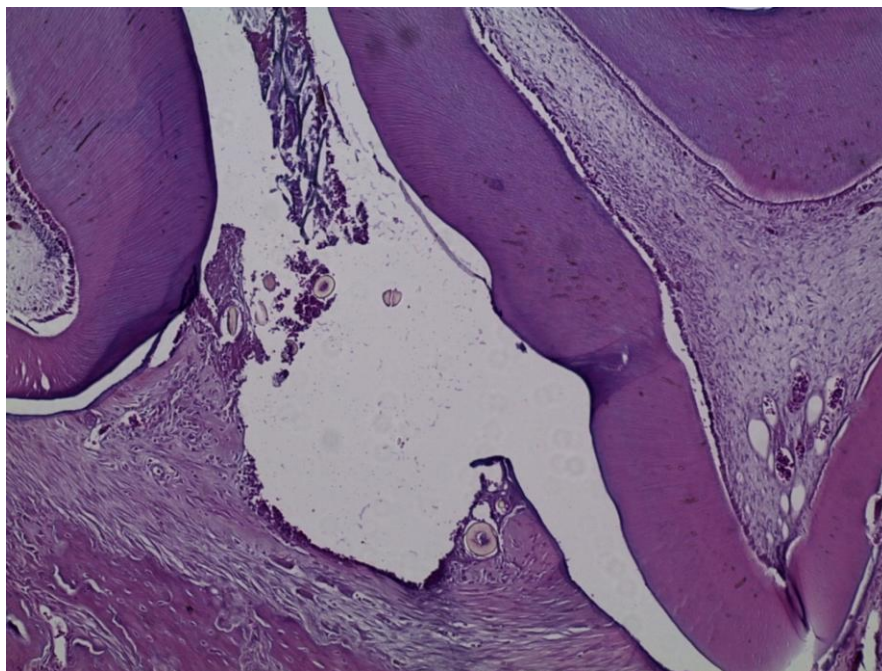


Fig. 5. Grupo Gel Sambacaitá 10%. Observa-se na região interproximal a gengiva papilar achatada, com formação de bolsa periodontal. Nota-se que a reabsorção óssea ficou restrita à região da ligadura, sem comprometer a porção basilar do processo alveolar. Região de furca íntegra, com conformação normal. (H/E, aumento 100x).

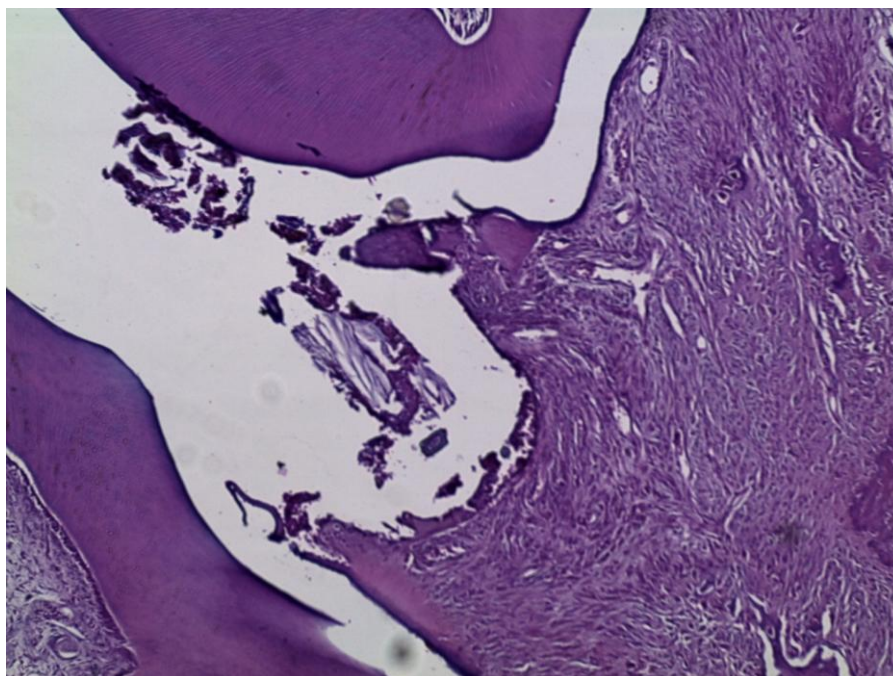


Fig. 6. Grupo Gel Doxíciclina 10%. Nota-se papila gengival achatada, com discreta migração apical do epitélio juncional, com formação de bolsa periodontal. Observa-se discreta perda de inserção, bem como preservação da cripta óssea e da região de furca. (H/E, aumento 100x).

Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico

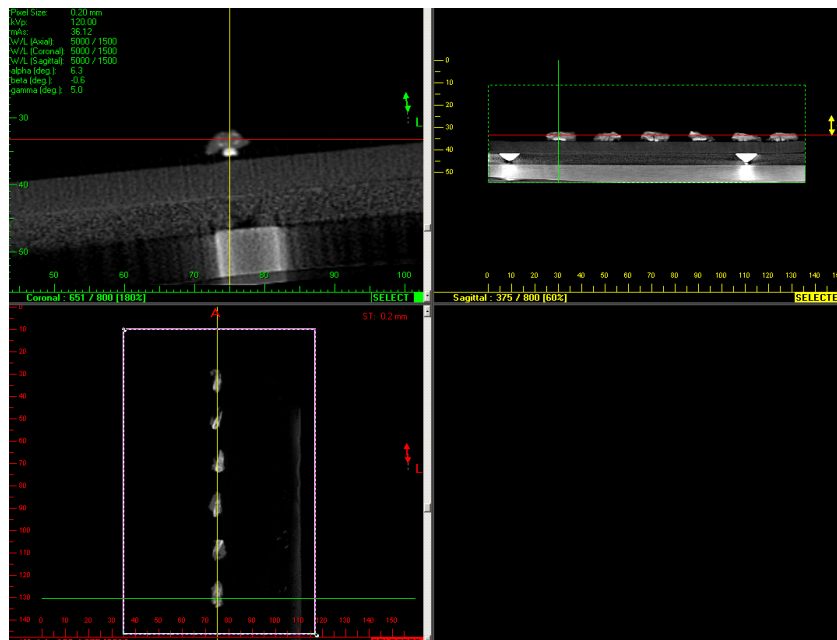


Fig. 7. Tela MPR em Tomógrafo da marca i-cat, modelo clássico (Imaging Sciences International). Foi utilizada uma área de exposição de 6 cm com tempo de exposição de 40 segundos e voxel de 0,2 mm (resolução máxima). Grupo NT. As imagens digitais foram analisadas em três cortes: axial, sagital e coronal.

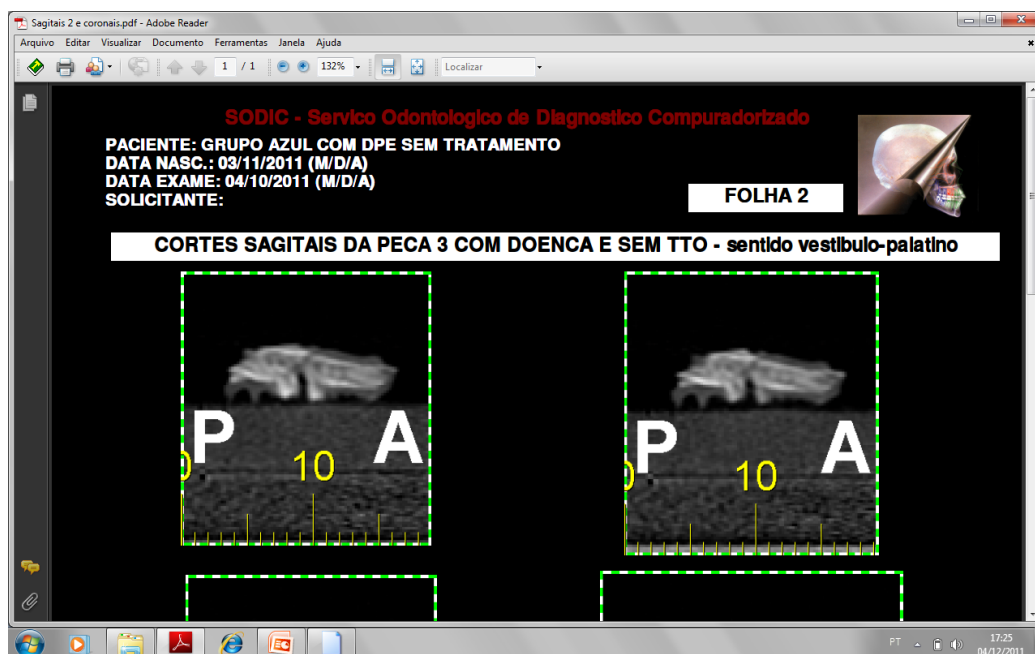


Fig 8. Grupo NT - Cortes sagitais de 0,2 mm, evidenciando perda de estrutura óssea (1) na região onde foi realizada a indução da doença periodontal. Observar região HIPODENSA característica de destruição óssea

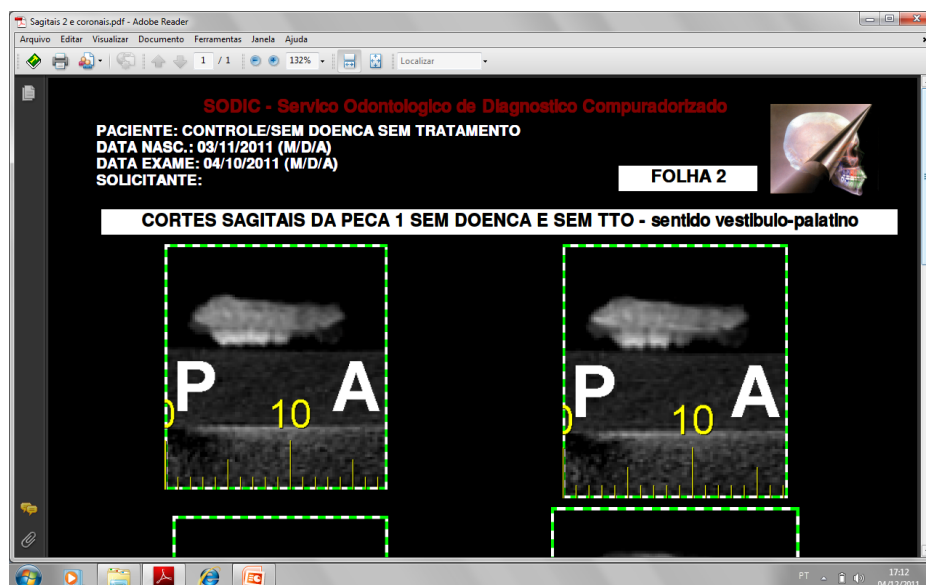


Fig. 9. Grupo Normal – Cortes sagitais: Região hiperdensa evidenciando estrutura óssea normal

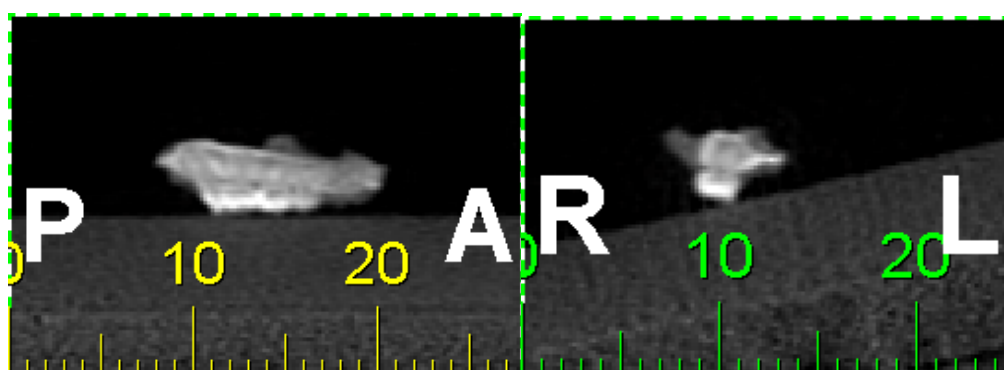


Fig 10. Cortes sagital e coronal – com DPE e gel Sambacaitá 5%

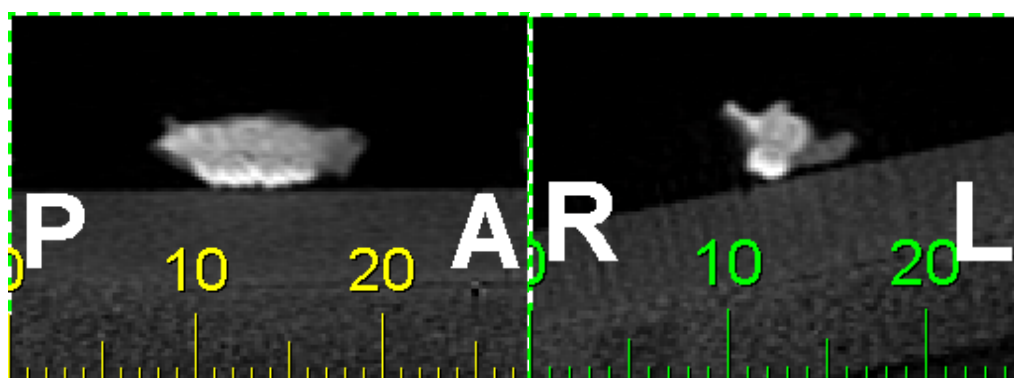


Fig 11. Cortes sagital e coronal – com DPE e gel Doxiciclina 10%

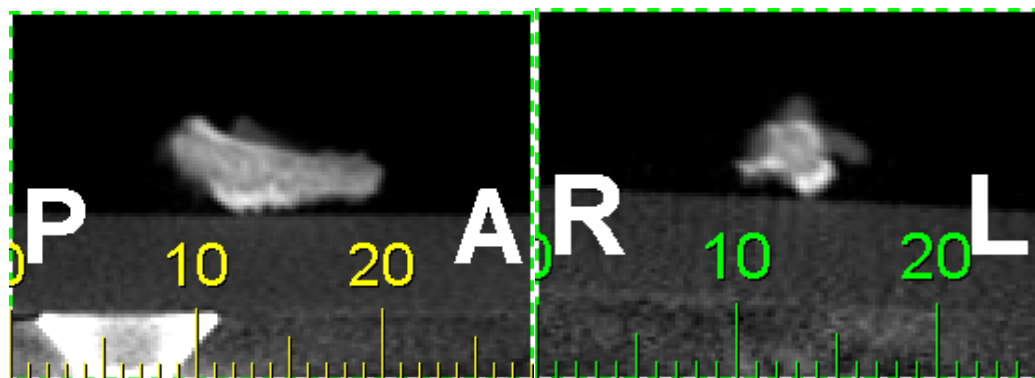


Fig 12. Cortes sagital e coronal – com DPE e gel Sambacaitá 10%

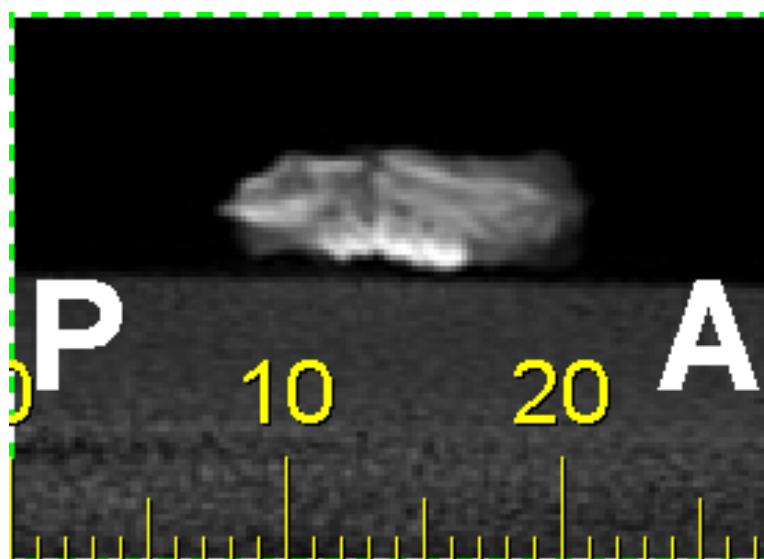


Fig 13. Corte sagital – grupo Não-Tratado (NT)