

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Pedro Figueiredo Pereira de Andrade

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Pseudobrickellia*
brasiliensis EM RATOS COM PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA**

Diamantina

2020

Pedro Figueiredo Pereira de Andrade

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Pseudobrickellia
brasiliensis* EM RATOS COM PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wagner de Fátima Pereira.
Coorientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Furtado Gonçalves.

Diamantina

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A553a

Andrade, Pedro Figueiredo Pereira de
Avaliação do efeito do extrato etanólico de *Pseudobrickellia brasiliensis* em ratos com periodontite induzida por ligadura / Pedro Figueiredo Pereira de Andrade, 2020.
81 p.: il.

Orientador: Wagner de Fátima Pereira

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.

1. Periodontite. 2. Modelos animais. 3. Ratos wistar. 4. Fitoterapia. 5. *Pseudobrickellia brasiliensis*. I. Pereira, Wagner de Fátima. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 617



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

PEDRO FIGUEIREDO PEREIRA DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *PSEUDOBRIKELLIA BRASILIENSIS*
EM RATOS COM PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGODONTO) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), nível de Mestrado, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Wagner de Fátima Pereira.
Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Furtado Gonçalves.

Data de aprovação 21/12/2020.

Prof. Dr. Wagner de Fátima Pereira - (UFVJM)
(Orientador)

Prof. Dr. Dhelfeson Willya Douglas de Oliveira - (UFVJM)

Prof. Dr. Paulo Messias de Oliveira Filho - (UFVJM)



[8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Dhelfeson Willya Douglas de Oliveira, Servidor**, em 22/12/2020, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Messias de Oliveira Filho, Servidor**, em 22/12/2020, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0242324** e o código CRC **D783C56E**.

À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Denise e Ednézio, pela força nos momentos mais difíceis e pela confiança e apoio em meus estudos. Ao meu irmão Matheus, pelo apoio e por ser um grande incentivador. Agradeço também à minha avó Anésia pela compreensão em todos meus momentos de ausência e por todas as orações. À minha tia Dalva, por todo apoio em momentos difíceis. Agradeço à minha prima Morgana, minha grande incentivadora e uma grande inspiração. A todos meus familiares;

Ao meu namorado Renan Gontijo, por todo o apoio emocional, compreensão e amizade;

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, minha eterna casa, e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia;

À secretária do PPGOdonto, Gislene Alessandra Santos Botelho;

Ao técnico do laboratório de patologia do departamento de odontologia, Leonardo da Cunha Monteiro e ao técnico do laboratório de histologia do instituto de ciências biológicas, Samuel Cunha Oliveira Giordani;

Ao técnico bioterista Fidelis Antônio da Silva Júnior;

Aos alunos de graduação Célio Leone do curso de odontologia e Andreza Lemos Afonso, do curso de farmácia;

Aos colegas Rejane Pereira, Tatiele Santos, Bianca Lara e Vinícius Jасolka;

Aos meus amigos da pós-graduação e meus amigos de Diamantina;

À professora Endi Lanza Galvão, por todo conhecimento compartilhado e por ter sido uma grande incentivadora;

À professora Kelly Cristina Kato, do departamento de farmácia pela ajuda na confecção das pomadas;

À professora Valéria Gomes de Almeida, por ter cedido o extrato utilizado;

Ao meu orientador Wagner de Fátima Pereira e coorientadora Patrícia Furtado Gonçalves por todos os ensinamentos compartilhados, mas principalmente pela paciência;

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento de bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A periodontite é uma doença bucal que afeta a maior parte da população de adultos e é considerada um problema de saúde pública. O tratamento para essa doença consiste na raspagem e alisamento radicular e profilaxia para a remoção dos acúmulos de cálculo e biofilme dental. A fitoterapia vem sendo estudada como um tratamento adjuvante no combate à periodontite. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do extrato etanólico de folhas de *Pseudobrickellia brasiliensis* relacionados à toxicidade oral tópica gengival e seus efeitos no tratamento da periodontite induzida por ligadura em ratos. Para a avaliação da toxicidade oral tópica, 4 ratos Wistar machos receberam aplicação da pomada de *P. brasiliensis* e foram avaliados quanto à aparência macro e microscópica da região em que a pomada foi aplicada. Depois disso, 24 ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos para avaliação do efeito da pomada no tratamento da doença periodontal induzida por ligadura em ratos (Grupo controle negativo; Grupo controle positivo; Grupo Pomada a 2,5% e Grupo Pomada a 5%) contendo 6 animais cada. Após a indução da doença periodontal por meio da colocação de ligadura de fio de algodão e passados 11 dias de tratamento com a pomada de *P. brasiliensis*, os animais foram eutanasiados e suas mandíbulas removidas para a obtenção de cortes histológicos dos primeiros molares inferiores direitos e esquerdos. A avaliação histométrica foi realizada por meio da quantificação do volume da região de lesão de furca, o que indica o volume de perda óssea alveolar inter-radicular dessa região. A análise intra-grupo revelou maior perda óssea nos dentes com ligadura do que nos dentes que não possuíam a ligadura ($p < 0,05$), confirmando a eficácia do modelo. Entretanto, a análise inter-grupos não revelou diferenças estatisticamente significantes no volume de perda óssea nos dentes com ligadura entre os diferentes grupos experimentais ($p > 0,05$). Conclui-se que a pomada não apresentou toxicidade aos tecidos periodontais e não reduziu o volume de lesão de furca.

Palavras chave: Periodontite. Modelos animais. Ratos wistar. Fitoterapia. *Pseudobrickellia brasiliensis*.

ABSTRACT

Periodontitis is an oral disease that affects most of the adult population and is considered a public health problem. The treatment for this disease consists of scaling and root planing and prophylaxis to remove calculus and dental biofilm. Phytotherapy has been studied as an adjuvant treatment to combat periodontitis. The aim of the present study was to evaluate the effects of ethanolic extract of *Pseudobrickellia brasiliensis* leaves related to topical oral gingival toxicity and its effects in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats. For the assessment of topical oral toxicity, 4 male Wistar rats received *P. brasiliensis* ointment and were evaluated for macroscopic and microscopic appearance of the region where the ointment was applied. Thereafter, 24 male Wistar rats were divided into 4 groups to evaluate the effect of the ointment in the treatment of periodontal disease induced by ligation in rats (Negative control group; Positive control group; 2.5% ointment group and 5% ointment group) containing 6 animals each. After induction of periodontal disease and after 11 days of treatment with *P. brasiliensis* ointment, the animals were euthanized and their jaws removed to obtain histological sections of the right and left lower first molars. Histometric evaluation was performed by quantifying the volume of the furcation injury region, which indicates the volume of inter-radicular alveolar bone loss in that region. Intra-group analysis revealed greater bone loss in teeth with ligature than in teeth that did not have ligature ($p < 0.05$), confirming the effectiveness of the model. However, the inter-group analysis did not reveal statistically significant differences in the volume of bone loss in the ligated teeth between the different experimental groups ($p > 0.05$). It is concluded that the ointment did not present toxicity to periodontal tissues and did not reduce the volume of furcation lesions.

Keywords: Periodontitis. Animal Experimentation. Wistar Rat. Phytotherapy. *Pseudobrickellia brasiliensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>	32
Figura 2 - Mesa operatória (vista frontal).....	43
Figura 3 - Mesa operatória (vista lateral)	44
Figura 4 - Instrumental	44
Figura 5 - Inserção do fio	45
Figura 6 - Aplicação da pomada.....	47
Figura 7 – Hemimandíbula do rato.....	48
Figura 8 - Calibração do software ImageJ.....	51
Figura 9 - Delimitação da área de furca	51
Figura 10 - Fotomicrografia HE, ensaio de toxicidade	54
Figura 11 - Fotomicrografia HE - perda óssea inter-radicular do grupo controle negativo	57
Figura 12 - Fotomicrografia HE - perda óssea inter-radicular do grupo controle positivo	58
Figura 13 - Fotomicrografia HE - perda óssea inter-radicular do grupo pomada a 2,5%	59
Figura 14 - Fotomicrografia HE - perda óssea inter-radicular do grupo pomada a 5%	60
Figura 15 - Fotomicrografia HE - comparação do volume de furca dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito	63
Gráfico 1 - Média do volume (mm ³) e desvio padrão da lesão de furca inter-radicular dos grupos com doença periodontal induzida.	56
Gráfico 2 - Média do volume (mm ³) e desvio padrão da lesão de furca inter-radicular nos dentes com ou sem ligadura de acordo com o grupo.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos animais do “ensaio de toxicidade oral tópica”	41
Tabela 2 - Descrição dos grupos experimentais (primeiros molares inferiores esquerdos)	46
Tabela 3 - Volume (mm ³) da lesão de furca dos grupos com doença periodontal induzida....	56
Tabela 4 - ANOVA <i>one way</i> na avaliação inter-grupo	57
Tabela 5 - Volume (mm ³) da lesão de furca dos grupos com doença periodontal induzida....	62
Tabela 6 - Teste T pareado da comparação intra-grupo	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIPq- Saúde	Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ERO	Espécies reativas de oxigênio
IL	Interleucina
Kg	Quilograma
LABIMUNO	Laboratório de Imunologia
LEB	Laboratório de ensaios biológicos
Linfócitos NK	Linfócitos <i>Natural Killer</i>
mm	Milímetro
MMP	Metaloproteinases da matriz
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Pseudobrickellia brasiliensis</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGE	Prostaglandina-E
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

LISTA DE SÍMBOLOS

α Alfa

β Beta

γ Gama

® Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Doença periodontal	23
2.1.1 Etiologia	24
2.1.2 Imunopatogênese	25
2.1.3 Tratamento	27
2.2 Plantas medicinais	28
2.2.1 A utilização das plantas medicinais na odontologia	29
2.2.2 A utilização das plantas medicinais na doença periodontal	29
2.2.3 Arnica	30
2.2.4 Pseudobrickellia brasiliensis	31
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo Geral	37
4.2 Objetivos específicos	37
5 METODOLOGIA	39
5.1 Animais utilizados e cuidados	39
5.2 Pseudobrickellia brasiliensis	39
5.3 Ensaio de toxicidade oral tópica e incorporação dos extratos	40
5.3.1 Preparação das pomadas de P. brasiliensis	40
5.3.2 Aplicação das pomadas	40
5.3.3 Análise da toxicidade	41
5.3.3.1 Avaliação macroscópica	41
5.3.3.2 Avaliação microscópica	41
5.4 Desenho experimental	42
5.4.1 Protocolo de anestesia e indução da periodontite	42
5.4.2 Descrição dos grupos experimentais	45
5.4.3 Protocolo de tratamento	46
5.4.4 Eutanásia e coleta do material biológico	47
5.4.5 Preparo histológico	48
5.4.6 Avaliação histométrica	50

5.5 Análise estatística	52
6 RESULTADOS.....	53
6.1 Análise da toxicidade	53
<i>6.1.1 Avaliação macroscópica.....</i>	<i>53</i>
<i>6.1.2 Avaliação microscópica</i>	<i>53</i>
6.2 Avaliação histométrica	55
<i>6.2.1 Avaliação inter-grupo</i>	<i>55</i>
<i>6.2.2 Avaliação intra-grupo</i>	<i>61</i>
7 DISCUSSÃO.....	67
8 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73
ANEXO A – CERTIFICADO CEUA.....	81

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais englobam um conjunto de doenças imuno-inflamatórias que afetam o tecido periodontal (gengiva, osso e ligamento periodontal) (CATON, 2018). As mais prevalentes são a gengivite e a periodontite (ARMITAGE, 2004). A gengivite é uma doença inflamatória crônica provocada pela disbiose do biofilme aderido ao dente e sua relação com as defesas imunológicas do hospedeiro. Se não tratada pode evoluir para a periodontite (KINANE, 2017), a qual apresenta alta prevalência global, sendo a 11ª doença mais prevalente ao redor do mundo (GBD, 2017).

Os sinais da periodontite incluem sangramento, supuração gengival, halitose, recessão gengival, perda óssea, espaçamentos dentários, mobilidade dentária, lesão de furca e podem culminar com a perda dentária (KINANE, 2017; JANAKIRAM, 2020).

A raspagem e alisamento radicular associado à profilaxia e orientação de higiene bucal, são considerados o padrão ouro no tratamento da periodontite (KINANE, 2017; DARVEAU, 2010). Paralelo a isso, outras terapias vem sendo pesquisadas para serem usadas como adjuvantes ao tratamento padrão, por exemplo, a fitoterapia (FREIRES, 2018; VASQUES, 2020), que consiste no uso de plantas medicinais, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas, cicatrizantes, antibióticas entre outras (BUENO, 2020).

A planta medicinal *Pseudobrickellia brasiliensis*, uma angiosperma endêmica do Brasil, conhecida como arnica do campo, tem sido usada na medicina popular devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e cicatrizantes (CARNEIRO, 2009; REIS; BELLINI, 2007; SOUZA, 2006). Além disso, estudos laboratoriais, *in vitro*, mostraram que esta planta possui ação anti-inflamatória e antibiótica (ALMEIDA, 2015; ALMEIDA, 2017; CARDOSO, 2020). Assim, no presente estudo foi avaliada a ação de uma pomada de extrato etanólico de folhas de *P. brasiliensis* no tratamento da doença periodontal induzida por ligadura em ratos.

Nossa hipótese alternativa é que o uso da pomada no tratamento da periodontite levaria a uma menor destruição do osso alveolar inter-radicular, resultando em um volume de lesão de furca menor do que aqueles animais não tratados com a pomada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença periodontal

O periodonto se refere a estruturas que ancoram e suportam os dentes no alvéolo, sendo parte desta estrutura o cemento, as fibras do ligamento periodontal, o osso alveolar e a gengiva (CHO, 2000). Logo, as doenças que afetam esses tecidos são denominadas de doenças periodontais.

A classificação atual das doenças periodontais de acordo com a Academia Americana de Periodontia e a Federação Europeia de Periodontia se divide em: saúde periodontal, gengivite induzida por biofilme, doenças gengivais não induzidas por biofilme, periodontite, doenças periodontais necrosantes, periodontite como manifestação de doenças sistêmicas e outras condições que afetam os tecidos periodontais (como abscessos, condições e deformidades muco-gengivais, forças oclusais traumáticas e fatores relacionados ao dente e às próteses) (CATON, 2018).

Entre as formas de doença periodontal induzidas por placa, a gengivite e a periodontite são as condições inflamatórias crônicas mais prevalentes (ARMITAGE, 2004). A gengivite, uma inflamação localizada na gengiva, apresenta-se clinicamente com sangramento. A periodontite pode ocorrer quando a gengivite não tratada progride para a perda da gengiva, osso e ligamento, causando as bolsas periodontais, podendo levar à perda do dente (KINANE, 2017).

Na gengivite, a forma mais branda da doença, o processo inflamatório é limitado ao epitélio e conjuntivo gengival e na periodontite, o infiltrado imunoinflamatório é profundo e resulta na destruição das estruturas periodontais que pode provocar a perda do dente (KINANE, 2017).

Em um estudo clássico, “*experimental gingivitis in man*” Løe e colaboradores (1965) demonstraram que a gengivite é iniciada e mantida pelos microorganismos presentes na placa bacteriana. Neste estudo, após a interrupção da escovação dentária dos participantes, a placa acumulou e a gengivite foi estabelecida, sendo que ao reestabelecer os procedimentos de higiene bucal, as gengivas voltaram a ser clinicamente saudáveis (LÖE, 1965).

As doenças periodontais são consideradas um problema de saúde pública, com alta prevalência, e ocuparam o 11º lugar do ranking das doenças mais prevalentes ao redor do mundo no ano de 2016 (GBD, 2017; JANAKIRAM, 2020). No Brasil, de acordo com o levantamento de saúde bucal de 2010, a prevalência de sangramento gengival aumenta dos 12

anos até a vida adulta (SAÚDE, 2012). A presença de cálculo dentário aumenta com a idade, atingindo a maior prevalência entre adultos, e a presença de bolsas periodontais rasas acomete aproximadamente $\frac{1}{4}$ dos adultos entre 35 a 44 anos e as bolsas profundas acometem cerca de 7% dos adultos de 35 a 44 anos (SAÚDE, 2012). A perda dentária, avaliada por sextantes (grupo de seis dentes) ausentes foi bastante expressiva nos idosos de 65 a 74 anos, os quais apresentaram 90,5% de sextantes excluídos (SAÚDE, 2012).

2.1.1 Etiologia

A gengivite e a periodontite são iniciados e sustentados pelos microrganismos do biofilme bacteriano (KINANE, 2017). O conceito de placa dentária é descrito como: “Uma comunidade de biofilmes polimicrobianos que se acumulam na superfície do dente e da raiz do dente. A placa também pode se tornar mineralizada e formar um cálculo” (DARVEAU, 2010, p.481). O conceito de “biofilme”, por sua vez, diz respeito a colônias de microrganismos encapsulados em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares que se adere às superfícies e protege a colônia de danos do ambiente (FLEMMING, 2016).

De acordo com a hipótese da placa inespecífica, a quantidade da placa bacteriana é responsável pela patogenicidade da doença periodontal, independente dos níveis de virulência das espécies bacterianas. Essa hipótese não considera que variações na composição da placa tenham implicações sobre o efeito patogênico da doença periodontal (THEILADE, 1986). De forma contrária, pela hipótese da placa específica, acredita-se que bactéria ou bactérias específicas seriam responsáveis pela etiologia da doença periodontal (LOESCHE, 1979). Posteriormente foram levantadas novas hipóteses para explicar a quebra da homeostase entre patógeno e hospedeiro e o surgimento da doença periodontal, como a “hipótese da placa ecológica” de Marsh (1994), e a “hipótese do patógeno-chave” de Hajishengallis (2012). A “hipótese da placa ecológica” correlaciona a disbiose com vários fatores, como o aumento do fluxo do líquido crevicular gengival, aumento da disponibilidade de nutrientes e maior pH bucal (MARSH, 1994). Segundo a hipótese da placa ecológica, essa mudança ambiental é responsável por uma mudança ecológica, levando a uma diminuição do número de bactérias anaeróbias facultativas e aumento do número de bactérias anaeróbias obrigatórias e com isso, promovendo o surgimento da doença periodontal (MARSH, 1994). Já a “hipótese do patógeno-chave” explica diversos mecanismos envolvidos na disbiose bacteriana induzida por *Porphyromona gingivalis*, considerado um patógeno-chave para a disbiose e surgimento da

doença periodontal (HAJISHENGALLIS, 2012). A se entender esse conceito “disbiose” como perda da homeostase entre hospedeiro e biofilme, promovendo um aumento do número de patógenos e diminuição do número de microrganismos simbióticos (DARVEAU, 2010).

Em um estudo sobre os complexos microbianos da placa subgingival, Socransky e colaboradores (1998) compararam a placa dentária de pacientes com e sem doença periodontal, mostrando a existência de complexos microbianos fortemente associados à doença periodontal e outros complexos com menor associação. Bactérias, do que foi denominado complexo vermelho, como a *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema denticola*, estavam mais associados ao aumento da profundidade de sondagem e do sangramento à sondagem da bolsa periodontal (SOCRANSKY, 1998). Entre os complexos bacterianos da placa subgingival humana, o estudo de Paster (2001) foi capaz de identificar 347 espécies bacterianas, algumas delas presentes em maior quantidade na microbiota do paciente periodontalmente doente em comparação com o indivíduo periodontalmente saudável. De fato, o biofilme microbiano bucal pode compreender cerca de 150 espécies em uma única pessoa, e até 800 espécies diferentes foram identificadas na placa dentária humana (LOURENÇO, 2014).

As mudanças na comunidade bacteriana da placa dentária, ou seja, a disbiose (mudança da microbiota comensal oral relacionada à saúde para um microbioma complexo patogênico associado à doença periodontal) é considerada um fator importante para a transição da saúde para a doença periodontal (KUMAR, 2006). Entretanto, os mecanismos responsáveis por manter uma estabilidade da placa bacteriana ou iniciar a disbiose ainda não estão completamente explicados na literatura (DARVEAU, 2010). Além disso, a presença do biofilme microbiano pode ser insuficiente para a patogênese da doença periodontal, sendo a disbiose da microbiota bucal que interage com as defesas imunológicas do hospedeiro ou a reação exagerada do sistema imune à presença microbiana a responsável pela progressão da doença (KINANE, 2017).

2.1.2 Imunopatogênese

Em um estudo que fundamentou a imunopatogênese da doença periodontal, Page e Schroeder (1976) discorreram sobre os eventos celulares dessa doença, por meio da análise histológica de modelos de periodontite natural ou induzida, em humanos e modelos experimentais. Assim, classificaram as lesões em quatro fases sequenciais (inicial, precoce, estabelecida e avançada), sendo as três primeiras relacionadas à gengivite e a última

relacionada à periodontite. Esses autores forneceram ainda um roteiro histopatológico dessas diferentes fases. Quarenta anos depois do estudo de Page e Schroeder, no ano de 2017, Hajishengallis e Korostoff reavaliaram esse modelo e pontuaram, em sua revisão, todos os aspectos atuais sobre a patogênese da doença periodontal e seus desdobramentos imunológicos, atualizando o conhecimento sobre a interação microbiota e hospedeiro e o papel da resposta imunológica nessa doença.

A disbiose do biofilme microbiano provoca a ativação das respostas imune inata e adaptativa, que estão intimamente ligadas à imunopatogênese da doença periodontal. Os leucócitos, as citocinas e outros mediadores inflamatórios estão presentes em uma relação complexa, e à medida que a doença progride, o número dessas células varia no tecido periodontal (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017).

A gengiva humana exibe gradientes de quimiocinas e moléculas de adesão que permitem a migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos e capilares para a fenda gengival, criando barreiras contra a invasão bacteriana (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017; RYDER, 2010). Apesar disso, os neutrófilos também estão relacionados à destruição do tecido periodontal se a disbiose provocada pelo desafio microbiano não puder ser controlada (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017). Esse conjunto de células, portanto apresenta função secretora de enzimas antimicrobianas, com funções citotóxicas, além de desempenhar funções regulatórias especializadas, por meio da regulação de linfócitos T e B, células dendríticas, macrófagos e linfócitos NK (FINE, 2016; PELLETIER, 2010; HUARD, 2008; MANTOVANI, 2011; SCAPINI, 2014). Além disso, os neutrófilos são responsáveis por danos teciduais diretos ao tecido conjuntivo periodontal, devido à liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e metaloproteinases da matriz (MMP) (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017).

Os macrófagos estão em pequena quantidade no tecido periodontal saudável. Contudo, sua concentração aumenta no tecido periodontal doente e respondem a uma variedade de antígenos microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS) e a partir daí atuam na sua função de fagocitose, a fim de eliminar os patógenos, e de regulação (KORNMAN, 1997; KIM, 2015). Os macrófagos também induzem danos ao tecido conjuntivo devido à liberação das citocinas TNF, IL-1, PGE-2 e MMP. Outra função importante dos macrófagos é a eferocitose de neutrófilos na fase de resolução da inflamação (BAEZA, 2015; GRAVES, 2008; MOSSER, 2008).

Os linfócitos T também são células importantes na imunopatogênese da doença periodontal. Dividem-se em vários subtipos e podem apresentar função protetora e outras

vezes promovem danos ao tecido periodontal (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017). As linhagens Th1 e Th2 do linfócito TCD4+ desempenham papel incerto na periodontite, com funções tanto protetoras quanto destrutivas para o tecido periodontal. Os linfócitos Th17 podem contribuir para a perda óssea inflamatória na doença periodontal devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-17. Já a linhagem Treg está associada à imunossupressão e regulação da resposta inflamatória e podem contribuir para a proteção da perda óssea devido à liberação de citocinas regulatórias como a IL-10 e o TGF- β (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017; KORN, 2009;).

Os linfócitos B e os plasmócitos são as células mais comuns no periodonto dos pacientes com periodontite crônica. Contudo, a função exata dessas células na imunopatogênese da doença periodontal ainda não é conhecida por completo. Essas células apresentam diversas funções imunológicas, que vão além da produção de anticorpos pelos plasmócitos (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017; THORBERT-MROS, 2015). Os anticorpos também desempenham importante função na imunidade humoral, pois reduzem o desafio microbiano por meio de vários mecanismos (como a inibição da colonização bacteriana, ativação do sistema do complemento, opsonização bacteriana e neutralização de toxinas e enzimas). As células da linhagem B também estão envolvidas na apresentação de antígenos para os linfócitos T, expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, MMP, colagenases e RANKL, contribuindo para a degradação óssea alveolar e desempenhando um papel ativo na imunopatogênese da doença periodontal (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017; BERGLUNDH, 2005; FUJIHASHI, 1993).

Outro mecanismo importante na imunopatogênese da doença periodontal refere-se à destruição do tecido ósseo pela ação direta dos osteoclastos, que é controlada pela expressão do eixo de proteínas osteoprotegina-RANK-RANKL. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF e IL-17 produzidas pelos linfócitos T, B e osteoblastos estão associadas à expressão acentuada de RANKL, que promove aumento na ativação dos osteoclastos com consequente perda óssea (HAJISHENGALLIS; KOROSTOFF, 2017).

2.1.3 Tratamento

A fim de elucidar os possíveis tratamentos para as doenças periodontais, devem-se considerar as doenças mais prevalentes, ou seja, a gengivite e a periodontite provocadas pela placa. Assim, o objetivo do tratamento é restaurar a homeostasia entre o hospedeiro e a microbiota da placa. Para isso o tratamento mais antigo e eficaz constitui na raspagem e

alisamento radicular. A raspagem e o alisamento radicular visam remover os depósitos de placa e cálculos aderidos à superfície dentária (DARVEAU, 2010). Além disso, no manejo do paciente com doença periodontal, após a anamnese e montagem do plano de tratamento, a raspagem e alisamento radicular deve ser associada à remoção ou controle dos fatores de risco modificáveis, como por exemplo, o tabagismo, bem como às orientações de higiene bucal e o adequado acompanhamento do paciente (KINANE, 2017).

Com finalidade terapêutica, a raspagem e alisamento radicular podem ser realizados de maneira cirúrgica ou não cirúrgica, com instrumentos manuais (como curetas) ou automatizados com instrumentos ultrassônicos. Além do controle de placa que deve ser alcançado com a profilaxia profissional e controle de placa pelo paciente, por meio da escovação e uso de fio dental (KINANE, 2017). Outros tipos de tratamentos, como a associação da raspagem e alisamento radicular com a antibioticoterapia local ou sistêmica também são usados no controle das doenças periodontais (DARVEAU, 2010; KINANE, 2017). A antibioticoterapia, tanto local, quanto sistêmica é apresentada em diferentes tipos de protocolos, com diversos antimicrobianos disponíveis no mercado e com posologias diferentes (KINANE, 2017).

Por fim, diversos tipos de tratamentos são pesquisados e propostos de maneira adjuvante à raspagem e alisamento radicular, no controle das doenças periodontais, como a vacinação contra patógenos específicos (como o *P. gingivalis*), a modulação da resposta sistêmica do hospedeiro por meio do uso da antibioticoterapia em dose sub-antimicrobiana, a laserterapia com o uso de laser Er: YAG e o uso de probióticos (MIYACHI, 2007; CATON, 2000; YUKNA, 2007; PELEKOS, 2019).

Existe ainda a possibilidade do tratamento fitoterápico, que vem sendo pesquisado em vários campos da ciência, inclusive como adjuvante para o tratamento da doença periodontal (FREIRES, 2018; VASQUES, 2020).

2.2 Plantas medicinais

Segundo a organização mundial de saúde (OMS), as plantas medicinais são vegetais que possuem, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos e/ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (OMS, 1998).

Plantas com propriedades medicinais são consideradas os primeiros remédios da humanidade e muitas dessas plantas são usadas a fim de aproveitar suas propriedades antissépticas, anti-inflamatórias, analgésicas e antibióticas (BUENO, 2020).

As plantas medicinais são importantes na pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos, seja por meio da utilização direta dos seus constituintes, ou não. Algumas vezes essas plantas servem como material de partida para a síntese de novos medicamentos (OMS, 1998).

Diversos fármacos se originaram de plantas medicinais, como a aspirina, derivada do ácido salicílico extraído da casca do salgueiro (*Salix sp.*), ou a morfina, isolada do ópio extraído de sementes de papoula (*Papaver somniferum*) (BUENO, 2020).

Estima-se que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento faça uso de plantas medicinais na medicina tradicional, mostrando que o crescimento da indústria farmacêutica não diminuiu a importância do uso dessas plantas em muitas sociedades (OMS, 1998).

2.2.1 A utilização das plantas medicinais na odontologia

Existem diversos exemplos de como as plantas medicinais estão relacionadas com a manutenção da saúde bucal por algumas populações.

Com a finalidade de limpeza dos dentes e gengiva, o uso da goiabeira (*Psidium guajava L. var. pomifera*) e do fumo (*Nicotiana tabacum L.*) foi observado em uma comunidade do Mato Grosso, Brasil (BORBA, 2006). Também com o objetivo de limpeza da cavidade bucal, comunidades originárias da Ásia, África e Oriente Médio, utilizaram por centenas de anos uma espécie de escovas de dente natural, conhecida como *Miswak*, um bastão de mascar derivado da árvore *Salvadora persica* (WU, 2001).

Com finalidade analgésica para o controle da dor de dente, diversas plantas são empregadas na medicina tradicional, como a sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides H.B.K.*), o gerbão (*Stachytarpheta elattior Schult.*), o freixo espinhoso, conhecido como a “árvore da dor de dente” (*Zanthoxylum americanum*) e o álamo (*Populus alba*) (BORBA, 2006; RING, 1998).

2.2.2 A utilização das plantas medicinais na doença periodontal

Especificamente na terapia da doença periodontal, existem relatos da utilização das plantas medicinais na prevenção da reabsorção óssea alveolar, tais como o alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), a aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*) (BOTELHO, 2007b) e, ainda, a *Ginkgo biloba* (SEZER, 2013). O uso do canabidiol (CBD) e do extrato de

Mikania laevigata (MLE) (popularmente conhecido no Brasil como “guaco”) foram testados em modelo experimental de periodontite em ratos. A análise morfométrica da perda óssea alveolar demonstrou que os animais tratados com CBD e MLE apresentaram diminuição da perda óssea (NAPIMOGA, 2008; BENATTI, 2012).

O estudo de Freires (2018) revisou a literatura sobre o efeito protetor de produtos naturais na reabsorção óssea promovida pela doença periodontal induzida em ratos e verificou que os extratos de *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Ginkgo biloba* e própolis foram os que apresentaram melhores resultados. Também foram citadas a andiroba (*Carapa guianensis*), a erva baleeira (*Cordia verbenacea*), o sambacaitá (*Hyptis pectinata*) e a dama da noite (*Ipomoea alba* L) (FREIRES, 2018).

Os géis de mangostão (*Garcinia mangostana*) e de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) apresentaram efeito protetor no tratamento da doença periodontal (RASSAMEEMASMAUNG, 2008; BOTELHO, 2016). Assim como a utilização de extratos de semente de uva (*Vitis vinífera*) e de chá verde de folhas de *Camellia sinensis*, e da utilização de um chip de *Azadirachta indica* (HOUDE, 2006; DE ALMEIDA, 2019; VENNILA, 2016).

O controle da placa dentária por meio do uso de diferentes tipos de enxaguantes bucais, dentifrícios e gomas de mascar produzidos com produtos naturais vem sendo pesquisado (VASQUES 2020). Enxaguantes de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), Triphala (combinação de extrato de *Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* e *Emblica officinalis*), romã (*Punica granatum*) e *Punica granatum* var. *pleniflora* foram pesquisados no controle da placa (BOTELHO, 2007a; BAJAJ, 2011; PEREIRA, 2006; SEDIGH-RAHIMABADI, 2017). Assim como o emprego de dentifrícios de *Scutellaria baicalensis* e de *Aloe vera* (ARWEILER, 2011; PRADEEP, 2012a) e de gomas de mascar de *Magnólia officinalis*, mástique (derivada das folhas de *Pistacia lentiscus*) e *Eucalyptus globulus* (GREENBERG, 2007; TAKAHASHI, 2003; NAGATA, 2008).

2.2.3 *Arnica*

Originalmente “Arnica” refere-se a um gênero da família Asteraceae, no qual estão presentes mais de 32 espécies originárias da Europa e do oeste da América do Norte, entre elas, a *Arnica montana* L., planta que tem sido utilizada na medicina popular e estudada no campo científico, devido ao seu potencial anti-inflamatório (WOLF; DENFORD, 1984; BLUMENTHAL, 1998). No Brasil diversas plantas ficaram popularmente conhecidas como

arnica, devido à chegada dos colonizadores europeus que procuraram por espécies de plantas com características anti-inflamatórias tópicas similares à da *Arnica montana* L. (SEMIR, 2011).

Athayde (2019) fez a comparação anatômica e química em uma revisão da literatura das principais plantas popularmente conhecidas como “arnica” encontradas no Brasil, sendo elas: “*Calea uniflora* Less. (arnica-da-praia), *Chaptalia nutans* (L.) Polák (arnica-língua-de-vaca), *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica-da-serra), *Lychnophora diamantinana* Coile & S.B.Jones (arnica-da-serra), *Lychnophora pinaster* (arnica-da-serra) Mart. e *Lychnophora salicifolia* Mart. (arnica-falsa, arnica-do-cerrado), *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. (arnica-paulista, arnica-da-praia), *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) R.M.King & H.Rob. (arnica-do-campo, arnica-do-mato), *Solidago chilensis* Meyen (arnica-brasileira, arnica-do-campo) e *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski (arnica-do-mato)” (ATHAYDE, 2019, p. 402), produzindo informações sobre os aspectos anatômicos e morfológicos, bem como do perfil químico dos extratos destas plantas, contribuindo para identificação precisa e controle de qualidade das arnicas.

2.2.4 *Pseudobrickellia brasiliensis*

A *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) R.M.King & H.Rob. da família Asteraceae, é uma angiosperma endêmica no Brasil. Está distribuída geograficamente por grande parte do território brasileiro, sendo encontrada nas vegetações de Campinarana, Campo Rupestre e Cerrado (NAKAJIMA, 2015). A *P. brasiliensis* está presente de maneira confirmada no norte (Pará, Rondônia e Tocantins), nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí), centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e sudeste (Minas Gerais, São Paulo) do território brasileiro (NAKAJIMA, 2015).

Hattori e Nakajima classificaram esta planta como: “Subarbusto com 1,3 metros de altura; ramos cilíndricos, costados, glabros. Folhas simples, alternas, densamente espiraladas, sésseis, limbo 9–21 × 0,5 mm, linear; ápice agudo, margens ciliadas, base obtusa; ambas as faces glabras. Capítulos discóides, pedunculados, em corimbos; involúcro campanulado, 4–6 mm comprimento, 1,5– 3 mm diâmetro.; brácteas involucrais 13, 4-seriadas, 2–6 × 1–1,5 mm, lanceoladas, ápice agudo, margens inteiras, glabras; receptáculo plano, epaleáceo, glabro. Flores 5, creme, monóclinas, corola tubulosa, tubo 4–4,5 mm comprimento, 1,2 mm diâmetro, internamente glabro, fauce infundibuliforme, lobos 1 × 0,4 mm, glabros; anteras com apêndice apical obtuso, base obtusa; ramos do estilete clavelados,

curto-papilosos, ápice arredondado, sem pilosidade abaixo do ponto de furca. Cipsela cilíndrica, 2,5–3 mm comprimento, 0,9 mm diâm., setosa, 10-costada, costas ciliadas; papilho cerdoso, 2-seriado, série interna 5 mm, série externa 1,2 mm.” (HATTORI; NAKAJIMA, 2008, p.731).

A *P. brasiliensis* é denominada popularmente como arnica, arnica do campo e arnica do mato (CARNEIRO, 2009; REIS; BELLINI, 2007; RIBEIRO, *et al.*, 2001 SOUZA, 2006). O trabalho de Reis e Bellini (2007) mostrou o conhecimento de populações ribeirinhas às margens dos rios Paraná-PR e Cuiabá-MT, em relação às plantas medicinais. De acordo com esse estudo, aquelas populações usavam a *P. brasiliensis* na forma de planta inteira macerada ou curtida no álcool, para a cura de feridas. Também foi relatado o uso das folhas e caule para tratamento de dores no corpo, devido ao seu possível potencial anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante (CARNEIRO, 2009; REIS; BELLINI, 2007; SOUZA, 2006).

Figura 1 - *Pseudobrickellia brasiliensis*



Fonte: adaptado de Almeida, 2015.

Bohlmann (1984), provavelmente no primeiro estudo que avaliou os constituintes químicos da *P. brasiliensis*, identificou triterpenos e sesquiterpenos, como o hidroxigermacreno, lupeol e seu isômero, acetato de β -amirina, espatulenol, cadineno, cadinol, oplopanona, acetato de α -acetoxi- β -amirina. Posteriormente os compostos químicos do óleo essencial desta planta foram avaliados, sendo encontrados 34 compostos, entre eles, em maiores quantidades, o terpinen-4-ol, γ -terpineno, α -terpineno e α -terpineol, sendo os terpenos considerados os prováveis responsáveis pela atividade anti-inflamatória dessa planta

(SILVA, 2015). Alguns terpenóides como o ácido caurenóico e os triterpenos lupeol, α -amirina, β – amirina e taraxasterol, foram identificados na *P. Brasiliensis* e podem estar relacionados ao uso terapêutico da planta; entretanto, mais estudos fitoquímicos e pesquisas em atividade farmacológica são necessários para validar seu uso (DE AMORIM, 2016).

Em um estudo de caracterização fitoquímica, foram identificados α -amirina, acetato de α -amirina, β -amirina, acetato de β -amirina, lupeol, acetato de lupeol, pseudotaraxasterol e taraxasterol (triterpenos) e o ácido caurenóico (diterpeno) como constituintes da planta (DE AMORIM, 2016). Almeida (2015) e (2017) analisou a composição química e correlacionou-a com os efeitos terapêuticos, atividade anti-inflamatória e cicatricial, da *P. brasiliensis* em seu estudo *in vitro*. O extrato aquoso dessa planta exerceu forte ação inibitória na produção de citocinas pró-inflamatórias em linfócitos T e os extratos etanólicos das folhas, flores e caule da *Pseudobrickellia brasiliensis* exerceram atividades anti-inflamatória, diminuindo a expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-2 em linfócitos e monócitos do sangue periférico de humanos (ALMEIDA, 2015; ALMEIDA, 2017).

Em um estudo inédito, foi demonstrado *in vitro*, o potencial antimicrobiano da *P. brasiliensis*, presente nos extratos etanólicos de folhas e caules dessa planta e também a atividade antimicrobiana e enzimática das bactérias endofíticas isoladas da planta (CARDOSO, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

A periodontite, sendo um problema de saúde pública, apresenta impactos pessoais, devido aos seus efeitos intraorais, impactos na qualidade de vida, além do impacto financeiro pessoal e da carga econômica global gerada pelo tratamento dessa doença (JANAKIRAM, 2020).

O modelo de indução da periodontite em roedores é muito útil para o estudo dessa patologia. Entre os diversos modelos de indução da periodontite em ratos, a colocação de uma ligadura ao redor de um dente molar é amplamente utilizado (SANTANA, 2016) e tem sua eficácia comprovada (GONÇALVES, 2002). O epitélio oral e epitélio juncional, as fibras colágenas periodontais, o cimento e o osso são semelhantes entre o rato e o humano (PAGE & SCHROEDER, 1982). A diferença está no epitélio sulcular, que é queratinizado nos ratos e não queratinizado nos humanos (PAGE & SCHROEDER, 1982).

Aliado ao modelo de estudo, optamos pelo tratamento com a fitoterapia, que tem sido estudada no tratamento das doenças periodontais, como no tratamento da gengivite e da periodontite (FREIRES, 2018; VASQUES, 2020).

Devido à importância do estudo das plantas medicinais, principalmente das espécies endêmicas do Brasil, decidimos estudar a *Pseudobrickellia brasiliensis*, popularmente conhecida como arnica do campo (CARNEIRO, 2009).

Ao buscar pelo nome dessa planta nas bases de dados científicas, como o MEDLINE (via Pubmed) e na literatura cinzenta, por meio do Google Scholar, poucas referências são encontradas, sendo a maioria dessas, estudos de etnobotânica e de levantamento florístico (CARNEIRO, 2009; NAKAJIMA, 2015; REIS; BELLINI, 2007; SOUZA, 2006). Também foram localizados poucos estudos *in vitro*, caracterizando os componentes químicos ou avaliando os efeitos terapêuticos da *Pseudobrickellia brasiliensis* (ALMEIDA, 2017; ATHAYDE, 2019; BOHLMANN 1984; CARDOSO, 2020; DE AMORIM, 2016; OTTONI, 2019; SILVA 2015). Além disso, nenhum estudo sobre os efeitos da *Pseudobrickellia brasiliensis* em modelo experimental de periodontite induzida foi encontrado.

Assim, o presente estudo se justifica haja vista a existência de relatos sobre o uso popular dessa planta e, ainda, alguns resultados obtidos em estudos *in vitro* sobre sua atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (ALMEIDA, 2015; ALMEIDA, 2017; CARDOSO 2020).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da pomada de extrato etanólico de folhas da *Pseudobrickellia brasiliensis* sobre a perda óssea em lesão de furca em casos de periodontite induzida por ligadura em ratos wistar.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar ensaio de toxicidade oral tópica da pomada do extrato etanólico de folhas de *P. brasiliensis*.
- Realizar a análise histométrica da lesão de furca inter-radicular dos primeiros molares inferiores esquerdos de ratos com periodontite induzida por ligadura após o tratamento com pomada de extrato etanólico de folhas de *P. brasiliensis* em diferentes concentrações, bem como em animais sem tratamento ou tratados com vaselina sólida (veículo da pomada).
- Comparar os resultados histométricos entre os grupos com doença periodontal induzida (primeiros molares inferiores esquerdos) com os grupos sem doença periodontal induzida (primeiros molares inferiores direitos).

5 METODOLOGIA

5.1 Animais utilizados e cuidados

Foram utilizados ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Wistar, provenientes do biotério setorial do Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde da UFVJM (CIPq- Saúde). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas éticas regidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFVJM (CEUA/UFVJM) sob o número 048/2019 (Anexo A).

Os animais foram mantidos no biotério setorial do CIPq-Saúde em caixas plásticas de polipropileno com dimensões de 41x34x16cm, forradas com maravalha e receberam ração padrão para roedores e água filtrada *ad libitum*. As caixas contendo os roedores foram alocadas em gabinetes fechados, com sistema de ventilação, exaustão e ciclos claro/escuro de 12 horas em sala climatizada com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Para manter adequadas as condições de higiene, duas vezes por semanas as caixas eram lavadas, a maravalha e a água substituídas e o nível de ração completado.

Foram utilizados 28 ratos, com idade de 8 semanas e peso médio de 250 g. Quatro animais foram utilizados para a realização do ensaio de toxicidade oral tópica e 24 animais foram utilizados na realização do experimento de avaliação histométrica.

5.2 *Pseudobrickellia brasiliensis*

O extrato etanólico das folhas de *P. brasiliensis* utilizado neste trabalho foi cedido pela professora Dra. Valéria Gomes de Almeida, do departamento de farmácia da UFVJM, referente a um trabalho prévio (ALMEIDA, 2017). A autorização da coleta da espécie vegetal encontra-se registrada no Ministério do Meio Ambiente (MMA) sob o número 35605-1 e teve sua identificação botânica realizada pelo Herbário Dendrológico Jeanini Felfili (HDJF) UFVJM, onde as exsiccatas foram depositadas sob os números de registro 2819, 2820 e 2821 (ALMEIDA, 2017).

5.3 Ensaio de toxicidade oral tópica e incorporação dos extratos

Na busca de uma dose segura (não tóxica) para a aplicação dos extratos, os pesquisadores consideraram, a partir dos resultados dos testes, aquela dose que não provocou irritações tóxicas e teciduais.

O ensaio da toxicidade oral tópica foi realizado segundo as diretrizes propostas no trabalho de Kimoto (2016), que avaliou a irritação da mucosa de ratos. Para este ensaio foram necessários quatro animais, conforme descrito na tabela 1 do item 5.3.3. O extrato foi diluído a 2,5% e 5%, levando em consideração a metodologia de Botelho (2007b), que utilizou uma preparação de gel contendo óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) a 0,5% e outro gel contendo extrato fluido de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) a 5%.

5.3.1 Preparação das pomadas de *P. brasiliensis*

Para a preparação da pomada, o extrato etanólico das folhas da *P. brasiliensis* foi incorporado em vaselina sólida (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil), conforme descrito no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011), nas concentrações de 2,5% e 5%.

Inicialmente foi realizada a pesagem dos extratos em uma balança de precisão (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil), a fim de determinar a quantidade total de extrato disponível e a pesagem da vaselina sólida. O extrato e a vaselina foram então incorporados com a utilização de um grau e pistilo de vidro (Loja Synth, São Paulo, SP, Brasil). A fim de recuperar toda a quantidade da pomada do extrato incorporado em vaselina, foi utilizada uma espátula de silicone (Tramontina, Carlos Barbosa, RS, Brasil) que permitiu a raspagem da pomada de todas as paredes do grau de vidro. Por fim, as pomadas foram armazenadas em potes de polipropileno, cor branca com fundo falso e capacidade para 30 gramas (Embagel, São Paulo, SP, Brasil). Os potes utilizados são específicos para a embalagem de pomadas, garantindo a impermeabilidade à luz. A fim de preservar as pomadas por mais tempo, as mesmas foram mantidas em geladeira (Consul, São Bernardo do Campo, SP, Brasil).

5.3.2 Aplicação das pomadas

As aplicações das pomadas foram realizadas três vezes ao dia, com um intervalo de 4 horas entre as aplicações, às 7h, 11h e 15h, durante um período de 11 dias consecutivos

(BOTELHO, 2007b). Foi utilizado um micro aplicador descartável extrafino (FGM, Joinville, SC, Brasil) para a aplicação das pomadas.

5.3.3 Análise da toxicidade

As análises de toxicidade consistiram na observação de alterações macroscópica e microscópica do tecido gengival, no local da aplicação da pomada.

Tabela 1 - Descrição dos animais do “ensaio de toxicidade oral tópica”

Animais (n4)	Descrição
1.	Animal controle, sem aplicação da pomada.
2.	Animal com aplicação da vaselina (veículo da pomada).
3.	Animal com a aplicação da pomada de <i>P. brasiliensis</i> a 2,5%
4.	Animal com a aplicação da pomada de <i>P. brasiliensis</i> a 5%.

5.3.3.1 Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica foi classificada como: negativa, leve vermelhidão, descamação, secura, tecido áspero e quebradiço e pequenas feridas, rachaduras e sangramento. A classificação “negativa” recebeu a pontuação zero, “leve vermelhidão, descamação, secura” foi pontuado em 1, “tecido áspero e quebradiço e pequenas feridas” foi pontuado em 2 e “rachaduras e sangramento” foi pontuado em três. Nesta avaliação foi utilizado o escore de 0 a 3, sendo considerada não irritante (escore 0), irritante muito leve (>0 a $<0,4$), irritante leve ($\geq 0,4$ a <1), irritante moderado (≥ 1 a <2) e irritante severo (≥ 2) (KIMOTO, 2016). A avaliação macroscópica foi realizada no último dia, antes da eutanásia dos animais e consistiu na comparação da mucosa normal do animal controle (sem tratamento) com os outros animais (tratado com vaselina ou com as pomadas de *P. brasiliensis* a 2,5% e 5%).

5.3.3.2 Avaliação microscópica

Na avaliação microscópica (histológica) foi analisado o tecido gengival vestibular do primeiro molar inferior esquerdo de cada animal. Nessa avaliação, os pesquisadores procuraram por alterações da normalidade desse epitélio, o que sugere toxicidade da

substância na dose testada. Essas alterações, que poderiam ou não estar presentes, incluem mudança na morfologia celular, estreitamento ou espessamento do epitélio, ulceração, hiperqueratose e exacerbação do infiltrado imuno-inflamatório, entre outros (KIMOTO, 2016).

Após a remoção da gengiva vestibular do primeiro molar inferior esquerdo, as mesmas foram identificadas e fixadas em solução de formol 10% por 48 horas. Posteriormente foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Depois disso as peças foram cortadas com o auxílio de um micrótomo e coradas com os corantes hematoxilina e eosina. Por fim, as lâminas foram analisadas em um microscópio óptico (ZEISS® primo star, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera para microscópio (ZEISS®, AxioCam ERc 5s, Oberkochen, Alemanha) em um aumento de 4 vezes.

5.4 Desenho experimental

5.4.1 Protocolo de anestesia e indução da periodontite

Anterior à colocação do fio para a indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados e sedados, por injeção intraperitoneal com seringa hipodérmica descartável de 1,0 ml (Descarpack, São Paulo, SP, Brasil), contendo solução composta de cloridrato de cetamina 5% (GENÉRICO - Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda, Itatiaia, RJ, Brasil) e cloridrato de xylazina 2% (XILAZIN® 2% - Syntec do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) nas doses de 60 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente.

Para a indução da doença periodontal por meio da colocação de ligadura, o fio de algodão foi inserido no colo do primeiro molar inferior esquerdo de cada animal. Seguindo as diretrizes de Santana (2016), os animais foram posicionados em uma mesa operatória, em decúbito ventral. Na extremidade da mesa, os incisivos superiores eram mantidos posicionados em um arco de metal e os incisivos inferiores eram mantidos em posição por meio de um elástico fino (Mamuth, São Paulo, SP, Brasil), o que permitiu uma maior facilidade na abertura bucal dos mesmos (Figuras 2 e 3). Foi utilizada uma agulha para sutura modificada, para que fosse usada somente a ponta ativa da agulha (PROCARE®, Lamedid, São Paulo, SP, Brasil), onde mantivemos a ponta e descartamos o restante da agulha para sutura (figura 4). Para efetuar o espaçamento interdental necessário, inserimos a ponta ativa da agulha modificada entre o primeiro e o segundo molar do rato, com o auxílio do porta agulhas Mathieu (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil). Ao mesmo tempo em que a agulha era inserida pela ameia vestibular, a espátula de inserção de fio retrator (Golgran, São

Caetano do Sul, SP, Brasil) foi utilizada para criar um anteparo na região lingual dos molares. Após inserir a ponta ativa da agulha, o fio de algodão número 40 (COATS Correntes, São Paulo, SP, Brasil) foi inserido com auxílio de uma pinça hemostática Kelly curva (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) e um porta agulha Mathieu, que levaram o fio de algodão para a distal do primeiro molar inferior. Ao mesmo tempo em que o fio foi inserido entre a distal do primeiro molar e a mesial do segundo molar, a agulha para sutura modificada foi removida da região interdental, criando o espaço para a inserção do fio até o colo do primeiro molar. Depois de inserido o fio, o mesmo foi trazido para a face mesial do primeiro molar, passando pela vestibular e lingual e em seguida foi realizado um nó no fio, na face mesial do dente molar. Logo em seguida, as extremidades (excessos), do fio foram cortadas com uma tesoura Íris de ponta reta (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) e descartadas. A figura 4 mostra o instrumental utilizado para a inserção do fio. A figura 5 mostra o fio de algodão inserido no colo do primeiro molar inferior esquerdo do rato.

Figura 2 - Mesa operatória (vista frontal)



Animal posicionado na mesa operatória para a inserção do fio. Vista frontal.

Fonte: Arquivo pessoal.

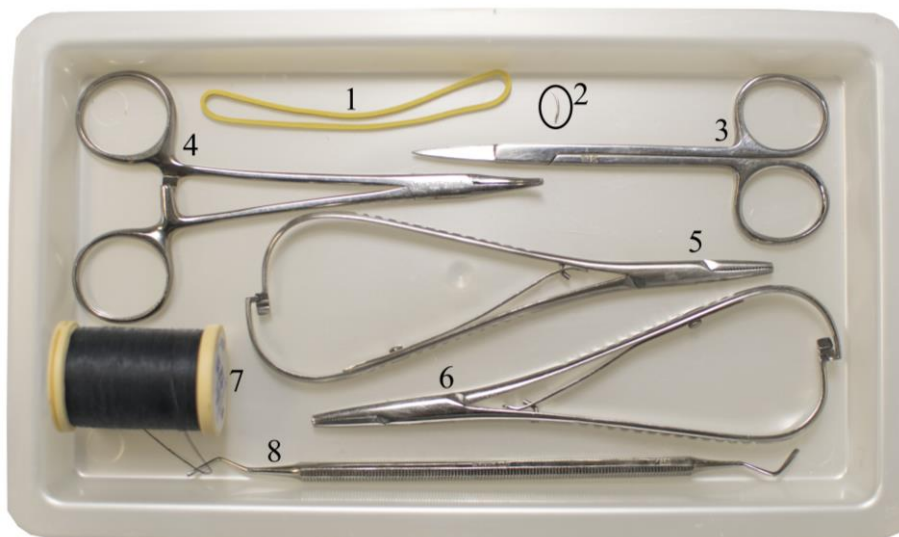
Figura 3 - Mesa operatória (vista lateral)



Animal posicionado na mesa operatória para inserção do fio. Vista lateral.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 4 - Instrumental



Instrumental utilizado durante o procedimento de indução da doença periodontal no rato. Elástico fino (1), agulha para sutura modificada (circulada) (2), tesoura Íris de ponta reta (3), pinça hemostática Kelly curva (4), porta agulha Mathieu (5 e 6), fio de algodão número 40 (7) e espátula de inserção de fio retrator (8).

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5 - Inserção do fio



Animal posicionado na mesa operatória, com o fio de algodão inserido no colo do primeiro molar inferior esquerdo.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.4.2 Descrição dos grupos experimentais

Após os resultados do ensaio de toxicidade oral tópica, 24 animais foram distribuídos, de forma randomizada, em quatro grupos contendo seis animais (n=06), conforme descrito na tabela 2.

A doença periodontal foi induzida no primeiro molar inferior do lado esquerdo de cada animal, por meio da colocação de ligadura de fio de algodão número 40. O dente contralateral, ou seja, o primeiro molar inferior direito (sem indução da doença periodontal) de cada animal serviu como controle intra-grupo. As análises inter-grupo foram realizadas pela comparação entre os quatro grupos do lado esquerdo, conforme descrito (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição dos grupos experimentais (primeiros molares inferiores esquerdos)

Grupos (n24)	Descrição
Controle negativo (CN)	Com indução da doença periodontal e sem tratamento.
Controle positivo (CP)	Com indução da doença periodontal e tratado com o veículo da pomada (vaselina).
Teste pomada a 2,5% (2.5)	Com indução da doença periodontal e tratado com a pomada contendo o extrato etanólico de folhas de <i>P. brasiliensis</i> a 2,5%.
Teste pomada a 5% (5)	Com indução da doença periodontal e tratado com a pomada contendo o extrato etanólico de folhas de <i>P. brasiliensis</i> a 5%.

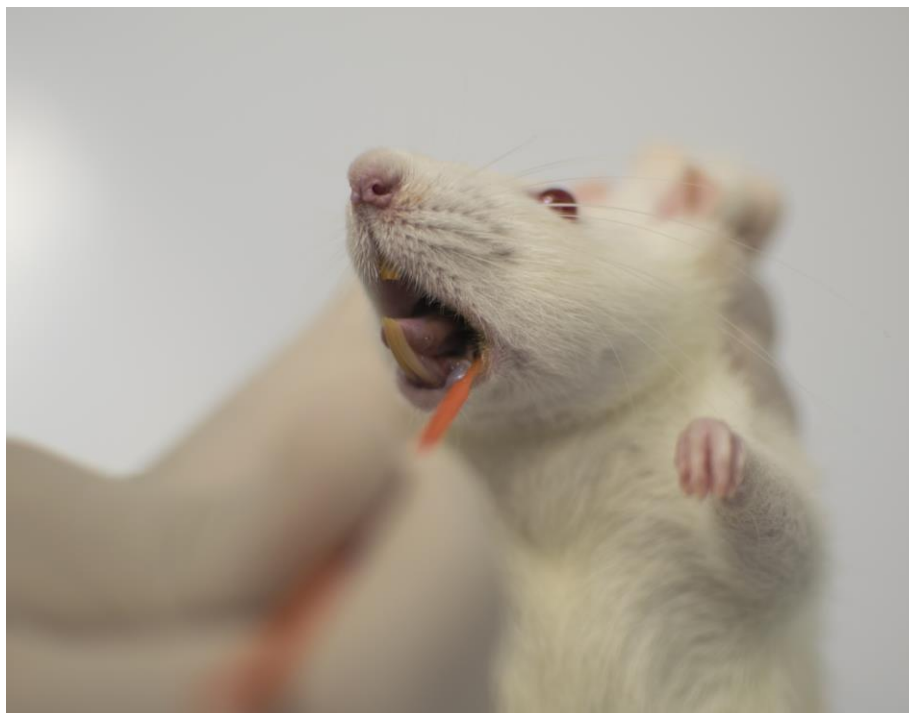
5.4.3 Protocolo de tratamento

Para o tratamento dos grupos “controle positivo”, “teste pomada a 2,5%” e “teste pomada a 5%”, foi seguida a metodologia de Botelho (2007b), da aplicação da vaselina ou pomada por um período de 11 dias.

Foram realizadas três aplicações diárias, com um intervalo de 4 horas entre cada aplicação e um intervalo maior da última aplicação do dia para a primeira aplicação do próximo dia. Assim, as aplicações foram realizadas às 7h, 11h e 15h, diariamente.

Durante o procedimento de aplicação tópica das pomadas ou vaselina, não houve a necessidade de anestesia prévia dos animais, mas somente a imobilização dos mesmos, conforme mostrado na figura 6. Tanto a pomada de *P. brasiliensis* quanto a vaselina sólida (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) foram aplicadas com a utilização de um microaplicador descartável extrafino (FGM, Joinville, SC, Brasil). A quantidade de pomada em cada aplicação foi de aproximadamente 0,2 mg.

Figura 6 - Aplicação da pomada



Contenção manual do animal e aplicação da pomada

Fonte: Arquivo pessoal.

5.4.4 Eutanásia e coleta do material biológico

Após 11 dias de aplicação da vaselina ou pomada, os animais foram anestesiados e passaram pelo procedimento de decapitação por guilhotina e por fim tiveram suas hemimandíbulas coletadas. Nota-se que no primeiro dia do experimento, houve a indução da doença periodontal nos ratos e somente no dia seguinte se iniciou a aplicação da vaselina ou das pomadas, computando 11 dias de aplicação. Depois disso, os animais foram eutanasiados no dia seguinte (13º dia a partir do início do experimento).

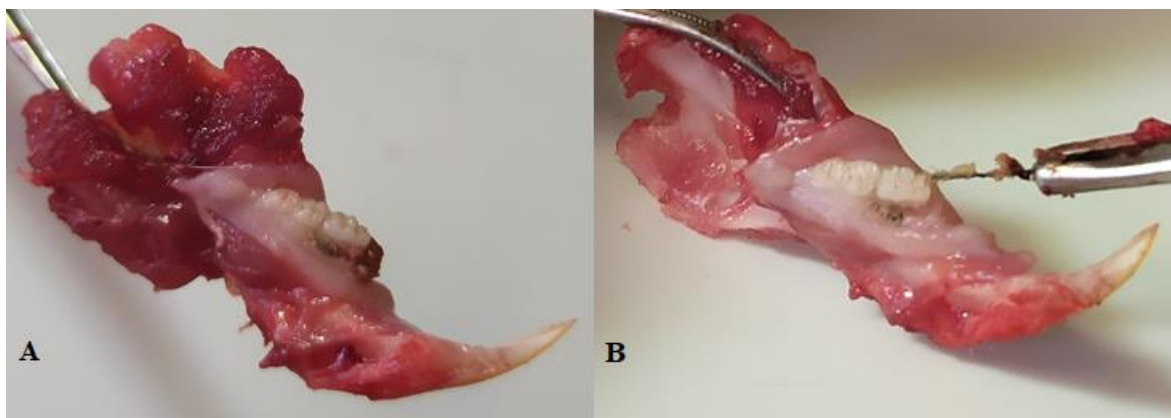
A anestesia prévia ao procedimento de eutanásia consistiu na injeção intraperitoneal com solução composta de cloridrato de cetamina 5% (GENÉRICO - Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda, Itatiaia-RJ, Brasil) e cloridrato de xylazina 2% (XILAZIN®2% - Syntec do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba-SP, Brasil) nas doses de 60 mg/Kg e 10 mg/Kg respectivamente.

A eutanásia foi realizada por meio do processo de decapitação com uma guilhotina para roedores (Bonther, Ribeirão Preto, São Paulo, SP, Brasil), e seguiu as diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-CONCEA, 2015). Após o

procedimento de decapitação por guilhotina, os animais tiveram suas hemimandíbulas, direita e esquerda, coletadas.

Para remover as hemimandíbulas, foram realizados cortes com tesoura cirúrgica Iris de ponta fina reta (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) a partir da comissura labial até a articulação temporomandibular. Em seguida, com o auxílio de um bisturi com lâmina 15, os tecidos foram dissecados e desarticulados, dividindo a mandíbula pela sínfise (GONÇALVES, 2002). Nesta etapa, após a coleta das hemimandíbulas, os fios de algodão utilizados para a indução da doença periodontal nos primeiros molares inferiores esquerdos foram removidos (Figura 7).

Figura 7 – Hemimandíbula do rato



Hemimandíbula esquerda com o fio de algodão inserido no colo do primeiro molar inferior esquerdo (A) e durante o procedimento de remoção do fio de algodão (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.4.5 Preparo histológico

Posteriormente à coleta do material biológico, as hemimandíbulas foram fixadas em formol 10% por três semanas e em seguida passaram pelos processos de descalcificação, desidratação, diafanização, impregnação e emblocamento em parafina, microtomia e, por fim, a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

Para o processo de descalcificação foi adaptado o protocolo de Fernandes (2007), com a utilização do ácido nítrico a 5% durante 10 dias, com renovações diárias da solução. Resumidamente, o processo ocorreu da seguinte maneira: em temperatura ambiente e sem nenhum tipo de aceleração do processo (vácuo, agitação ou uso de micro-ondas), 20 ml da solução de ácido nítrico a 5% foi renovada todos os dias para a descalcificação de cada peça. No primeiro dia, a hemimandíbula foi inserida inteira na solução, a fim de iniciar o processo

de descalcificação. Ao fim do primeiro dia foi possível remover a porção excedente da peça, mantendo somente a região de primeiro e segundo molar. No início do segundo dia foi possível realizar o corte final da peça, conservando somente a região do primeiro molar e todo tecido periodontal, deixando a peça com cerca de 4mm³.

Após estarem descalcificadas, as peças foram neutralizadas pela lavagem em água corrente por 6 horas e posteriormente desidratadas em álcool etílico. Para o processo de desidratação foi utilizada uma série de soluções alcólicas de concentrações crescentes. A primeira imersão foi em álcool 70% por 12 horas, seguida por duas imersões em álcool 95% (solução-I, 60 minutos) e (solução-II, 30 minutos). Dando sequência, foram realizadas duas imersões no álcool 100% (solução-I, 60 minutos) e (solução-II, 30 minutos).

O próximo passo foi a diafanização, também chamado de clarificação, que completou a remoção da água e também do álcool do tecido, preparando-o para receber a parafina. Para a realização da diafanização as peças foram imersas em dois banhos de xilol (solução-I e solução-II), 30 minutos em cada.

Posteriormente as peças foram impregnadas e incluídas em parafina. A impregnação foi realizada em parafina líquida a 60°C em uma estufa, sendo a primeira imersão em parafina-I por 2 horas e a segunda imersão, em parafina-II por 30 minutos. Em seguida foram incluídas em parafina líquida.

Para facilitar o processo de corte das peças no micrótomo, as mesmas foram incluídas com a superfície lingual voltada para baixo, a fim de garantir um corte longitudinal no sentido mesio-distal da peça. A espessura escolhida para a microtomia foi de 6µm (GONÇALVES, 2002). Após serem cortadas com o auxílio de um micrótomo rotativo semi-automatizado (Leica Biosystems RM2245, LEICA[®], Buffalo Grove, IL, EUA) as peças foram montadas em lâminas e coradas pela técnica HE (Hematoxilina e Eosina).

Durante o processo de coloração, os cortes histológicos já aderidos à lâmina, foram desparafinizadas por dois banhos em xilol (xilol I e xilol II), 15 minutos em cada, seguida pela hidratação por uma série de soluções alcólicas de concentrações decrescentes (absoluto I, absoluto II, 95% I, 95% II e 70%) por 1 minuto em cada, seguida por lavagem em água corrente por 5 minutos. Imediatamente após a hidratação, as lâminas foram coradas pela hematoxilina de Harris por 5 minutos, seguido por lavagem por 15 minutos e logo em seguida, coradas pela eosina por 10 minutos, seguido pela desidratação, com uma série de soluções alcólicas de concentrações crescentes (95% I, 95% II, 95% III, absoluto I, absoluto II, absoluto III) e clarificação (xilol I, xilol II e xilol III), por 1 minuto em cada. Por fim, as

lâminas foram seladas com o uso de lamínulas de vidro afixadas com Entellan[®] (Sigma Aldrich, San Luis, MO, EUA).

5.4.6 Avaliação histométrica

A avaliação histométrica da lesão de furca, localizada entre as raízes dentárias dos primeiros molares inferiores foi realizada com o auxílio de um *software* de análise de imagens, ImageJ[®] (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, EUA).

Após a identificação precisa da lesão de furca, o primeiro corte histológico foi desprezado e selecionaram-se os demais cortes distanciados igualmente entre si, de modo a obter 05 cortes por dente. Todas as imagens da microscopia foram realizadas por meio de uma câmera digital (ToupCam- UCMOS03100KPA, China) acoplada ao microscópio (Nikon[®], Eclipse E200, Tokio, Japão), utilizando a objetiva com aumento de 40 vezes.

A calibração do microscópio foi realizada utilizando uma lâmina micrométrica para microscópio biológico (DigiLab, Piracicaba, SP, Brasil), onde cada divisão da lâmina corresponde a 0,1mm. Nesta calibração, com o auxílio da ferramenta “*straight*” do ImageJ, foi desenhada uma reta do ponto 0 ao 1 da lâmina micrométrica, o equivalente a 1,0 mm. Com isso, foi determinado que a distância em pixels da reta (938,6676 pixels) correspondia a 1 mm (Figura 8).

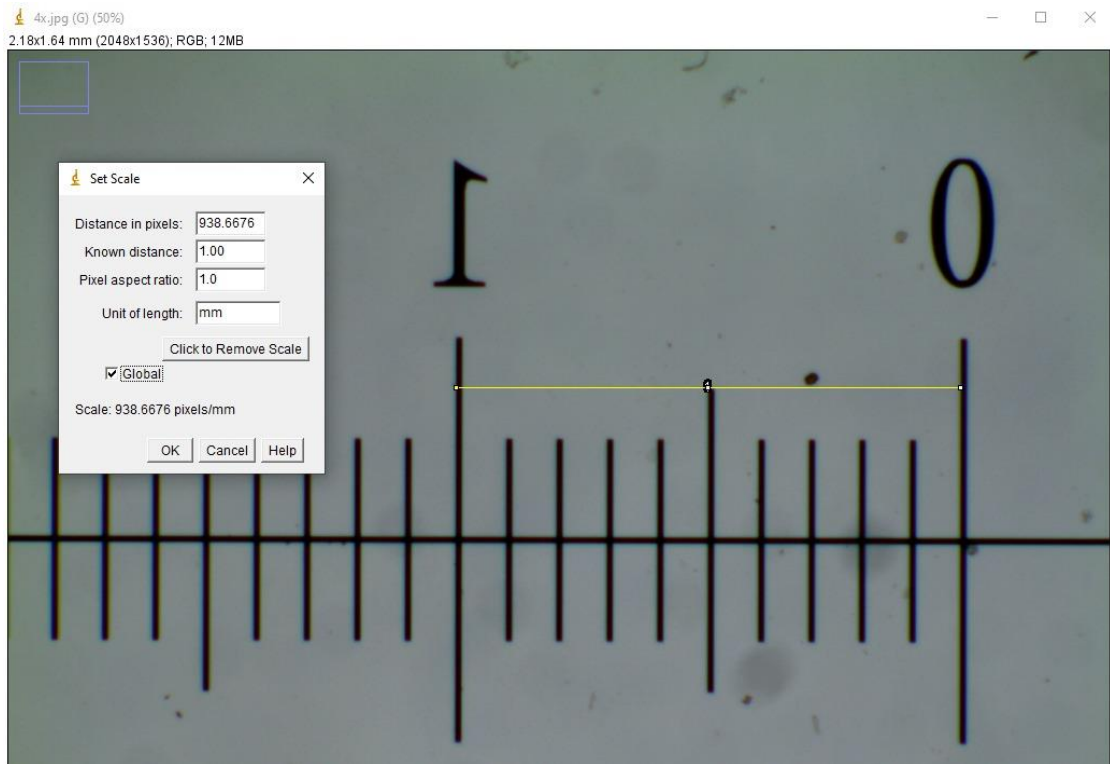
A análise da área de furca foi realizada com a ferramenta “*polygon section*” do ImageJ, onde foi circulada a área referente ao tecido conjuntivo entre as raízes mesial e distal do primeiro molar inferior (Figura 9).

O volume de perda óssea foi calculado utilizando-se a equação:

$$V = t \cdot \sum a_i$$

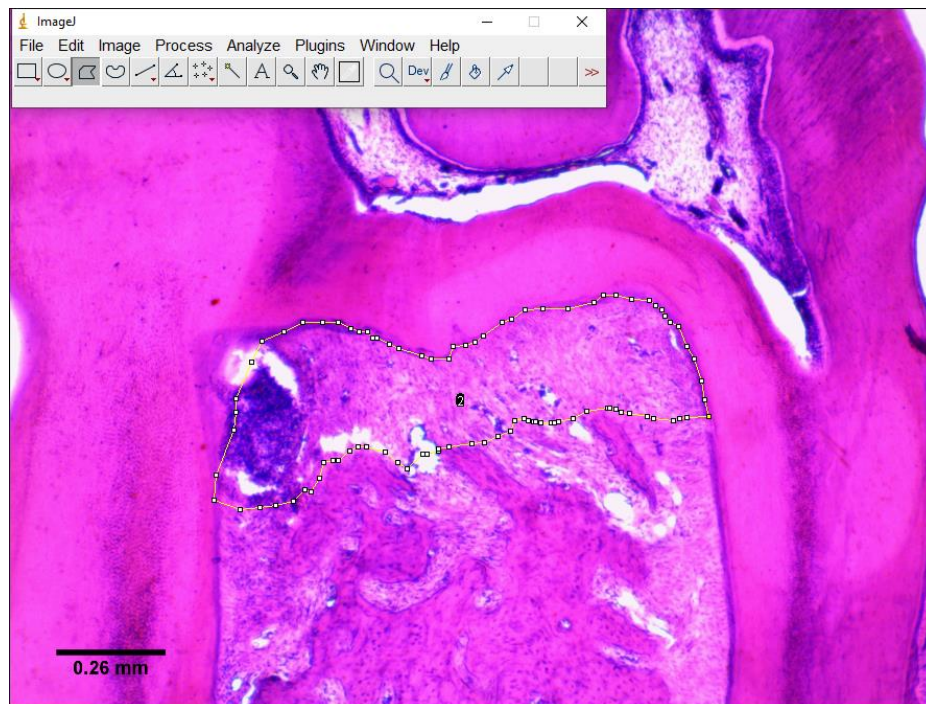
Onde “t” representa a espessura da secção e “ai” representa a área mensurada em cada corte. (GONÇALVES, 2002).

Figura 8 - Calibração do software ImageJ



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 9 - Delimitação da área de furca



Fotomicrografia ilustrando a demarcação da lesão de furca com a ferramenta *polygon section* do ImageJ. Coloração em HE, aumento original de 40 vezes (Barra 0,26mm).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS versão 25.0 (IBM SPSS Statistics 25, SPSS[®], Armonk, Nova York, NY, EUA). Para a comparação das médias dos grupos dos dentes do lado esquerdo (análise inter-grupo) foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) *one way*. Para a comparação das médias dos grupos de dentes do lado direito com o lado esquerdo (análise intra-grupo), foi realizado o teste T pareado. Para todos os testes, foi considerado nível de significância de 95%.

6 RESULTADOS

6.1 Análise da toxicidade

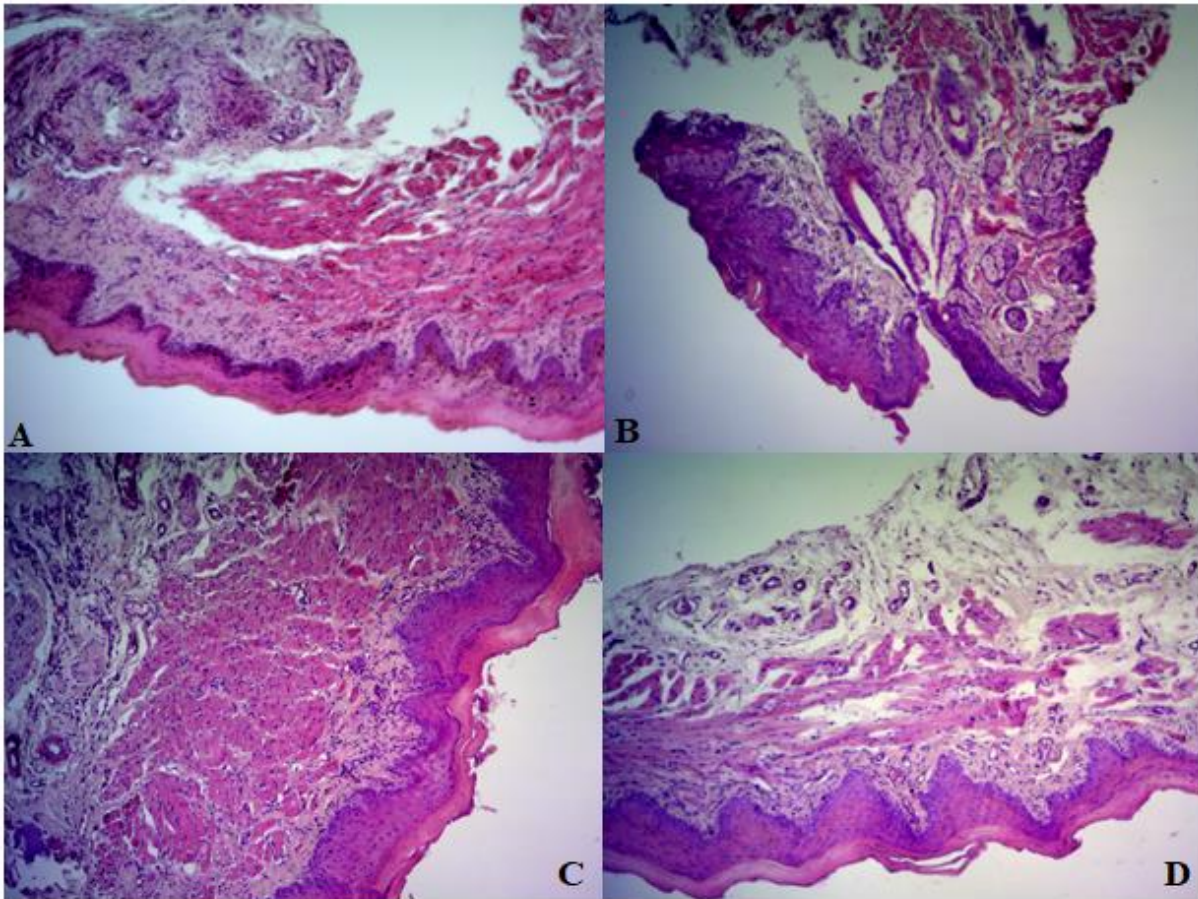
6.1.1 Avaliação macroscópica

À avaliação macroscópica, a gengiva vestibular do primeiro molar inferior esquerdo dos animais tratados, com pomadas (2,5% e 5%) ou com o veículo da pomada (vaselina), não apresentou alterações em relação ao grupo não tratado.

A pontuação foi de zero, quando da “ausência de alterações macroscópicas”. Portanto a pomada, tanto a 2,5% quanto a 5% foi considerada como não irritante na avaliação macroscópica.

6.1.2 Avaliação microscópica

Na avaliação microscópica (histológica), não foram observadas alterações na morfologia celular, do tipo estreitamento ou espessamento do epitélio, ulceração ou hiperqueratose (Figuras 10 A, B, C e D). Os animais tratados com a pomada a 2,5% e a 5% evidenciaram leve infiltrado imuno-inflamatório com a presença de leucócitos (Figuras 10 C e D).

Figura 10 - Fotomicrografia HE, ensaio de toxicidade

Ensaio de toxicidade oral tópica. Fotomicrografia em HE da região da gengiva de primeiro molar inferior esquerdo. Animais: controle, sem aplicação da vaselina ou pomada (A), com aplicação da vaselina (veículo da pomada) (B), com a aplicação da pomada de *P. brasiliensis* a 2,5% (C) e com a aplicação da pomada de *P. brasiliensis* a 5% (D). Aumento original de 4 vezes.

Fonte: Arquivo pessoal.

6.2 Avaliação histométrica

6.2.1 Avaliação *inter-grupo*

A avaliação inter-grupo consistiu em comparar o volume da região de lesão de furca inter-radicular dos primeiros molares inferiores esquerdos (com doença periodontal induzida) entre si, de acordo com o grupo em que o animal pertencia (controle negativo, controle positivo, pomada a 2,5% ou pomada a 5%). O resultado do volume de lesão de furca de acordo com cada grupo está apresentado na tabela 3.

O grupo controle positivo foi o que apresentou um maior volume de furca, o que indica um maior volume de perda óssea, em comparação com os demais grupos. O grupo controle negativo (com indução da doença periodontal e sem tratamento) foi o que apresentou menor volume de furca (Gráfico 1). As figuras 11 a 14 ilustram a perda óssea inter-radicular dos primeiros molares inferiores esquerdos em todos os grupos.

O teste ANOVA *one way* foi escolhido a fim de comparar as médias do volume da furca dos primeiros molares inferiores esquerdos dos quatro grupos, como descritos na tabela 2 do item 5.4.2. Além disso, o teste ANOVA *one way* pôde ser realizado, pois os dados apresentaram distribuição normal ao realizar o teste de Shapiro-Wilk e distribuição homogênea, como mostrado no teste de homogeneidade de variâncias (teste de Levene).

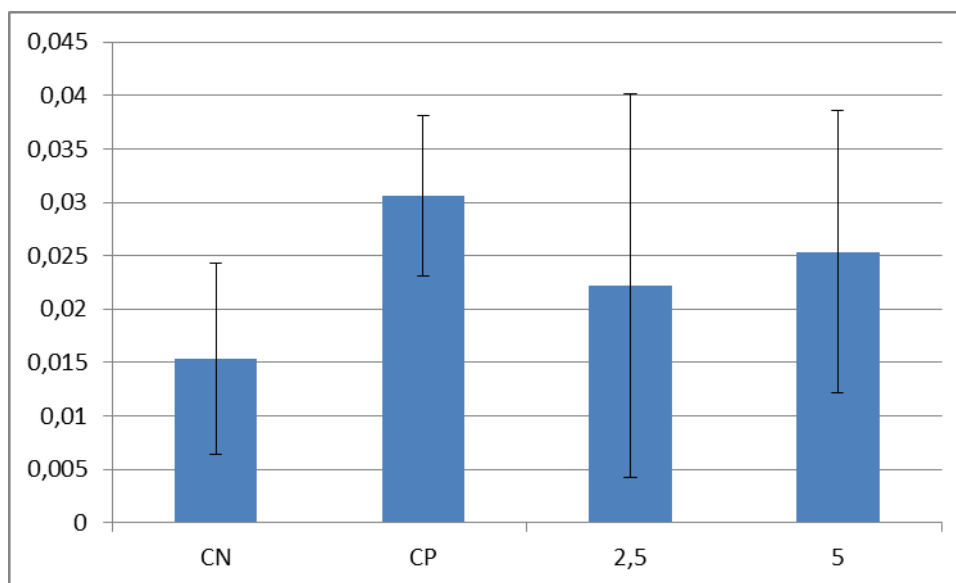
O resultado do teste ANOVA *one way* apresentou o valor de $p > 0,05$, o que aponta que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das médias entre os grupos avaliados (Tabela 4).

Tabela 3 - Volume (mm³) da lesão de furca dos grupos com doença periodontal induzida.

Grupo/ n° do animal	CN	CP	2,5	5
1	0,00936	0,02832	0,01428	0,01266
2	0,0297	0,04512	0,0144	0,01248
3	0,01212	0,02454	0,03522	0,02034
4	0,00618	0,02952	0,00498	0,02904
5	0,0123	0,03102	0,01206	0,03012
6	0,02262	0,02526	0,0525	0,04734

Legenda: Grupo Controle Negativo (CN); Grupo Controle Positivo (CP); Grupo da pomada a 2,5% (2,5) e Grupo da pomada a 5% (5).

Gráfico 1 - Média do volume (mm³) e desvio padrão da lesão de furca inter-radicular dos grupos com doença periodontal induzida.



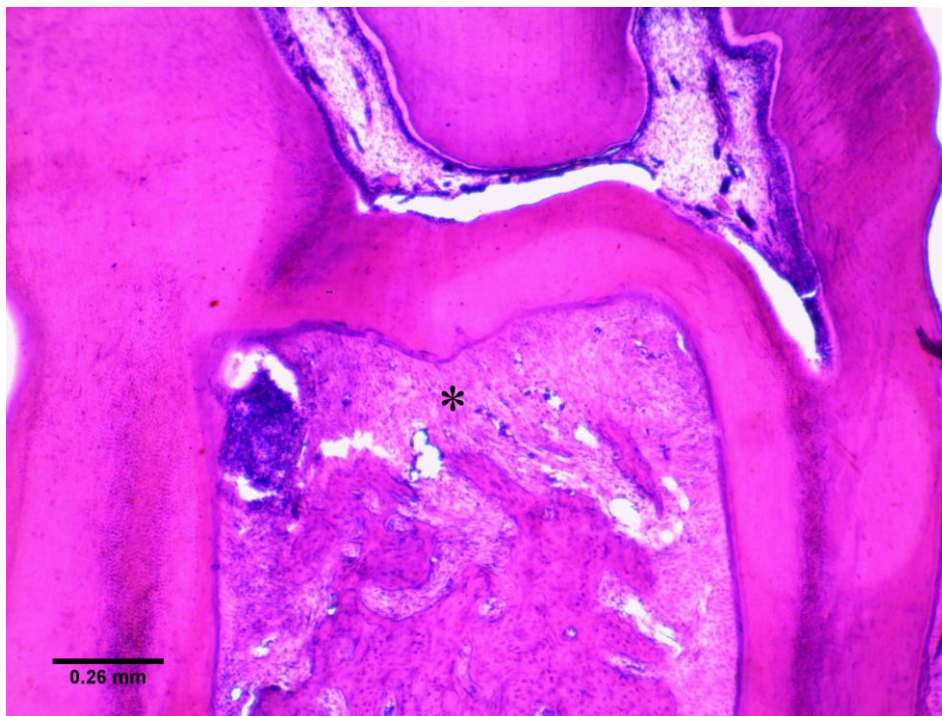
Legenda: Grupo Controle Negativo (CN); Grupo Controle Positivo (CP); Grupo da pomada a 2,5% (2,5) e Grupo da pomada a 5% (5).

Tabela 4 - ANOVA *one way* na avaliação inter-grupo

Volume (mm³)					
	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Entre Grupos	0,001	3	0,000	1,538	0,235
Nos grupos	0,003	20	0,000		
Total	0,004	23			

Nível de significância de 95%.

Figura 11 - Fotomicrografia HE - perda óssea inter-radicular do grupo controle negativo



Fotomicrografia ilustrando a perda óssea inter-radicular do grupo “controle negativo” (primeiro molar inferior esquerdo com indução da doença periodontal e sem tratamento). Coloração em HE, aumento original de 40 vezes (Barra 0,26mm). O asterisco (*) indica a lesão de furca.

Fonte: Arquivo pessoal.

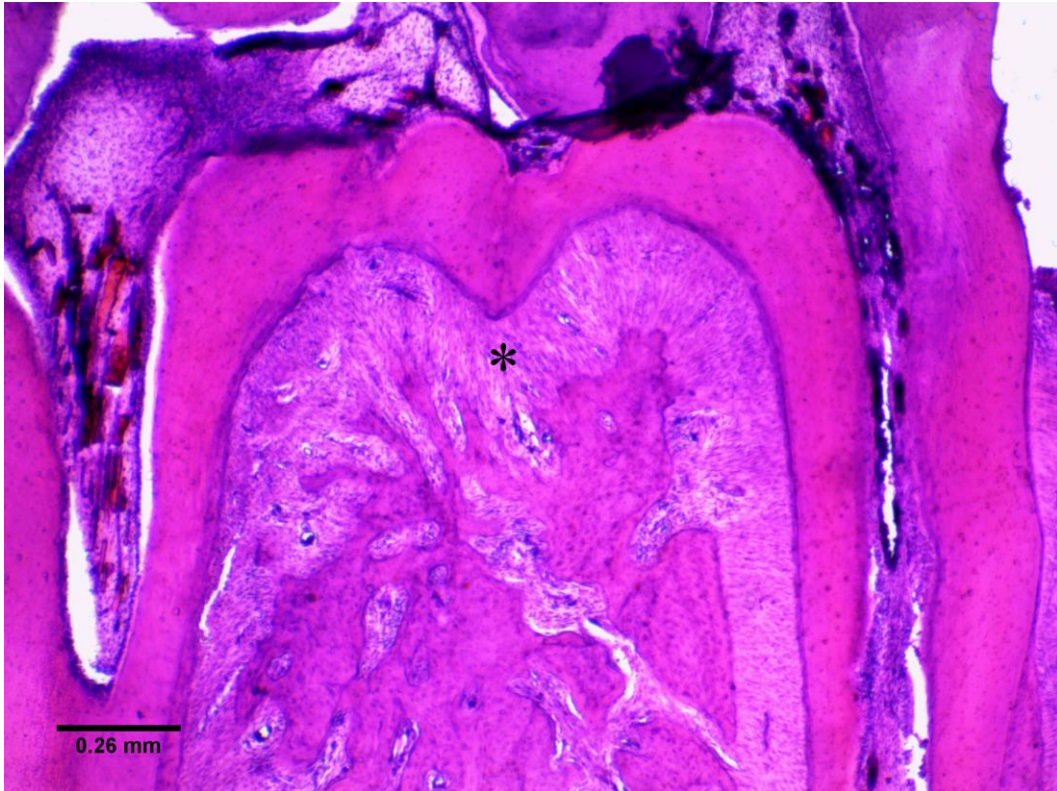
Figura 12 - Fotomicrografia HE - perda óssea inter-radicular do grupo controle positivo



Fotomicrografia ilustrando a perda óssea inter-radicular do grupo “controle positivo” (primeiro molar inferior esquerdo com indução da doença periodontal e tratado com o veículo da pomada, vaselina). Coloração em HE, aumento original de 40 vezes (Barra 0,26mm). O asterisco (*) indica a relesão de furcagão de furca.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 13 - Fotomicrografia HE - perda óssea inter-radicular do grupo pomada a 2,5%



Fotomicrografia ilustrando a perda óssea inter-radicular do grupo “teste pomada a 2,5%” (primeiro molar inferior esquerdo com indução da doença periodontal e tratado com a pomada contendo o extrato etanólico de folhas de *P. brasiliensis* a 2,5%). Coloração em HE, aumento original de 40 vezes (Barra 0,26mm). O asterisco (*) indica a lesão de furca.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 - Fotomicrografia HE - perda óssea inter-radicular do grupo pomada a 5%



Fotomicrografia ilustrando a perda óssea inter-radicular do grupo “teste pomada a 5%” (primeiro molar inferior esquerdo com indução da doença periodontal e tratado com a pomada contendo o extrato etanólico de folhas de *P. brasiliensis* a 5%). Coloração em HE, aumento original de 40 vezes (Barra 0,26mm). O asterisco (*) indica a lesão de furca.

Fonte: Arquivo pessoal.

6.2.2 Avaliação intra-grupo

A avaliação intra-grupo consistiu na comparação das médias do volume da furca dos dentes com doença periodontal induzida por ligadura (primeiros molares inferiores esquerdos) com o lado contralateral (primeiros molares inferiores direito), sem indução da doença periodontal. O resultado do volume de furca de acordo com cada grupo está apresentado na tabela 5. O gráfico 2 ilustra a média do volume de furca de acordo com os grupos e a figura 15 ilustra a diferença do volume de furca dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito.

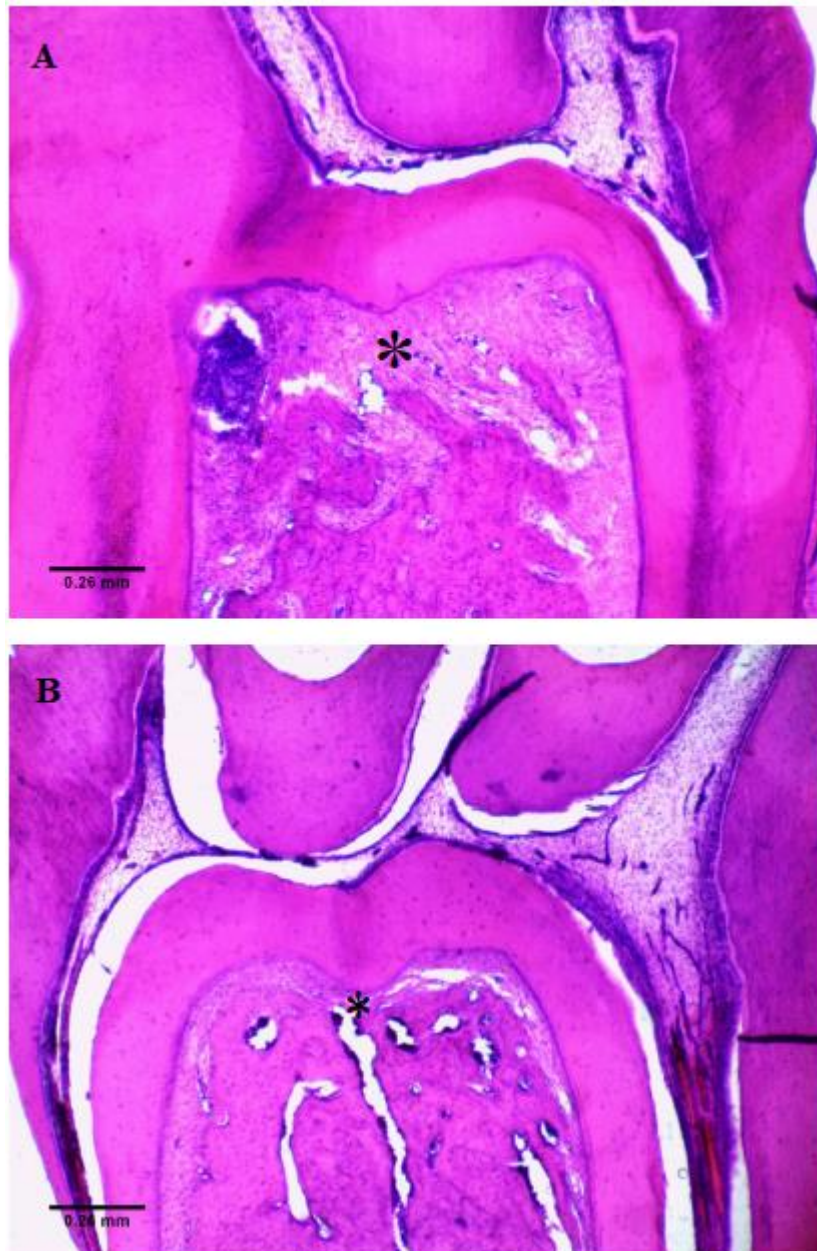
Os dados apresentaram distribuição normal ao teste de normalidade de Shapiro Wilk. Ao ser realizado o teste T para amostras pareadas, a análise revelou uma diferença estatisticamente significativa entre as médias do volume da furca do lado direito comparadas com o lado esquerdo ($p < 0,05$) (tabela 6).

Tabela 5 - Volume (mm³) da lesão de furca dos grupos com doença periodontal induzida.

Grupo/ nº do animal	CNe	CNd	CPe	CPd	2,5e	2,5d	5e	5d
1	0,00936	0,0027	0,02832	0,0036	0,01428	0,00354	0,01266	0,00402
2	0,0297	0,00276	0,04512	0,00318	0,0144	0,00348	0,01248	0,00432
3	0,01212	0,00462	0,02454	0,00486	0,03522	0,0048	0,02034	0,00486
4	0,00618	0,00264	0,02952	0,00432	0,00498	0,0048	0,02904	0,00432
5	0,0123	0,00312	0,03102	0,00288	0,01206	0,0045	0,03012	0,0045
6	0,02262	0,00312	0,02526	0,00306	0,0525	0,00696	0,04734	0,00282

Legenda: Grupo Controle Negativo esquerdo (CNe); Grupo Controle Negativo direito (CNd) Grupo Controle Positivo esquerdo (CPe); Grupo Controle Positivo direito (CPd); Grupo da pomada a 2,5% esquerdo (2,5e); Grupo da pomada a 2,5% direito (2,5d); Grupo da pomada a 5% esquerdo (5e) e Grupo da pomada a 5% direito (5d).

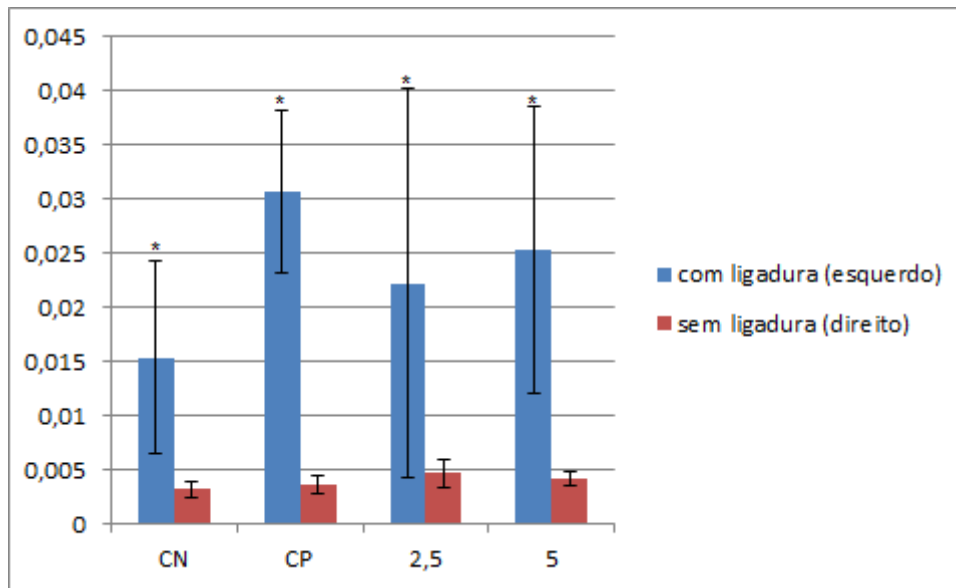
Figura 15 - Fotomicrografia HE - comparação do volume de furca dos primeiros molares inferiores esquerdo e direito



Fotomicrografia comparando o volume de lesão de furca inter-radicular do grupo com indução da doença periodontal por ligadura (primeiro molar inferior esquerdo) e sem tratamento (A) com o grupo sem indução da doença periodontal e sem tratamento (primeiro molar inferior direito) (B). Coloração em HE, aumento original de 40 vezes (Barra 0,26mm). O asterisco (*) indica a lesão de furca.

Fonte: Arquivo pessoal.

Gráfico 2 - Média do volume (mm^3) e desvio padrão da lesão de furca inter-radicular nos dentes com ou sem ligadura de acordo com o grupo



Legenda: Grupo Controle Negativo (CN); Grupo Controle Positivo (CP); Grupo da pomada a 2,5% (2,5) e Grupo da pomada a 5% (5).

O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

Tabela 6 - Teste T pareado da comparação intra-grupo

		Diferenças emparelhadas							
		95% Intervalo de Confiança da Diferença					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Erro Desvio	Erro padrão da média	Inferior	Superior			
Par 1	Vol (mm ³) CNe - Vol (mm ³) CNd	0,012220	0,009027	0,003685	0,002747	0,021693	3,315837	5	0,021105 *
Par 2	Vol (mm ³) CPe - Vol (mm ³) CPd	0,026980	0,007868	0,003212	0,018723	0,035237	8,399028	5	0,000392 *
Par 3	Vol (mm ³) 2,5e - Vol (mm ³) 2,5d	0,017560	0,016976	0,006930	0,000255	0,035375	2,533753	5	0,042290 *
Par 4	Vol (mm ³) 5e - Vol (mm ³) 5d	0,021190	0,013684	0,005586	0,006830	0,035550	3,793087	5	0,012718 *

Nível de significância de 95%. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

7 DISCUSSÃO

A utilização de fitoterápicos tem sido relatada como benéfica no tratamento da periodontite induzida por ligadura em ratos (BOTELHO, 2007b; 2016; FREIRES, 2018). Na medicina popular a *P. brasiliensis* é utilizada de forma tópica, para a cura de feridas (CARNEIRO, 2009; REIS; BELLINI, 2007; SOUZA, 2006) e no campo científico, sua composição e efeitos anti-inflamatório e antimicrobiano tem sido investigados ao longo dos anos (BOHLMANN, 1984; SILVA, 2015; DE AMORIM, 2016; ALMEIDA, 2015; ALMEIDA, 2017; CARDOSO, 2020). Portanto, a proposta do presente estudo foi averiguar os possíveis efeitos benéficos de uma pomada de extrato etanólico de folhas *Pseudobrickellia brasiliensis* no tratamento da periodontite induzida em ratos.

Estudos in vitro mostraram que os extratos etanólicos das folhas, flores e caule da *Pseudobrickellia brasiliensis* exerceram atividade anti-inflamatória, diminuindo a expressão das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IFN- γ e IL-2 em linfócitos e monócitos do sangue periférico de humanos (ALMEIDA, 2015; ALMEIDA, 2017). Essas citocinas também estão envolvidas na resposta pró-inflamatória da doença periodontal, uma vez que os linfócitos, ao secretarem IL-1 β , TNF e IL-17, acentuam a ativação dos osteoclastos, levando à destruição óssea do tecido periodontal (HAJISHENGALLIS, 2017). Além dos danos teciduais promovidos pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1, PGE-2 pelos macrófagos, promovendo danos direto ao tecido conjuntivo do periodonto (HAJISHENGALLIS, 2017). O interferon- γ (IFN- γ), também envolvido na resposta periodontal pró-inflamatória, é responsável pela ativação dos macrófagos (HAJISHENGALLIS, 2017). Contudo, no presente estudo, não foram feitas avaliações da concentração de citocinas no tecido gengival dos ratos. Há relato de efeito antimicrobiano dos extratos etanólicos de folhas e caules de *P. brasiliensis*, e do efeito antimicrobiano relacionado às bactérias endofíticas isoladas dessa planta (CARDOSO, 2020). No presente estudo também não foram realizadas avaliações sobre os microrganismos presentes na lesão periodontal induzida, para verificação do efeito antimicrobiano da *P. brasiliensis*.

Com o experimento de toxicidade oral tópica, realizado na mucosa bucal dos ratos, foi possível confirmar a segurança das concentrações da *P. brasiliensis* utilizadas, uma vez que, no teste de toxicidade realizado observou-se que nas concentrações de 2,5% e 5% não ocorreram alterações teciduais macroscópicas na região tratada, apesar de percebermos poucas alterações microscópicas nessa mesma região. Para o teste de toxicidade, foi seguido o protocolo de avaliação macroscópica e microscópica do estudo de Kimoto (2016). Contudo,

pela presença de algumas alterações microscópicas encontradas no presente estudo, é possível sugerir a necessidade de serem realizados outros testes de toxicidade, seguindo protocolos mais rigorosos como das diretrizes do *Guideline* 423, referente à toxicidade oral aguda e *Guideline* 407 referente à toxicidade oral de dose repetidas da OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico).

Conforme evidenciado na análise histométrica, na avaliação intra-grupo, neste estudo, o modelo de indução da doença periodontal por meio da inserção da ligadura de fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo dos ratos foi capaz de induzir a doença periodontal. Resultados da análise histométrica mostraram maiores volumes na lesão de furca nos molares submetidos à inserção do fio de algodão em relação aos molares contralaterais, sem doença periodontal, o que evidencia a perda óssea nos dentes com periodontite. Esse achado está de acordo com trabalhos prévios, que utilizaram o mesmo modelo experimental (GONÇALVES, 2002; IONEL, 2015).

Com os resultados apresentados neste estudo foi confirmada a hipótese nula, em detrimento à hipótese alternativa, ou seja, o uso da pomada do extrato etanólico de folhas de *P. brasiliensis* não mostrou efeitos benéficos na proteção contra a doença periodontal. Isso foi mostrado ao avaliar os resultados do teste histométrico que comparou o volume da lesão de furca dos animais do grupo controle negativo, com os animais do grupo controle e os animais tratados com a pomada nas concentrações de 2,5% e 5%. Como observação, a ligadura de um dos animais do grupo “pomada a 2,5%” foi perdida antes do término do período experimental, o que pode ter influenciado no volume final da área de furca daquele animal e conseqüentemente na média do grupo.

Não foi possível fazer uma comparação direta dos resultados do presente estudo sobre os efeitos da *P. brasiliensis*, com outros estudos, uma vez que não foram encontrados na literatura disponível, trabalhos que também utilizaram a *P. brasiliensis* no tratamento da doença periodontal ou em outras doenças inflamatórias, em modelo animal.

Ao compararmos nossos resultados com estudos que utilizaram outros fitoterápicos no tratamento da doença periodontal induzida em ratos, percebemos uma variação muito grande nos resultados obtidos. O estudo de Botelho (2007b) evidenciou resultados benéficos sobre o uso de fitoterápicos no tratamento da doença periodontal induzida em ratos, uma vez que houve redução da perda óssea dos animais com doença periodontal induzida e tratados com alecrim pimenta e aroeira do sertão, em comparação com os animais não tratados (BOTELHO, 2007b). Alguns estudos também demonstraram resultados satisfatórios com outros fitoterápicos, no tratamento da doença periodontal, tais

como a Ginkgo biloba (SEZER, 2013) e o extrato de própolis (TOKER, 2008). Entretanto, foi possível observar uma heterogeneidade quanto à metodologia da avaliação dos resultados dos tratamentos propostos sobre a evolução da doença periodontal. Enquanto alguns estudos avaliaram a perda óssea de forma macroscópica (BOTELHO, 2007b; BARRELLA, 2012), outros estudos utilizaram a tomografia computadorizada do tipo cone beam (PAIXAO, 2015), ou a histometria por meio da avaliação da distância da crista óssea alveolar com a junção cimento esmalte (CARMONA, 2013; CHENG, 2010). A falta de padronização metodológica para a análise dos resultados sobre os efeitos de fitoterápicos na lesão periodontal, também dificulta a comparação direta entre os resultados de diferentes estudos.

No presente trabalho, as análises histométricas inter-grupo mostraram que o grupo controle negativo apresentou menor perda óssea em comparação com os grupos controle positivo, grupo *P. brasiliensis* a 2,5% e 5%. Foi observado ainda, que o grupo tratado com a vaselina apresentou maior perda óssea, em relação aos demais grupos, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa. Portanto, podemos sugerir que a pomada com *P. brasiliensis* nas concentrações de 2,5% e 5% não apresentou efeito protetor sobre a doença periodontal no modelo experimental utilizado. Além disso, o fato do grupo controle negativo esquerdo ter apresentado menor perda óssea em comparação aos demais grupos, sugere que a manipulação dos animais e sua contenção manual para a aplicação diária da vaselina ou das pomadas de *P. brasiliensis*, pode ter acelerado a perda óssea, em comparação com os animais sem tratamento, que não foram manipulados diariamente. Se compararmos esse achado com o estudo de LU (2016) e colaboradores, podemos interpretar esse resultado como sendo a manipulação um fator de estresse, que leva a uma aceleração da doença periodontal em comparação com os animais não estressados. Esse achado também está de acordo com o estudo de Semenoff-Segundo e colaboradores (2011), que mostrou que o estresse modula negativamente a doença periodontal induzida em ratos. Ao avaliar esse achado e a fim de minimizar possíveis vieses em pesquisas futuras, sugerimos que todos os animais sejam manipulados da mesma forma. Uma possível solução, que teria diminuído esse viés seria a manipulação diária dos animais do grupo sem tratamento e a aplicação do *microbrush* (sem nenhum produto) na região da gengiva.

8 CONCLUSÕES

A pomada de extrato etanólico de folhas de *Pseudobrickellia brasiliensis*, nas concentrações 2,5% e 5% não apresentaram efeitos de toxicidade oral tópica no tecido gengival dos ratos. Contudo, a pomada não foi eficaz em reduzir os volumes de lesões de furca nos casos da doença periodontal induzida por ligadura em ratos. Novos estudos, utilizando diferentes posologias da pomada de *P. brasiliensis* poderão ser realizados, a fim de se confirmar ou descartar o possível efeito protetor da *P. brasiliensis* na lesão periodontal induzida por ligadura em ratos, permitindo assim, contribuir com novas informações sobre o uso de fitoterápicos no tratamento da doença periodontal, bem como, estimular estudos futuros nessa área.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. G. Composição química e efeito sobre mediadores inflamatórios de preparações de partes aéreas de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob (arnica-do-campo) in vitro. 2015. 138 p. Tese (Doutorado) - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina. Disponível em <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/798>. Acessado em 08/09/2019.
- ALMEIDA, V. G. *et al.* Inhibitory effect of the *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R.M. King & H. Rob. aqueous extract on human lymphocyte proliferation and IFN- γ and TNF- α production in vitro. **Braz J Med Biol Res**, v. 50, n. 8, e5163, 2017.
- ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontology** 2000, v. 34, p. 9-21, 2004.
- ARWEILER, N. B.; PERGOLA, G.; KUENZ, J.; HELLWIG, E.; SCULEAN, A.; AUSCHILL, T. M. Clinical and antibacterial effect of an anti-inflammatory toothpaste formulation with *Scutellaria baicalensis* extract on experimental gingivitis. **Clin Oral Investig**, v. 15, n. 6, p. 909-913, 2011.
- ATHAYDE, A. E.; RICHETTI, E.; WOLFF, J.; LUSA, M. G.; BIAVATTI, M. W. “Arnicas” from Brazil: comparative analysis among ten species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 29, p. 401-424. 2019.
- BAEZA M. *et al.* Diagnostic accuracy for apical and chronic periodontitis biomarkers in gingival crevicular fluid: An exploratory study. **J Clin Periodontol**. v. 43, n. 1, p. 34-45, 2015.
- BAJAJ, N.; TANDON, S. The effect of triphala and chlorhexidine mouthwash on dental plaque, gingival inflammation, and microbial growth. **Int J Ayurveda Res**, v. 2, n. 1, p. 29-36, 2011.
- BARRELLA, G. E. *et al.* Evaluation of the effect of an organic extract obtained from *Ipomoea alba L.* on experimental periodontitis in rats. **Braz. oral res**, v. 26, n. 2, p. 158-164, 2012 .
- BENATTI, B. B. *et al.* Effects of a *Mikania laevigata* extract on bone resorption and RANKL expression during experimental periodontitis in rats. **J. Appl. Oral Sci**, v. 20, n. 3, p. 340-346, 2012.
- BERGLUNDH, T.; DONATI, M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. **J Clin Periodontol**. v. 32, n. 6, p. 87-107, 2005.
- BLUMENTHAL, M. *et al.* Arnica flowers. In: The complete german commission e monographs: Therapeutic guide to herbal medicines. Austin: American Botanical Council, 1998

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. A hydroxygermacrene and other constituents from *Pseudobrickellia brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 23, n.8, p 1798-1799, 1984.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 771-782, 2006.

BOTELHO M. A., *et al.* Effect of a novel essential oil mouthrinse without alcohol on gingivitis: a double-blinded randomized controlled trial. **J Appl Oral Sci**, v. 15, n. 3, p. 175–180, 2007a.

BOTELHO, M. A., *et al.* *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 471–478, 2007b.

BOTELHO M. A. *et al.* Nanotechnology in phytotherapy: Antiinflammatory effect of a nanostructured thymol gel from *Lippia sidoides* in acute periodontitis in Rats. **Phyther Res**, v. 30, n. 1, p. 152-9, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 126p. 2011.

BUENO, C. R. E. **Contemporary use of plant extracts in dentistry**: scientific evidence for phytotherapy and ethnopharmacology. Nova York, Estados Unidos: Nova Science Publishers Inc., 2020.

CARDOSO, V. M.; CAMPOS, F. F.; SANTOS, A. R. O.; OTTONI, M. H. F.; ROSA, C. A.; ALMEIDA, V. G.; GRAEL, C. F. F. Biotechnological applications of the medicinal plant *Pseudobrickellia brasiliensis* and its isolated endophytic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.

CARMONA, G. B. *et al.* Effect of andiroba oil on periodontitis in Wistar rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 28, n. 6, p. 430-434, 2013 .

CARNEIRO, M. R. B. A flora medicinal no centro oeste do Brasil: um estudo de caso com abordagem etnobotânica em Campo Limpo de Goiás. 2009. 242f. (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) - Centro Universitário de Anápolis. Anápolis. GO. 2009.

CARVALHO, L. F.; NEVES, A.; RICARDO, L.; RODE, S.; MARTINS, A. Tempo de descalcificação e preservação do núcleo celular de tecido mineralizado descalcificado com ácido nítrico a 5%, edta a 7% e Biodec - r. **Revista Periodontia**. v. 18, n. 2, p. 71-76. 2008.

CATON, J. G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T *et al.* A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol**. v. 45(Suppl 20): S1– S8, 2018.

CATON, J. G.; CIANCIO, S. G.; BLIEDEN, T. M. *et al.* Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. **J. Periodontol.** v. 71, n. 4, p. 521–532, 2000.

CHENG, W. C., *et al.* Ameliorative effect of quercetin on the destruction caused by experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 45, n. 6, p. 788–795, 2010.

CHO, M. I.; GARANT, P. R. Development and General Structure of the Periodontium. **Periodontology 2000**, v. 24, n. 1, p. 9-27, 2003.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 481–490, 2010.

DE ALMEIDA, J. M.; *et al* Influence of adjuvant therapy with green tea extract in the treatment of experimental periodontitis. **Arch Oral Biol**, v. 102, p. 65-73, 2019.

DE AMORIM, M. L. L.; GODINHO, W. M.; ARCHANJO, F. C.; GRAEL, C. F. F. Chemical constituents of *Pseudobrickellia brasiliensis* leaves (Spreng.) R.M. King & H. Rob. (Asteraceae). **Rev Bras Pl Med.** v. 18, n. 2, p. 408–414, 2016.

EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-CONCEA. Diretriz da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília/DF - 2015.

FERNANDES, M. I. *et al.* Microscopic qualitative evaluation of fixation time and decalcification media in rat maxillary periodontium. **Braz. oral res.** v. 21, n. 2, p. 134-139, 2007.

FINE, N.; HASSANPOUR, S.; BORENSTEIN, A.; SIMA, C.; OVEISI, M.; SCHOLEY, J.; CHERNEY, D.; GLOGAUER, M. Distinct oral neutrophil subsets define health and periodontal disease states. **J Dental Res.** v. 95, n. 8, p. 931-938, 2016

FLEMMING, H.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol.** v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FREIRES, I. A.; SANTAELLA, G. M.; DE CÁSSIA ORLANDI SARDI, J.; ROSALEN, P. L. The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. **Archives of Oral Biology**, v. 87, p. 196–203, 2018.

FUJIHASHI, K. *et al.* Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. **J Periodontol.** v. 64, n. 5, p. 400-406, 1993.

GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**, v. 390, n. 10100, p.1211-1259, 2017.

GONCALVES, P. F. *et al.* Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis: a study in rats. **Pesqui. Odontol. Bras.** v. 17, n. 1, p. 46-50, 2003.

GRAVES D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **J Periodontol.** v. 79, n. 8, p. 1585-1591, 2008.

GREENBERG, M.; URNEZIS, P.; TIAN, M. Compressed mints and chewing gum containing magnolia bark extract are effective against bacteria responsible for oral malodor. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 23, p. 9465-9469, 2007.

HAJISHENGALLIS, G.; DARVEAU R. P.; CURTIS M. A. The keystone-pathogen hypothesis. **Nat Rev Microbiol.** v. 10, n. 10, p. 717-725, 2012.

HAJISHENGALLIS, G.; KOROSTOFF, J. M. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. **Periodontology 2000**, v. 75, p. 116-151. 2017.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA J. N. A família Asteraceae na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental de Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v.59, n. 4, p. 687-749, 2008.

HOUDE, V.; GRENIER, D.; CHANDAD, F. Protective effects of grape seed proanthocyanidins against oxidative stress induced by lipopolysaccharides of periodontopathogens. **J Periodontol**, v. 77, n. 8, p. 1371-9, 2006.

HUARD, B. *et al.* APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. **J Clin Invest.** v. 120, n. 4, p. 2887-2895, 2008.

IONEL A, *et al.* Periodontal disease induced in Wistar rats: experimental study. **HVM Bioflux.** v. 7, n. 2, p. 90-95, 2015.

JANAKIRAM, C.; DYE, B. A. A public health approach for prevention of periodontal disease. **Periodontol 2000.** v.84, p. 202-214. 2020.

KIM, P. D.; XIA-JUAN, X.; CRUMP, K. E.; ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G.; SAHINGUR, S. E. Toll-like receptor 9-mediated inflammation triggers alveolar bone loss in experimental murine periodontitis. **Infect Immun.** v. 83, n.7, p. 2992-3002, 2015.

KIMOTO, H. *et al.* A simple method for oral mucosal irritation test by intraoral instillation in rats. **The Journal of Toxicological Sciences.** v.41, n.2, p. 233-239, 2016.

KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17038, 2017.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol.** v. 27, p. 485-517, 2009.

KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontol 2000.** p. 14:33-53, 1997.

KUMAR, P. S.; LEYS, E. J.; BRYK, J. M.; MARTINEZ, F. J.; MOESCHBERGER, M. L.; GRIFFEN, A. L. Changes in periodontal health status are associated with bacterial

community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. **J Clin Microbiol.** v. 44, n. 10, p.3665-3673, 2006.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental Gingivitis in Man. **The Journal of Periodontology**, v. 36, n. 3, p. 177-187, 1965.

LOESCHE, W. J. Clinical and Microbiological Aspects of Chemotherapeutic Agents Used According to the Specific Plaque Hypothesis. **Journal of Dental Research**, v. 58, n. 12, p. 2404–2412, 1979.

LOURENÇO, T. G.; HELLER, D.; SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; COTTON, S. L.; PASTER, B. J.; COLOMBO, A. P. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. **J Clin Periodontol.** v. 41, n. 11, p. 1027-1036, 2014.

LU, H.; XU, M.; WANG, F. *et al.* Chronic stress accelerates ligature-induced periodontitis by suppressing glucocorticoid receptor- α signaling. **Exp Mol Med**, v. 48, e223, 2016.

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 11, n. 8, p. 519-531, 2011.

MARSH, P. D. Microbial Ecology of Dental Plaque and its Significance in Health and Disease. **Advances in Dental Research.** v. 8, n. 2, p. 263-27, 1994.

MIYACHI, K.; ISHIHARA, K.; KIMIZUKA, R.; OKUDA, K. Arg-gingipain A DNA Vaccine Prevents Alveolar Bone Loss in Mice. **Journal of Dental Research.** v, 86, n. 5, p. 446–450, 2007.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

NAGATA, H. *et al.* Effect of eucalyptus extract chewing gum on periodontal health: a double-masked, randomized trial. **J Periodontol**, v. 79, n. 8, p. 1378-85, 2008.

NAKAJIMA, J. N. Pseudobrickellia in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16274> . Acessado em 10/09/2019.

NAPIMOGA, M. H. *et al.* Cannabidiol decreases bone resorption by inhibiting RANK/RANKL expression and pro-inflammatory cytokines during experimental periodontitis in rats. **Int Immunopharmacol**, v. 9, n. 2, p; 216-22, 2009.

OECD 1995. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodent. Acessado em 10 de outubro de 2020 em <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd407-2008.pdf>

OECD 2001. Guideline 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Acessado em 10 de outubro de 2020 em https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf

OMS (Organização Mundial da Saúde) - OMS Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva, 43p., 1998.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab Invest.** v. 34, n. 3, p.235-249, 1976.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. **Periodontitis in man and other animals:** A comparative review. Suíça: Karger, Basel. 1982.

PAIXAO, M. S. *et al.* Hyptis *pectinata* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Rev. bras. Farmacogn.** v. 25, n. 1, p. 35-41, 2015 .

PASTER, B. J.; BOCHES S. K.; GALVIN J. L. *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol.** v. 183, n. 12, p. 3770-3783, 2001.

PELEKOS, G.; HO, S. N.; ACHARYA, A.; LEUNG, W. K.; MCGRATH, C. A double-blind, paralleled-arm, placebo-controlled and randomized clinical trial of the effectiveness of probiotics as an adjunct in periodontal care. **J Clin Periodontol.** v. 46, n. 12, p. 1217-1227. 2019.

PELLETIER, M. *et al.* Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood.** v. 115, n. 2, p. 335-343. 2010.

PEREIRA J. V. *et al.* *In vitro* antibacterial and adherence effect of the extract of *Punica granatum* Linn. upon dental biofilm microorganisms. **J Braz Pharmacogn.** v. 16, n. 1, p. 88-93, 2006.

PRADEEP, A. R.; AGARWAL, E.; NAIK, S. B. Clinical and microbiologic effects of commercially available dentifrice containing aloe vera: a randomized controlled clinical trial. **J Periodontol,** v. 83, n. 6, p. 797-804, 2012a

RASSAMEEMASMAUNG, S.; SIRIKULSATHEAN, A.; AMORNCHAT, C.; MAUNGMINGSOOK, P.; ROJANAPANTHU, P.; GRITSANAPHAN, W. Topical application of *Garcinia mangostana* L. pericarp gel as an adjunct to periodontal treatment. **Complement Ther Med.,** v. 16, n. 5, p. 262-7, 2008.

RYDER, M.I. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. **Periodontol 2000.** v. 53, n. , p. 124-137, 2010.

REIS, S. L. A.; BELLINI, L. M. Conhecimento e uso da flora para fins medicinais em comunidades ribeirinhas dos rios Paraná, PR e Cuiabá, MT: 2007.

RIBEIRO, J. F.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; MENDONÇA, R. C.; FILGUEIRAS, T. S. Caracterização florística e potencial de uso das espécies vasculares ocorrentes nas fazendas Trijunção, BA. Documentos. Embrapa Cerrados, 46. ed., p.1-48, 2001.

RING, M. E. **Dentistry: An Illustrated History.** 1ªed. Manole publishing company, 1998.

SANTANA, J. B.; MORAES, R. M.; ZUTIN, E. A. L.; MELO, G. F. S.; FRANCO, G. C. N.; ANBINDER, A. L. The ligature-induced periodontitis model: Literature overview and

description of the technique. In: WALLACE E. **Periodontal Disease: Diagnosis, Management Options and Clinical Features**. Nova York, Estados Unidos: Nova Science Publishers Inc., 2016. p. 23-46.

SAÚDE, M. D. **Sb Brasil 2010: Pesquisa Nacional De Saúde Bucal: Resultados Principais**, 116p. 2012.

SCAPINI, P.; CASSATELLA, M. A.; Social networking of human neutrophils within the immune system. **Blood**. v. 124, n. 5, p. 710-719, 2014.

SEDIGH-RAHIMABADI, M.; FANI, M.; ROSTAMI-CHIJAN, M.; ZARSHENAS, M. M.; SHAMS, M. A Traditional Mouthwash (*Punica granatum* var *pleniflora*) for Controlling Gingivitis of Diabetic Patients: A Double-Blind Randomized Controlled Clinical Trial. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 22, n. 1, p. 59-67, 2017.

SEMENOFF-SEGUNDO, A. *et al.* Effects of two chronic stress models on ligature-induced periodontitis in Wistar rats. *Arch Oral Biol*, v. 57, n. 1, p. 66-72, 2012.

SEMIR, J.; REZENDE, A. R.; MONGE, M.; LOPES, N. P. **As arnicas endêmicas das serras do Brasil: Uma revisão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora*(Asteraceae)**, 1ª ed. UFOP, Ouro Preto, MG, 2011.

SEZER, U.; KARA, M. I.; ERCİYAS, K.; ÖZDEMİR, H.; ÜSTÜN, K.; ÖZER, H.; GÖZE, F. Protective effects of Ginkgo biloba extract on ligature-induced periodontitis in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 1, p. 38-44, 2013.

SILVA, R. F.; REZENDE, C. M.; PEREIRA, J. B.; VIEIRA, R. F.; SANTOS, M. C. S.; BIZZO, H. R. Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from *Pseudobrickellia brasiliensis* (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**. v. 27, n. 5, p. 417-420, 2015.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, p. 134-144, 1998.

SOUZA, F. A. A. A cultura tradicional do sertanejo e o seu deslocamento para a implantação do Parque Nacional Grande Sertão Veredas. 2006. 97f. Mestrado em Ciência Florestal - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

TAKAHASHI, K.; FUKAZAWA, M.; MOTOHIRA, H.; OCHIAI, K.; NISHIKAWA, H.; MIYATA, T. A pilot study on antiplaque effects of mastic chewing gum in the oral cavity. **J Periodontol**, v. 74, n. 4, p. 501-5, 2003.

THEILADE, E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. **J Clin Periodontol**. v. 13, n. 10, p. 905-911, 1986.

THORBERT-MROS, S.; LARSSON, L.; BERGLUNDH, T. Cellular composition of long-standing gingivitis and periodontitis lesions. **J Periodontal Res**. v. 50, n. 4, p. 535-543. 2015.

TOKER, H.; OZAN, F.; OZER, H.; OZDEMIR, H.; EREN, K.; YELER, H. A morphometric

and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 6, p. 1089-1094, 2008.

VASQUES, A. M. V.; MATHEUS, H. R.; GUSMAN, D. J. R.; CURY, M. T. S.; REIS-PRADO, A. H. TRIZZI, J. Q.; BUENO, C. R. E. Phytotherapy in Periodontics. In: BUENO, C. R. E. **Contemporary use of plant extracts in dentistry: Scientific evidence for phytotherapy and ethnopharmacology**. Nova York, Estados Unidos: Nova Science Publishers Inc., 2020. p. 191-226.

VENNILA, K.; ELANCHEZHIAN, S.; ILAVARASU, S. Efficacy of 10% whole *Azadirachta indica* (neem) chip as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. **Indian J Dent Res**, v. 27, n. 1, p. 15-21, 2016.

WOLF, S. J.; DENFORD, K. E. Taxonomy of Arnica (Compositae) subgenus Austromontana. **Rhodora**. v. 86, n. 847, p. 239-309, 1984.

WU, C. D.; DAROUT, I. A.; SKAUG, N. Chewing sticks: timeless natural toothbrushes for oral cleansing. **J Periodontal Res**. v. 36, n. 5, p. 275-284, 2001.

YUKNA, R. A.; CARR, R. L.; EVANS, G. H. Histologic evaluation of an Nd:YAG laser-assisted new attachment procedure in humans. **Int. J. Periodontics Restorative Dent**. v. 27, n. 6, p. 577-587, 2007.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Diamantina, 13 de novembro de 2019.

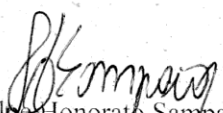
Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação morfológica óssea em ratos com periodontite induzida por ligadura e tratados com extrato etanólico de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob", registrada com o nº.048/2019, sob a responsabilidade de Wagner de Fátima Pereira e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em reunião de 13/11/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	10/01/2020 a 10/12/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> , linhagem Wistar
Nº de animais	28
Peso/Idade	250 g/8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial do Centro Integrado de Pesquisa em Saúde (CIPq-Saúde) da UFVJM.

O prazo de validade desse Certificado é equivalente a vigência do Projeto prorrogável por mais 1 ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA/UFVJM durante a vigência do projeto.

Com o recebimento deste Certificado, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.

Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa I, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.


Kinulpe Honorato Sampaio

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM