

## **O GEL DENTAL DE ALECRIM PIMENTA (*LIPPIA SIDOIDES*) COM NANOPARTÍCULAS NA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL (DPE): AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA**

**Marco Antonio BOTELHO (1); Danusa MONTENEGRO (1); Ronaldo RUELA (2); Dinalva de Brito QUEIROZ (3); José Galberto COSTA (4); Rinaldo dos Santos ARAÚJO (5).**

(1) Instituto de Pesquisas Aplicadas, e-mail: [marcobotelho1@gmail.com](mailto:marcobotelho1@gmail.com)

(2) Faculdade Unidas do Norte de Minas -FUNORTE, e-mail: [ronaldoruella3@gmail.com](mailto:ronaldoruella3@gmail.com)

(3) Farmácia Evidence, e-mail: [hdinalva@farmaciaevidence.com.br](mailto:hdinalva@farmaciaevidence.com.br)

(4) Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular/Universidade regional do Cariri-URCA, e-mail: [galberto@urca.br](mailto:galberto@urca.br)

(5) Centro Federal de Educação Tecnológica do Ceará, Avenida 13 de Maio, 2081, Benfica, 60411-220, Fortaleza-CE-Brasil. Fone: (85) 33073611, Fax: (85) 33073711, e-mail: [rinaldo@cefetce.br](mailto:rinaldo@cefetce.br)

### **RESUMO**

A periodontite se configura como um grave problema de saúde pública no mundo, sendo um importante fator de risco para doenças cardiovasculares contribuindo de sobremaneira na perda de dentes em adultos. Bactérias periodontopatogênicas e fatores do hospedeiro são necessários para o desenvolvimento e progressão desta patologia. Os produtos naturais podem constituir uma nova alternativa de tratamento, sendo descrito a eficácia de colutórios a base de óleo essencial. O objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos envolvidos no efeito de géis a base de produtos naturais e seus derivados na doença periodontal experimental (DPE): gel elaborado a partir do óleo essencial de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* 0,5%) (GAL); comparando seus efeitos com a doxíciclina, controle positivo (GDX). A DPE foi induzida passando-se fio de náilon 3,0 em torno do segundo molar superior esquerdo de ratos *Wistar* machos, permanecendo durante 11 dias. Os géis foram aplicados topicamente na região gengival imediatamente após a indução da doença e três vezes ao dia durante 11 dias. Os parâmetros avaliados foram: índice de perda óssea (IPO), análise microbiológica e variação da massa corpórea. O gel GAL reduziu o IPO comparavelmente à doxíciclina, favoreceu a preservação do osso alveolar, cemento e das fibras colágeno, além de mostrar a redução do infiltrado inflamatório gengival. Todos os géis empregados inibiram o crescimento de bactérias características da periodontite e promoveram um aumento na massa corpórea em relação ao grupo veículo. Esses resultados mostram que os géis testados possuem importante atividade na DPE, sugerindo a relevância de testes clínicos destes fitofármacos no tratamento da doença periodontal.

**Palavras-chave:** Óleo essencial, Alecrim pimenta, *Lippia sidoides*, Gel dental

## **1. INTRODUÇÃO**

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

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

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

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

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

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

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. As formas de tratamento e controle das periodontopatias**

Medidas de higiene oral baseada em produtos naturais são praticadas por populações e culturas diferentes em torno do mundo desde a antiguidade (PAI et al., 2004). Segundo a OMS, 80% da população mundial, usam a medicina popular, principalmente através do uso de plantas medicinais, para suprir as necessidades de assistência médica primária. No interior do Ceará populações utilizam cigarros feitos com folhas de alecrim-pimenta para aliviar a dor de dente (BOTELHO, 2005). A remoção mecânica regular do biofilme dental é a medida primária para prevenir a progressão da doença periodontal, consistindo na remoção também de cálculo, cimento contaminado e tecido de granulação, fatores que determinam a doença periodontal (LINDHE, 1999).

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

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

Lemos et al. (1990) no estudo fitoquímico das partes aéreas de *L. sidoides*, relataram o isolamento de vários constituintes químicos pertencentes a diferentes classes das funções orgânicas, majoritariamente o timol e carvacrol. Costa et al. (2001) isolaram do extrato hidro-etanólico seis quinonas, quatro flavonóides, com destaque para a quercitina, a qual foi avaliada no modelo experimental de doença periodontal em ratos *Wistar* e mostrou uma significativa redução na perda óssea alveolar quando administrado por via intra peritoneal (TEIXEIRA, 2002). O Timol e Carvacrol são componentes de diversos óleos essenciais que também tem demonstrado exercerem uma forte atividade antimicrobiana. As exigências estruturais para a atividade do carvacrol foram determinadas pela comparação com compostos estruturais relacionados do óleo, e recentemente foi possível demonstrar que o carvacrol apresenta uma atividade antimicrobiana contra bactérias cariogênicas e *Candida albicans* maior quando comparado ao timol e ao óleo essencial (BOTELHO et al., 2007a). Anti-sépticos bucais à base do óleo essencial da *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) foram elaborados com o objetivo de validar seu uso em programas alternativos na prevenção da cárie dental (BOTELHO; SOARES, 1994; BOTELHO, 2005). O enxagüatório bucal apresenta excelentes propriedades anti-cariogênicas, sendo efetivo contra os principais sorotipos de estreptococos acidogênicos responsáveis pelo início do processo de cárie dental e de gengivite (BOTELHO, 2005). Estudos recentes indicam um poder inseticida contra o mosquito transmissor da dengue e a potencialidade no combate ao dengue e ao mal de Chagas.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Plantas Medicinais**

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

### 3.1.1. A cromatografia gasosa do óleo essencial de *Lippia sidoides*

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

A composição química do óleo essencial foi determinada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) na Universidade Federal de Ceará, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) utilizando um SHIMADZU GCMS QP5050. A identificação dos constituintes foi executada a partir dos índices de retenção e interpretação visual dos espectros (ALENCAR et al., 1984). Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corpórea entre 150 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC e transferidas para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de 6 animais por gaiola. Todos receberam água e alimentação *ad libitum* e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

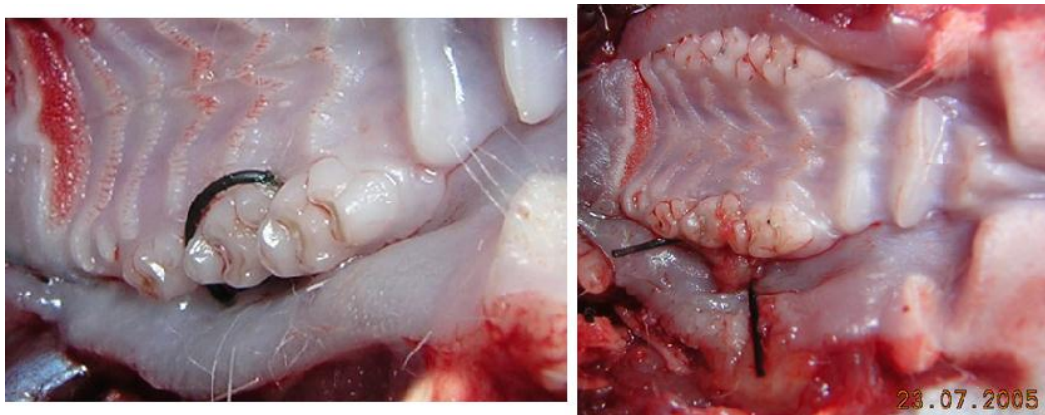
O protocolo experimental sob Número de registro 10/05 foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sendo realizado de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Conselho da Sociedade de Psicologia Americana (1980) para o uso de animais experimentais.

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

## 3.2. Protocolo Experimental

### 3.2.1 Modelo de Doença Periodontal Experimental (DPE)

Utilizou-se o modelo da Doença Periodontal Experimental (DPE), desenvolvido por vários autores (CRAWFORD et al., 1978; SAMEJIMA et al., 1990; KOIDE et al., 1995) e modificado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (BEZERRA et al., 2000), conforme a Figura 1.



**Figura 1 - Indução da Doença Periodontal Experimental (DPE).**

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral a 10% p/v (400 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.). Procedeu-se à indução da Doença Periodontal Experimental (DPE) através da inserção cirúrgica de um fio de sutura de náilon (3,0) ao redor do segundo molar superior esquerdo. Previamente à passagem do fio, utilizou-se uma guia nos espaços interproximais do dente supracitado, a fim de facilitar a colocação do fio. O guia foi adaptado de modo que o nó cirúrgico ficasse voltado para a face vestibular da boca do animal. Após 11 dias de aplicações com gel local (Figura 2), sacrificava-se o animal através de deslocamento cervical, sendo tal procedimento precedido por anestesia em câmara de éter.



Aplicação dos géis 3x ao dia

**Figura 2 – Tratamento com gel de alecrim pimenta na Doença Periodontal Experimental (DPE).**

### **3.3. Parâmetros avaliados**

#### **Análise da Estrutura Óssea Alveolar**

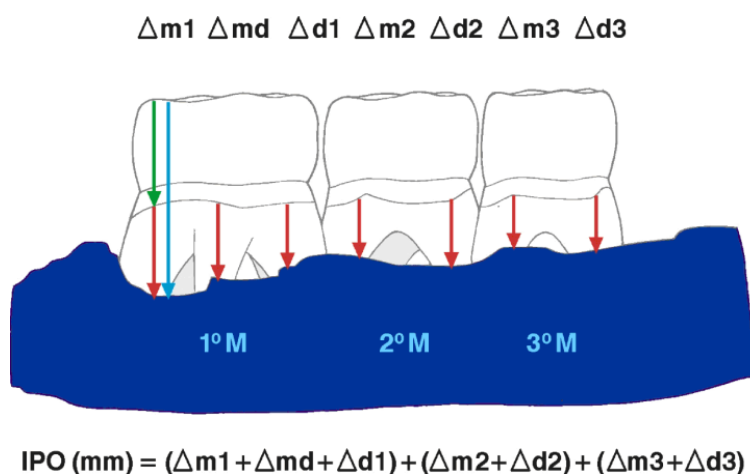
Para o estudo da estrutura óssea alveolar na doença periodontal experimental foram realizadas análises morfométrica e histopatológica. As hemiarcadas contra-laterais, ou seja, sem doença periodontal foram utilizadas como controle.

### Estudo Morfométrico do Tecido Ósseo na DPE

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

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

### Índice de Perda Óssea (IPO)



**Figura 3 - Desenho esquemático das medidas da reabsorção óssea: as diferenças (setas vermelhas,  $\Delta$ ) foram obtidas a partir das medidas feitas nas hemiarcadas com DPE (seta azul), subtraídas daquelas realizadas nas hemiarcadas contra laterais (seta verde, controle). A soma das sete variações correspondeu ao índice de perda óssea (IPO), expresso em mm.**

## **Análise microbiológica**

Realizou-se a análise microbiológica de animais normais (grupo *Naïve*) e de animais que foram submetidos à DPE e não foram tratados (NT), os que receberam gel veículo (V), gel de alecrim 0,5% (GAI), gel de Aroeira 5% (GAR), gel de Alecrim e Aroeira (0,5% e 5% mg/g - grupo GAA), gel de Carvacrol 300 µg/g (GCa), gel de Chalconas 600 µg/g (GCh), Carvacrol + Chalconas (300 e 600 µg/g grupo GCC) e gel de Doxíciclina 10% (GDx). Após o sacrifício dos animais, a gengiva da região de molares superiores esquerdos foi coletada, colocada assepticamente em 0,3 mL em meio de cultura líquido (BHI/DIFCO) e transportada imediatamente para o setor de Microbiologia.

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

## **Análise da variação da massa corpórea**

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

## **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (o erro padrão da média). Para comparações entre os grupos foram utilizados os métodos de Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni.

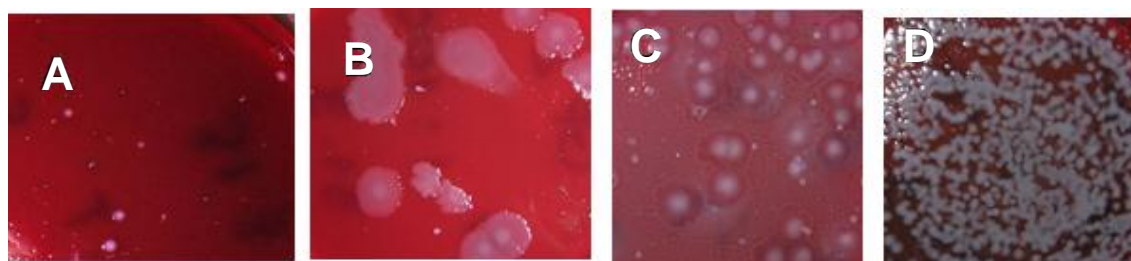
Nas análises histopatológicas, os dados obtidos foram expressos como mediana e o teste estatístico aplicado foi o de Kruskal-Wallis para dados não-paramétricos. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância de pelo menos 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

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

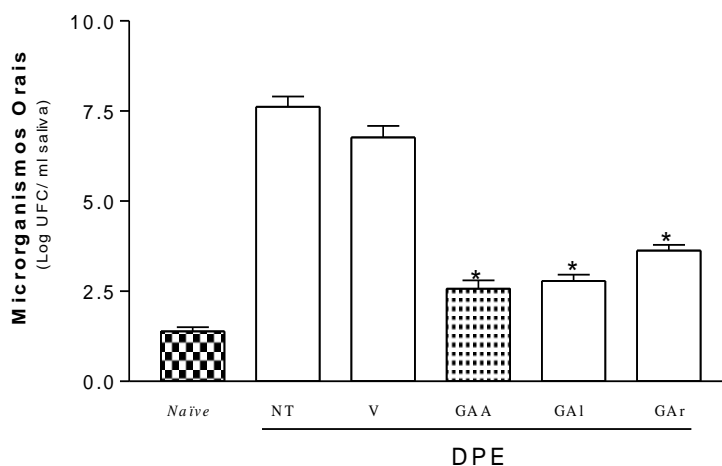
# **4. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS**

## **4.1. Efeito dos géis de Alecrim e Aroeira (GAA) sobre a flora microbiana na DPE**

Os resultados obtidos mostram que os géis de alecrim, aroeira e o gel misto de alecrim + aroeira foram capazes de inibir o crescimento de bactérias (Unidades Formadoras de Colônias - UFC) após semeadura do tecido gengival homogeneizado em placas petri com ágar sangue (Figuras 4 e 5).



**Figura 4 - Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias em ágar sangue.**  
A= (Gel de Alecrim - GAI) B= (Gel de Aroeira - GAR); C= (V) D= (NT).



**Figura 5 - Efeito antibacteriano do gel de Alecrim (GAI), gel de Aroeira (GAR) e gel de Alecrim+Aroeira (GAA) sobre os microrganismos envolvidos na DPE em ratos. Os géis veículo (V), CAA, GAI e GAR foram administrados de forma tópica na região gengival dos animais submetidos à DPE. O grupo não-tratados (NT) foi submetido à DPE, mas não recebeu tratamento. O grupo *Naïve* não recebeu nenhum tratamento e não foi submetido à indução de DPE. O símbolo asterisco indica uma diferença estatisticamente significativa entre grupos tratados e grupo veículo e NT (\* :  $P < 0,05$ ; teste de Bonferroni e ANOVA).**

## 5. CONCLUSÃO

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



## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R. J. M.; RODRIGUES, L. V.; VIANA, G. S. B. Análise clínica e morfológica da conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina e tratada com chalcona em cobaias. **Acta Cir. Brás.**, v. 19, n. 1, p. 43-48, 2004.
- ALENCAR, W. J.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats indices as preselecion routine in mass spectra library search of volatiles. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 3, p. 890-892, 1984.
- ANDRADE, A. M. **Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito dos bisfosfonato alendronato dissódico na doença periodontal experimental**. 2003. 112 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
- BEZERRA, M. M.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 5, p. 613-616, May 2002.
- BOTELHO, M. A. **Eficácia do Alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) no controle da placa bacteriana e gengivite: um ensaio clínico duplo cego controlado e randomizado**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G.; LEMOS, T. L.; MATOS, F. J.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 3, n. 40, p. 349-356, 2007a.
- BOTELHO, M. A.; BEZERRA-FILHO, J. G.; MONTENEGRO, D.; FONSECA, S. G. C.; GAPSKI, R.; BRITO, G. A. C.; HEUKELBACH, J. Effect of a novel mouthrinse based on *Lippia sidoides* Cham essential oil on bacterial plaque and gingivitis: a double-blinded randomized controlled trial. **J. Applied Oral Sci.**, 2007b. *In press*.
- BOTELHO, M. A.; RAO, V. S.; CARVALHO, C. B. M.; BEZERRA-FILHO, J. G.; FONSECA, S. G. C.; VALEB, M. L.; MONTENEGRO, D.; CUNHA, F.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J. Ethnopharmacol.**, 2007c. *In press*.
- BOTELHO, M. A.; RAO V.S.; NOGUEIRA, N. A.; BEZERRA-FILHO, J. G.; FONSECA, S. G. C.; MONTENEGRO, D.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. *Phytother. Res.*, 2007d. *In press*.
- BOTELHO, M. A.; SOARES, J. B. O óleo essencial do Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) na prevenção da cárie dental. In: ANAIS DO SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Fortaleza-Ce, 13, p. 201, 1994.
- LEMO, T. L. G.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; CLARCK, A.M.; MACCHESNEY, J. D. Antimicrobial activity of the essential oil of Brazilian plants. **Phytother. Res.**, v.10, n.4, p. 346-349, 1990.
- LINDHE, J.; KARRING, T. A anatomia do periodonto. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-42, 1999.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 344 p., 2000.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. 5th ed. Wayne, 2000.
- PAI, M. R.; ACHARYA, L. D.; UDUPA, N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel-a 6-week clinical study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, n. 1, p. 99-103, 2004.
- PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontology**, v. 24, p. 239-252, 2000.
- PETERSEN, P. E.; YAMAMOTO, T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Comm. Dent. Oral Epidemiol.**, v. 33, p. 81-92, 2005.
- RAMS, T. E.; SLOTS, J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. **Periodontology** 2000, v. 10, p. 139-159, 1996.

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