

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AUBERT KRISTHIAN SANTOS ALVES**

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DO GEL DE PRÓPOLIS VERMELHA  
ALAGOANA NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

MACEIÓ  
2020

**AUBERT KRISTHIAN SANTOS ALVES**

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DO GEL DE PRÓPOLIS VERMELHA  
ALAGOANA NA PROGRESSÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto

Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luiz Alexandre Moura Penteado

MACEIÓ

2020

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

A474i Alves, Aubert Kristhian Santos.  
Influência da aplicação tópica do gel de própolis vermelha alagoana na progressão da periodontite experimental em ratos / Aubert Kristhian Santos Alves. – 2021.  
61 f. : il. color.

Orientadora: Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto.  
Coorientador: Luiz Alexandre Moura Penteado.  
Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 50-60.  
Anexo: f. 61.

1. Doenças periodontais. 2. Própolis vermelha de Alagoas. 3. Gel (Farmacologia). 4. Reabsorção óssea. I. Título.

CDU: 615.454.1: 616.314

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores:

Professora Isabel Porto, cuja reputação de excelência a precede, sinto-me grato por suas exortações, pelas diversas palavras de ânimo nos momentos difíceis, pelo tempo, confiança e carinho dedicados durante as atividades de pesquisa, docência e orientação.

Professor Alexandre Penteado, cujos anos de admiração de sua atuação como docente e dentista, sua ética no tratar com os alunos, pacientes e colegas de trabalho me servem de guia para vida profissional. Trata-se de um dos grandes responsáveis pela minha escolha pela Periodontia e pela pesquisa.

Não há como eu colocar em uma página o verdadeiro “obrigado” pelos meses em que se dedicaram com organização, trabalho duro, disponibilidade e esforços para fazer esta dissertação possível. Sinto-me orgulhoso em ser reconhecido como aluno desses dois professores e, agora, amigo. A construção da amizade com vocês foi prazerosa e verdadeira.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. O alto nível dos professores e seus trabalhos engrandecem os discentes que passam pelo programa sobrepujando entraves do cotidiano em tempos de escassez de recursos para a pós-graduação.

Às colegas de turma do mestrado PPGCF pelo convívio durante 2 anos. Estou certo do sucesso acadêmico dessas grandes meninas.

A Daniel Ricarte, pela sempre presteza e cordialidade com que conduz a secretaria do PPGCF, do processo de seleção à defesa, é bom saber que podemos contar com um servidor tão dedicado e solícito.

Aos membros do Laboratório de Análises Farmacêuticas e Alimentícias, em especial Professor Ticiano Nascimento. Sinto-me grato pelo acolhimento e por contar com os valorosos apontamentos de um dos maiores conhecedores do tema própolis no mundo.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, pela valorosa colaboração em seu biotério. À Professora Êurica Nogueira, pela imensa gentileza que imprime exemplo de como contornar as limitações estruturais para se fazer pesquisa científica mediante às limitações impostas pelas políticas do país.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade pelo profissionalismo e colaboração essenciais para o resultado do estudo.

Aos membros do LAPEVI, na pessoa do Professor Enio Bassi por fornecer *insights* preciosos e pela colaboração em estudos imunológicos derivados da presente pesquisa.

Ao Professor Vânio Costa e à Nero Radiologia pela disponibilização de recursos da clínica radiológica e pela orientação crucial para os resultados alcançados.

Ao Professor Fernando Camello pelo seu sempre preciso conhecimento e presteza em ajudar, especialmente com o zelo pelo rigor metodológico.

Ao Professor Marcílio Peixoto, por apresentar a Farmacologia de forma empolgante e apaixonada no longínquo ano de 2003, semeando a vontade de me enveredar nesse caminho agreste e ao mesmo tempo fascinante das Ciências Farmacêuticas.

Às preciosas amigas dentistas do Corpo de Bombeiros Militar de Alagoas, Pollyanna e Edglei e à equipe do CEO - Messias, que me tornaram possível conciliar as atividades de pesquisa e clínica, sou grato por conviver rotineiramente com vocês.

Aos chefes dos serviços onde atuo profissionalmente: Ten Cel Helder Santana e Lidianne Rocha, pela prova de incentivo à formação continuada de seus liderados.

À Comissão de Ética no Uso de Animais, Biotério Central, ao Responsável Técnico de biotérios setoriais Bruno Wanderlei da Universidade Federal de Alagoas e à Professora Priscilla Marcellos pela seriedade nos princípios éticos no uso animal, pelo treinamento e assessoria acerca do manejo dos animais.

À FANUT - UFAL pela gentil cessão de equipamentos essenciais para a fase animal dos experimentos.

À Faculdade de Odontologia - UFAL. Fui invadido por um sentimento de felicidade em retornar a minha *alma mater* após 12 anos e reencontrar professores que forjaram em mim conhecimentos utilizados diariamente na prática profissional.

Aos alunos de iniciação científica Íris Alves e Wanderson Silva por compartilharem comigo tantas lutas e dificuldades para tornar possível a presente pesquisa. Tenho orgulho de vocês e sou grato por contribuir pelo futuro certamente promissor que alcançarão.

À banca examinadora, pelas relevantes sugestões ao trabalho, pela cordialidade nos apontamentos e pelo alto nível técnico valoroso como contribuição.

À farmácia Ao Farmacêutico e a Priscila Fonseca pela manipulação dos géis e gentil atendimento das dúvidas de técnica farmacêutica.

À comunidade apícola do Estado de Alagoas que, mesmo com incentivos governamentais escassos, beneficiam um produto único de altíssimo valor reconhecido e apreciado mundialmente. Que a pesquisa científica dê retornos que possam alavancar a apicultura como uma fonte de desenvolvimento regional.

*Dedico,*

*Ao Senhor, pela permissão e concessão da graça imerecida.*

*Quem poderá proclamar as proezas do SENHOR e apregoar todo o louvor que merece?*

*Salmos 106:2*

*“Nosso Senhor e nosso Deus, tu és digno de receber a glória, a honra e o poder, porquanto tu és o Criador de tudo e, por tua soberana vontade, tudo o que há, foi criado e veio a existir”.*

*Apocalipse 4:11*

*À minha amada esposa, cujo valor excede todos os tesouros. Por ter me apoiado, se excedido em atribuições e intercedido por mim em suas orações.*

*Aos meus filhos Júlia e Eric, pela renúncia involuntária a bons momentos em família e pela motivação de me tornar cada dia melhor.*

*À Lucy, pelo calor de sua companhia no isolamento.*

*Aos meus pais, pelo amor, exortação e apoio dados desde a mais tenra idade até os dias atuais. Aos meus irmãos, cada um à sua maneira, por me passar valores pelo exemplo.*

Própolis. Etimologia: grego.  
*pro* = defesa;  
*pólis* = cidade, comunidade

Pois eu serei, diz o Senhor, um **muro** de fogo em seu redor **[da cidade]** e eu mesmo serei, no meio dela, a sua glória.  
Zacarias 2:5

## RESUMO

As doenças periodontais compreendem patologias que causam a destruição progressiva de tecidos de sustentação e proteção dentária em indivíduos suscetíveis. Diversos agentes naturais têm sido usados como coadjuvantes para inibir a formação do biofilme oral e impedir a progressão da doença periodontal, sendo a própolis vermelha alagoana de especial interesse por seus efeitos imunomoduladores, antimicrobianos e anti-inflamatórios. Este estudo avaliou radiograficamente a ação da própolis vermelha no desenvolvimento da doença periodontal induzida por ligadura aplicada no primeiro molar inferior direito em ratos. O extrato etanólico de própolis vermelha alagoana foi caracterizado por UPLC-DAD e sua citotoxicidade foi testada em macrófagos J774.A1. Quarenta e dois ratos *Wistar*, divididos em grupos (n=6): Grupo C (sem tratamento); Grupo N (Natrosol - aplicação de gel a base de natrosol puro); Grupo CHX (Clorexidina - gel de clorexidina a 2%); Grupo PV10 (Gel de Própolis Vermelha a 10 mg/ml); Grupo PV15 (Gel de Própolis Vermelha a 15 mg/ml); Grupo PV10+CHX (Gel Própolis Vermelha 10 mg/ml + Clorexidina a 2%); Grupo PV15+CHX (Gel de Própolis Vermelha 15 mg/ml + Clorexidina a 2%) foram usados no estudo. Os géis foram aplicados diariamente, a partir da inserção da ligadura, por um período de 15 dias. Decorrido o tempo experimental, os animais foram eutanasiados e foram realizadas análises radiográficas por tomografia computadorizada *cone beam* para medir o suporte ósseo periodontal. Os valores obtidos passaram por análise de variância (ANOVA) seguida por *post-hoc* de Tukey. Os resultados obtidos indicaram a presença de flavonoides anti-inflamatórios e imunomoduladores, como a liquiritigenina, daidzeína, formononetina, isoliquiritigenina, pinobanksina, biochanina A e pinocembrina. O teste de citotoxicidade demonstrou a própolis vermelha alagoana como não tóxica em concentrações de até 10 µg/ml. A avaliação tomográfica evidenciou suporte ósseo remanescente significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos grupos que utilizaram própolis vermelha em relação aos grupos C e V, ao passo que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. Em conclusão, a aplicação de gel com própolis vermelha alagoana demonstrou efeito protetor para a reabsorção óssea decorrente de periodontite experimental similar à clorexidina, sendo um potencial agente terapêutico no manejo da doença periodontal.

**Palavras-chave:** Própolis. Periodontia. Reabsorção Óssea. Doenças Periodontais.

## ABSTRACT

Periodontal diseases are pathologies that cause progressive destruction of supporting and protection dental tissues in susceptible individuals. Several chemical agents have been used as adjuvants to inhibit the formation of oral biofilm and prevent the progression of periodontal disease. This study radiographically evaluated the action of Brazilian Red Propolis (BRP) in the progression of ligature-induced periodontal disease in rats. The ethanolic extract of BRP from Alagoas State was characterized by UPLC-DAD and tested for cytotoxicity in J774.A1 macrophages. Forty-two Wistar rats, divided into groups (n = 6): Group C (without treatment); Group N (Natrosol - pure natrosol gel application); CHX Group (Chlorhexidine - 2% chlorhexidine gel); Group PV10 (BRP gel at 10 mg / ml); Group PV15 (BRP gel at 15 mg / ml); Group PV10 + CHX (BRP 10 mg / ml + 2% chlorhexidine gel); Group PV15 + CHX (BRP 15 mg / ml + 2% chlorhexidine gel) were used in the study. The gels were applied daily, since the insertion of the ligature, for a period of 15 days. After the experimental period, the animals were euthanized and radiographic analyzes were performed using cone beam computed tomography to measure periodontal bone support. The values obtained were analyzed by variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc. The results obtained indicated the presence of anti-inflammatory and immunomodulatory flavonoids, such as liquiritigenin, daidzein, formononetin, isoliquiritigenin, pinobanksin, biochanin A and pinocembrin. The cytotoxicity test demonstrated BRP was non-toxic in concentrations up to 10  $\mu\text{g}$  / ml. The tomographic evaluation showed significantly more bone support ( $p < 0.05$ ) in the groups that used BRP in relation to the control and vehicle, whereas there was no statistically significant difference between the experimental groups. In conclusion, the application of gel with BRP from Alagoas demonstrated a protective effect against bone resorption due to experimental periodontitis similar to chlorhexidine, being a potential therapeutic agent in the management of periodontal disease.

**Keywords:** Propolis. Periodontics. Bone Resorption. Periodontal Diseases.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AVMA	<i>American Veterinary Medical Association</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CXCL1/KC	Ligante de Quimiocina 1
CXCL2/MIP-2	Ligante de Quimiocina 2
DO	Densidade Óptica
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HPLC High Alta Performance)	Performance Liquid Cromatography (Cromatografia Líquida de
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória (50%)
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio
NFAT c1	Fator Nuclear das Células-T Ativadas, citoplasmático 1
NF- $\kappa$ B	Factor Nuclear Kappa B
RANKL	Ativador de Receptor do Fator Nuclear Kappa-B ligante
TNF- $\alpha$ ,	Fator de Necrose Tumoral – alfa
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UPLC-DAD	Ultra-high <i>performance liquid chromatography with diode array detector</i> -Cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada com detector de redes de diodos

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-Abelha *Apis mellifera canica* em colmeia artificial carregando própolis na corbícula..... 15
- Figura 2-Abelha *Apis mellifera* em coleta de exsudato resinoso de caule de *Dalbergia ecastophyllum*. ..... 18
- Figura 3-Modelo de periodontite experimental por ligadura. A – Posicionamento e abertura de boca; B – Separação temporária entre o primeiro e segundo molares inferiores direitos com sonda exploradora Nº 5; C – Inserção de fio de sutura de seda 3-0 Subgingivalmente com auxílio de pinças kelly; D- Aspecto final da ligadura com nó simples na mesial do primeiro molar. .... 33
- Figura 4-Sequência de trabalho para mensuração de tomografias no software Anatomage Invivo6. A: Delimitação da curvatura do arco mandibular; B: Reconstrução panorâmica do arco mandibular; C: Cortes coronais sequenciais; Destaque em amarelo: Corte selecionado para medições. ... 36
- Figura 5-Cromatograma de EEP obtido por UPLC-DAD mostrando a identificação dos biodeterminação de marcadores da própolis vermelha em extrato etanólico (550µg). Foi confirmada a presença dos flavonoides (1) liquiritigenina (2) pinobanksina, (3) isoliquiritigenina (4) formononetina, (5) biocanina A e (6) pinocembrina no comprimento de onda de 280 nm..... 37
- Figura 6 - Viabilidade celular de macrófagos J774.A1 após exposição durante 48 h aos componentes dos géis. A: Própolis Vermelha Alagoana; B: Clorexidina; C: associação Própolis + Clorexidina. CN: Controle Negativo; DMSO: Dimetilsulfóxido; PV: Própolis Vermelha; CHX: Clorexidina. Símbolos diferentes representam diferença estatística significativa (ANOVA seguido de teste de Tukey)..... 38
- Figura 7-Aspecto macroscópico dos géis preparados. I – Imediatamente após abertura da embalagem; II – 30 dias após abertura da embalagem, armazenado em geladeira ( $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ); III – 30 dias após abertura da embalagem, à temperatura ambiente ( $24 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). A: Base de natrosol (veículo), B: Clorexidina 2% em natrosol, C: Própolis Vermelha 10mg/ml em natrosol, D: Própolis Vermelha 15mg/ml em natrosol, E: Própolis Vermelha 10mg/ml + Clorexidina 2% em natrosol, F: Própolis Vermelha 15mg/ml + Clorexidina 2% em natrosol..... 39
- Figura 8-Suporte Ósseo Periodontal remanescente após 15 dias de período experimental nos dentes do grupo controle (sem tratamento) com e sem ligadura (Teste t de Student). ..... 41
- Figura 9-Suporte Ósseo Periodontal remanescente, após 15 dias de período experimental, nos dentes sem ligadura. Comparação entre no grupo Controle (Sem tratamento) com os demais grupos experimentais ( $p=0,11$ ) (Teste t de Student)..... 41

Figura 10-Suporte Ósseo Periodontal remanescente entre os grupos após 15 dias de permanência da ligadura. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância. C: Sem tratamento; N: Natrosol (Gel veículo); PV10: Própolis 10mg/ml; PV15: Própolis 15mg/ml; CHX: Clorexidina 2%; PV10+CHX: Própolis 10mg/ml + Clorexidina 2%; PV15+CHX: Própolis 15mg/ml + Clorexidina 2% (ANOVA).  
.....41

Figura 11-Imagens representativas de tomografia computadorizada cone-beam (cortes coronais). 1:Sem ligadura; 2: Sem tratamento; 3: Natrosol (Gel veículo); 4: Própolis 10mg/ml; 5: Própolis 15mg/ml; 6: Clorexidina 2%; 7: Própolis 10mg/ml + Clorexidina; 8: Própolis 15mg/ml; 6: Clorexidina 2%; 7: Própolis 10mg/ml + Clorexidina; 8: Própolis 15mg/ml + Clorexidina 2%. ...42

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
1.1	Própolis .....	15
1.2	Própolis Vermelha Alagoana.....	18
1.3	Periodontite.....	21
1.4	Uso do Própolis no Tratamento de Periodontites.....	24
1.5	Modelos Animais de Periodontite Experimental.....	26
2	OBJETIVOS.....	28
2.1	Geral.....	28
2.2	Específicos.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
3.1	Preparação do Extrato Etanólico Bruto da Própolis .....	29
3.2	Reagentes.....	29
3.3	Determinação dos Compostos do Extrato Etanólico de Própolis por Cromatografia Líquida .....	29
3.4	Teste de Citotoxicidade.....	30
3.5	Preparação dos Géis e Caracterização Organoléptica .....	31
3.6	Modelo de Periodontite Experimental em Ratos .....	31
3.7	Procedimento Experimental.....	33
3.8	Avaliação do Suporte Ósseo Remanescente por Tomografia Computadorizada.....	35
4	RESULTADOS.....	37
4.1	Análise Cromatográfica.....	37
4.2	Teste de citotoxicidade .....	38
4.3	Estabilidade Física Macroscópica.....	39
4.4	Avaliação do Suporte Ósseo Remanescente por Tomografia Computadorizada.....	40
5	DISCUSSÃO .....	43
6	CONCLUSÃO .....	49
	ANEXO.....	61
	Anexo Único: Certificado CEUA – UFAL.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais compreendem patologias que acometem o tecido de proteção e sustentação dentária e dependem da ação de complexos bacterianos específicos e da resposta inflamatória do hospedeiro aos desafios apresentados pela carga bacteriana presente. Løe, Theilade e Jensen (1965) definiram a placa, atualmente, biofilme bacteriano, como fator etiológico primário das doenças periodontais. O biofilme no sulco gengival ou bolsa periodontal promove a liberação de toxinas microbianas e, com o objetivo de impedir a proliferação e invasão dos tecidos por parte dos microrganismos, o hospedeiro responde com processos inflamatórios e secreção de mediadores imunológicos, o que, de forma crônica, tem a capacidade de ocasionar destruição tecidual e perda de inserção dentária em indivíduos suscetíveis (AZUMA, 2006). Sendo assim, a progressão e as sequelas das doenças periodontais podem resultar em perda dentária afetando a fonética, nutrição, qualidade de vida, e autoestima, além de apresentar potencial para causar inflamação sistêmica (GAFFEN *et al.*, 2014).

Desta forma, o foco do tratamento periodontal está na remoção e controle da formação de biofilme bacteriano nas superfícies dentárias, objetivo efetivamente conseguido por meio da técnica de raspagem e alisamento radicular (BADERSTEN; NILVEUS; EGELBERG, 1984). Porém, em diversos casos, a terapia mecânica isoladamente pode não oferecer todas as condições de eliminar os patógenos periodontais (HAFFAJEE, 2003). Assim, o uso de antimicrobianos locais e/ou sistêmicos como adjuntos para eliminar periodontopatógenos pode ser indicado como preventivo ou auxiliar no tratamento da doença periodontal (HAFFAJEE; SOCRANSKY; GUNSOLLEY, 2003).

Substâncias naturais como a própolis têm sido utilizadas largamente na medicina popular e poderiam ser usadas também na prevenção da doença periodontal, devido as suas atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomoduladora (SONMEZ *et al.*, 2005; STEPANOVIĆ *et al.*, 2003).

## 1.1 Própolis

A própolis é uma substância natural pegajosa, também conhecida como “cola das abelhas”. Sua denominação decorre da junção das palavras gregas *pro* (significa na entrada, parede externa ou defesa) e *polis* (significa cidade), inferindo sua função defensiva na colmeia. É sintetizado pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir de produtos coletados de exsudatos, resinas, seivas, brotos e outras fontes vegetais com a adição de enzimas salivares, em específico a  $\beta$ -glicosidase (GROOT, 2013). O conteúdo extraído é deslocado da boca às patas traseiras e transportados pelas corbículas, parte tibial de suas patas (Fig. 1). Na colmeia, esse substrato resinoso é hidrolisado por enzimas salivares e misturado à cera (MEYER; ULRICH, 1956; GHISALBERTI, 1979; SFORCIN, 2016).

**Figura 1**-Abelha *Apis mellifera canica* em colmeia artificial carregando própolis na corbícula.



Fonte: Retirado de Burlew (2018).

Para o enxame, a própolis funciona como um agente defensor imunológico social com uma vastidão de funções incluindo: impermeabilização de paredes, selamento e reparo de fissuras, isolante térmico, redutor de umidade, mumificação

de insetos e outros invasores e como agente antifúngico e antibacteriano, contribuindo para a assepsia interna da colmeia. Destacam-se as recentes descobertas relacionadas à ativação de respostas imunogênicas na colônia e à capacidade de “embalsamento” de pólen coletado contaminado por pesticidas (SIMONE-FINSTROM *et al.*, 2017).

O aspecto físico da própolis bruta é endurecido e friável quando fria, assumindo conformação macia e pegajosa quando aquecida. Apresenta aroma característico e agradável com aspecto visual variado a depender da origem geográfica, fonte e idade, com coloração verde, amarela, marrom ou vermelha (GROOT, 2013).

Civilizações antigas conheciam a própolis tão remotamente quanto o mel. O povo judeu antigo já atribuía à substância propriedades terapêuticas e o usava em incensos cerimoniais e unguento medicinal, sendo um possível ingrediente do valioso Bálsamo de Gileade citado no Antigo Testamento (BÍBLIA, 2008). Os egípcios utilizavam própolis para o processo de mumificação, impedindo a decomposição dos corpos. Porém, os gregos e os romanos foram os que mais utilizaram própolis em preparações e aplicações diversas, tais como o tratamento de úlceras, feridas, remoção de corpos estranhos, dispersão de tumores, alívio de dores tendíneas e outras aplicações. Constam nos escritos e farmacopeias de Aristóteles, Hipócrates, Dioscórides, Plínio, o velho e Cornelius Celso, formulações e terapias utilizando-se de própolis. Na Idade Média, o interesse pelo uso da própolis decaiu, sendo mantido pelos árabes até o ressurgimento de pesquisas acerca de sua composição no século XIX (FOKT *et al.*, 2010; KUROPATNICKI; SZLISZKA; KROL, 2013).

Os benefícios biológicos da própolis têm sido largamente explorados em diversas áreas das ciências da saúde e utilizados como um recurso importante na prevenção e tratamento de manifestações sistêmicas e orais. As principais propriedades incluem propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (GROOT, 2013), além de efeito modulador / estimulador imunológico, antitumoral com potencial antimutagênico e anticarcinogênico (SFORCIN, 2007), antioxidante (ZABAIU *et al.*, 2017), hepatoprotetor (KAYA; YILMAZ; CERIBASI, 2019), antiulcerogênico (PAULINO *et al.*, 2015) e cicatrizante (OLCZYK *et al.*, 2014).

A composição da própolis consiste basicamente em resina (50%), cera (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e outros compostos orgânicos (PASUPULETI et al., 2017). Dentre estes componentes orgânicos, mais de 300 substâncias foram identificadas, e sua determinação e quantificação dependem principalmente da fonte vegetal e da flora local (SFORCIN, 2007), além de apresentar variações num mesmo tipo de própolis, num indicativo de interferência de fatores ligados à sazonalidade (TEIXEIRA et al., 2010). Por outro lado, em um estudo avaliando a diferença sazonal na composição da própolis na Polônia, foi detectada similaridade na composição ao longo das estações, ao passo que, não houve diferença no poder antioxidante entre as amostras colhidas em diferentes meses (WOŹIAK et al., 2019). Os principais componentes orgânicos identificados nos diversos tipos de própolis incluem flavonóides, ácidos graxos, ésteres, terpenóides e outros (HU et al., 2005).

Por meio de técnicas variadas como espectroscopia de massa, ressonância magnética nuclear e cromatografia gasosa é possível identificar vários grupos de compostos ativos. De fato, comparar os efeitos de própolis de diferentes partes do mundo sem caracterizá-los, seria similar a comparar a ação de duas famílias de plantas diferentes. Portanto, as publicações recentes sobre atividade biológica da própolis devem incluir algum tipo de caracterização e quantificação de seus componentes por método analítico adequado (BANKOVA, 2005a).

A heterogeneidade de origem e composição das própolis implica em inúmeros tipos espalhados pelo mundo e conseqüente diferenças em suas ações biológicas. Por exemplo, na Europa, em zonas temperadas, ao usar seiva de árvores do gênero *Populus*, a própolis feito pelas abelhas daquela região resulta em uma concentração maior de flavonoides agliconas, ácidos fenólicos e ésteres (BANKOVA et al., 2002).

No Brasil, foram identificados 13 tipos de própolis, sendo os mais estudados o tipo verde, com fonte nos produtos da folha *Baccharis dracunculifolia* (SALATINO et al., 2005), a marrom, derivada das espécies *Copaifera* (SALOMÃO et al., 2008) e a

vermelha, obtida da *Dalbergia ecastophyllum* (L) (SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2019).

**Figura 2-**Abelha *Apis mellifera* em coleta de exsudato resinoso de caule de *Dalbergia ecastophyllum*.



Fonte: Lustosa (2007).

## 1.2 Própolis Vermelha Alagoana

A variante vermelha da própolis é o 13º tipo de própolis encontrado no Brasil, nos Estados de Sergipe, Alagoas, Bahia, Pernambuco e Paraíba, em regiões de manguezais na área costeira. Sua fonte vegetal é a planta conhecida como rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub.) da família Fabaceae (SILVA et al., 2008; DAUGSCH et al., 2008). O Instituto Nacional de Propriedades Industriais concedeu recentemente a Denominação de Origem produtora de própolis vermelha para os municípios do litoral e complexo estuarino lagunar no Estado de Alagoas, sendo este Estado o único produtor mundial certificado de própolis vermelha (SEBRAE, 2016).

Muitos dos componentes identificados na própolis vermelha alagoana não foram reconhecidos nos outros tipos de própolis brasileiras, o que a distingue em composição (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). Dos compostos que foram

identificados na própolis vermelha, incluem-se: flavonoides, terpenos, chalconas e taninos (SILVA et al., 2008; (MAYWORM et al., 2014). São considerados marcadores químicos da própolis vermelha alagoana os isoflavonóides formononetina, biochanina A, pinocembrina e medicarpina (TRUSHEVA et al., 2006; ALENCAR et al., 2007; ALMEIDA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018; PORTO et al., 2018).

A composição química peculiar da própolis vermelha em relação aos outros tipos de própolis é atribuída como fator responsável pelos efeitos farmacológicos desta substância (BUENO-SILVA et al., 2013a).

De maneira similar aos outros tipos de própolis, a própolis vermelha está sujeita às variações de sazonalidade. Em um estudo de análise por cromatografia líquida de alta performance, a própolis coletada na temporada seca teve quase o dobro de ácido clorogênico, ácido caféico e ácido elágico do que na estação chuvosa, ao passo que nesta última as concentrações de luteolina e apigenina foram maiores. A diferença sazonal também implicou em oscilação na atividade antibacteriana (BUENO-SILVA et al., 2016; REGUEIRA et al., 2017). Foi demonstrado que o clima, sobretudo incidência solar e precipitação chuvosa, é capaz de influenciar na concentração dos compostos fenólicos e estes, por sua vez influenciam na atividade biológica da própolis vermelha (NASCIMENTO et al. 2019).

Com relação à atividade antibacteriana, os mecanismos de ação foram atribuídos sobretudo à presença dos flavonoides. Acredita-se que atuam por dano à membrana plasmática diminuindo sua fluidez e permeabilidade, por inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição energética e inibição de mecanismos de adesão e formação de biofilme (XIE et al., 2014; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). De maneira similar, a atividade antifúngica também está correlacionada a danos à parede celular dos fungos, alterando sua permeabilidade (PIPPI et al., 2015; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

A atividade anti-inflamatória e imunomoduladora da própolis vermelha foi atribuída a diversos mecanismos. A própolis vermelha brasileira foi efetiva em reduzir o influxo neutrofílico ao sítio inflamatório através da liberação reduzida de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, assim como reduzir a quimiotaxia neutrofílica através do bloqueio de influxo de cálcio (BUENO-SILVA *et al.*, 2016). Os flavonoides neovestitol e vestitol, isolados da própolis vermelha, apresentaram efeitos anti-inflamatórios *in vivo*, inibindo a migração neutrofílica com potência similar à dexametasona (BUENO-SILVA *et al.*, 2013b). Outros compostos isolados da própolis vermelha foram testados quanto a efeitos anti-inflamatórios, podendo ajudar a explicar alguns mecanismos de ação anti-inflamatória. Esses mecanismos incluem, inibição da via ciclooxigenase, inibição de citocinas pró-inflamatórias, redução da ativação da via do óxido nítrico, redução da migração e adesão celular entre outros (HU *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012; SOROMOU *et al.*, 2012; 2013; MING *et al.*, 2015; UCHINO *et al.*, 2015).

A atividade antioxidante de uma substância diz respeito à sua capacidade de sequestrar radicais livres, os quais possuem capacidade de causar dano ao DNA e atuam no processo de carcinogênese. Sendo assim, antioxidantes possuem papel citoprotetor, no sentido de interceptar a ação de radicais livres e contribuir para a reparação de danos ao DNA e outras estruturas celulares (MENDONÇA *et al.*, 2015).

Quando medida por sequestro de radical DPPH, frações da própolis vermelha demonstraram atividade antioxidante de até 80%, enquanto que pelo método da inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, essa capacidade foi aferida em até 61% (CABRAL *et al.*, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2015). A EC<sub>50</sub> ficou determinada em 3,97  $\mu$ g/mL pelo método DPPH (SILVA *et al.*, 2019). Os flavonoides presentes na própolis vermelha foram apontados como responsáveis pela atividade antioxidante, dentre eles pode-se citar quercetina, daidzeína, apigenina, isoliquiritigenina e pinobanksina (KAMIYA *et al.*, 2012)

Outra atividade largamente pesquisada da própolis vermelha é a capacidade antiproliferativa, importante propriedade farmacológica antitumoral. A maioria dos estudos dos efeitos antiproliferativos demonstram a ação da própolis vermelha em ensaios *in vitro* de citotoxicidade contra uma variedade de células tumorais. Ademais, esta citotoxicidade mostrou-se seletiva, com eficácia comparada a drogas anticâncer usadas clinicamente (LI *et al.*, 2008). Os principais mecanismos pelos quais a própolis exerce suas atividades antitumorais incluem a antiangiogênese, indução de apoptose, inibição de vias metabólicas e do desenvolvimento tumoral (BEGNINI *et al.*, 2014; RAVISHANKAR *et al.*, 2015; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

### **1.3 Periodontite**

A periodontite é uma doença bucal inflamatória que se caracteriza pela perda de tecidos do periodonto de proteção e sustentação dos dentes, nomeadamente a gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar em indivíduos suscetíveis (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). As doenças periodontais, incluindo a periodontite, são iniciadas e progredem mediante a presença de biofilme microbiano específico aderido à superfície dentária, que concorre para o desequilíbrio ou ruptura da resposta imune do hospedeiro, podendo acarretar em um processo inflamatório destrutivo (DARVEAU, 2010).

Embora a principal causa de perdas dentárias seja atribuída à cárie em adultos jovens, a periodontite corresponde como principal motivo para extrações dentárias na população acima dos 40 anos de idade (MCCAUL; JENKINS; KAY, 2001; MONTANDON; ZUZA; TOLEDO, 2012; CHAVA; NUUVULA; NUUVULA, 2015). Nos Estados Unidos, baseados em dados coletados no NHANES 2009-2014, 42% dos adultos acima de 30 anos de idade tinham periodontite. Estima-se em 7,8% o quantitativo de adultos americanos com periodontite classificada como “severa” (EKE *et al.*, 2018). No Brasil, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde Bucal, SB-Brasil, realizada em 2010, a prevalência de doença periodontal classificada como “moderada a grave” foi de 15,3% na população adulta, ao passo que a

estimativa para a doença classificada como “grave” foi de 5,8% (VETTORE; MARQUES; A PERES, 2013). Um estudo de coorte populacional no Sul do Brasil demonstrou que 56% dos indivíduos apresentaram progressão da perda de inserção periodontal de  $\geq 3$ mm em dois ou mais dentes após um período de 5 anos (HASS *et al.*, 2015). Globalmente estima-se um percentual de 10 a 15% da população apresentando formas avançadas de periodontite (KASSEBAUM *et al.*, 2014)

Embora não se atribua a patogênese da periodontite a um patógeno específico e nem se saiba as funções microbianas específicas envolvidas no processo destrutivo da progressão da doença, associa-se mais frequentemente os periodontopatógenos *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *T. denticola* do complexo vermelho com sítios em estágios bem estabelecidos da doença crônica (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Além destes, *C. rectus*, *Eikenella corrodens*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. micros* e *Eubacterium spp.* estão presentes. Com o avançar da doença, o complexo bacteriano subgingival aumenta em número e vai ocupando uma posição cada vez mais apical, à medida que, a bolsa periodontal torna-se mais profunda. Além disso, algumas espécies, como *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* tem capacidade comprovada de invasão dos tecidos, sendo um importante fator de virulência para apresentações mais severas ou agressivas da doença (HASHIM, 2018). A presença de vírus herpes, como Epstein-Barr 1 (EBV-1) e Citomegalovírus (HCMV) também foi detectada, apesar de seus papéis não estarem claros na patogênese das doenças periodontais (POPOVA; DOSSEVA-PANOVA; PANOV, 2013).

A inflamação estabelecida afeta o equilíbrio homeostático da remodelação óssea, acentuando a atividade de osteoclastogênese e reabsorção óssea (GRAVES; OATES; GARLET, 2011; EBERSOLE *et al.*, 2017). De fato, os osteoclastos são os tipos celulares que respondem pela sequela clínica mais comum da periodontite: a perda óssea alveolar, já que são observados em número excessivo e com atividade exacerbada em sítios com inflamação induzida e, contrariamente, mediante bloqueio

de seu desenvolvimento e atividade, a perda óssea é também inibida (TENG *et al.*, 2000; LIU; LERNER; TENG, 2010).

Os mecanismos pelos quais os osteoclastos se diferenciam e são ativados para exercerem reabsorção óssea dependem do estímulo de componentes bacterianos, sobretudo lipopolissacarídeos (LPS), que podem induzir a linhagem de linfócitos T Th1, monócitos, macrófagos e fibroblastos a aumentarem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , osteoprotegerina, RANKL e prostaglandina E2, desencadeando uma cascata que resultará em danos irreversíveis ao suporte alveolar (BARTOLD; VAN DYKE, 2013; HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2015).

O objetivo do tratamento periodontal é o debridamento do biofilme gengival com o objetivo de controlar a resposta inflamatória provocada no hospedeiro pelo desafio microbiano, interrompendo a progressão da doença e oferecendo condições ao paciente para manter a saúde e função da dentição (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Os procedimentos para atingir tal objetivo inclui primordialmente a terapia não-cirúrgica, na qual o biofilme e cálculo é controlado por remoção mecânica (raspagem e alisamento radicular) realizada por instrumentos manuais ou ultrassônicos, especialmente na região subgengival (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005). Os resultados clínicos apontam que, combinada à motivação do paciente nos cuidados domésticos e ao comprometimento na manutenção, a terapia não-cirúrgica mostra-se eficaz em acompanhamentos de longo prazo (APATZIDOU; KINANE, 2010).

A terapia não cirúrgica apresenta, porém, limitações para o sucesso. Mesmo sob execução de um meticuloso controle mecânico, alguns pacientes podem não apresentar a resolução da inflamação com conseqüente progressão da doença periodontal. Estão relacionados com o insucesso na terapia mecânica fatores como: profundidade das bolsas, virulência bacteriana, fatores anatômicos locais, resposta imune do hospedeiro e refratariedade da doença (KAPOOR *et al.*, 2012).

Portanto, com o objetivo de otimizar os efeitos do debridamento mecânico, outras terapias, como o uso de antibióticos locais ou sistêmicos, substâncias imunomoduladoras e anti-inflamatórias, são utilizadas em conjunto com a raspagem e alisamento radicular. Uma variedade de antibióticos vem sendo apresentada para tratar periodontite: amoxicilina, metronidazol, azitromicina, doxiciclina e tetraciclina, com maior força de evidência apontando para efeitos positivos do uso da associação de amoxicilina com metronidazol (FERES et al., 2014; WALTERS; LAI, 2015). Porém, os esquemas terapêuticos de uso de antibióticos apresentam desvantagens como baixa adesão dos pacientes a protocolos longos e com muitas doses e podem incluir efeitos adversos como reações de hipersensibilidade e transtornos gastrointestinais, além da preocupação com resistência microbiana (MUNIZ *et al.*, 2013).

Adicionalmente, já que a periodontite resulta da resposta inflamatória excessiva do hospedeiro, parece razoável a tentativa do uso de adjuntos no intuito de controlar a inflamação. Neste sentido, encontra-se na literatura estudos que avaliam a ação de polifenóis derivados de produtos naturais, especialmente os diversos tipos de flavonoides (BUNTE et al., 2019; PALASKA et al., 2013).

Com o objetivo de mitigar ou eliminar os efeitos adversos do uso de antimicrobianos ou modular a resposta inflamatória do hospedeiro, a literatura aponta estudos com produtos naturais como adjuvantes ao tratamento periodontal, com destaque para fitoterápicos como aroeira (*M. urundeuva*), alecrim (*L. sidoides*), *Ginkgo biloba* e própolis (FREIRES; ROSALEN, 2016; FREIRES *et al.*, 2018).

#### **1.4 Uso do Própolis no Tratamento de Periodontites**

Quando administrada sistemicamente em ratos submetidos a periodontite induzida por ligadura, a própolis foi capaz de reduzir a perda óssea, diminuir a contagem de osteoclastos e aumentar a atividade osteoblástica (TOKER *et al.*, 2008). De maneira similar, quando aplicada topicamente na forma de extrato alcoólico, a própolis vermelha foi capaz de reduzir a progressão da doença

periodontal em ratos, apresentando menor perda óssea medida radiograficamente (RIBEIRO *et al.*, 2015).

Foi demonstrado que fibroblastos do ligamento periodontal são essenciais para a regeneração dos danos causados pela doença periodontal, modulando a diferenciação osteogênica (KOOK *et al.*, 2014). Em cultura celular *in vitro*, fibroblastos do ligamento periodontal expostos a extrato de própolis apresentaram apoptose reduzida, aumento da atividade metabólica e proliferação quando comparados aos fibroblastos expostos a solução salina balanceada de Hanks (GJERSTEN *et al.* 2011).

A eficácia antimicrobiana *in vitro* do extrato de própolis vermelha em inibir a formação global do biofilme foi similar à da clorexidina, ao passo que o apicêutico apresentou melhores resultados na redução da população bacteriana do complexo laranja, usualmente associado a estágios de periodontite estabelecida (MIRANDA *et al.*, 2019). De maneira similar, Aslani & Malekpour (2016) formularam um gel mucoadesivo contendo própolis do Irã e testaram sua eficácia contra *Porphyromonas gingivalis*, obtendo redução significativa no crescimento *in vitro* da cepa testada.

A irrigação subgengival com extrato de própolis, após raspagem e alisamento radicular, demonstrou ser mais efetiva do que o tratamento mecânico isolado, apresentando melhora significativa em parâmetros microbiológicos (redução de bactérias anaeróbias totais e *P. gingivalis*) e clínicos (diminuição de sítios com sangramento à sondagem) (COUTINHO, 2012).

Nakao *et al.* (2020) compararam a ação tópica de gel de própolis a 1% derivada de brotos de *Baccharis dracunculifolia*, gel contendo extrato de folhas de caril e com gel de minociclina em pacientes com periodontite crônica em fase de terapia de suporte. Os pacientes que receberam gel com própolis obtiveram diminuição na profundidade de sondagem e na perda de inserção, ao passo que os pacientes que receberam minociclina diminuiram apenas a profundidade de sondagem e os pacientes que receberam gel com folhas de caril não melhoraram em ambos os critérios.

## 1.5 Modelos Animais de Periodontite Experimental

Na pesquisa em Periodontia, os modelos animais são essenciais para esclarecer a relação entre as doenças e fatores externos e para testes de novas terapias (VARGAS-SANCHEZ *et al.*, 2017). Foram descritos diversos modelos de indução de periodontite e defeitos periodontais em animais como ratos, coelhos, porcos, cães e primatas não-humanos. Dentre estes, o modelo em ratos é frequentemente usado, dada sua disponibilidade quanto a relação custo-benefício, facilidade de manuseio, possibilidade de padronização experimental e similaridade genética entre os indivíduos (PELLEGRINI *et al.*, 2009; SEOL *et al.*, 2010). Além disso, já foi classicamente demonstrada a similaridade entre os tecidos periodontais humanos e dos ratos (LISTGARTEN, 1975; STRUILLOU *et al.*, 2010). Porém, permanecem como desvantagens as dimensões reduzidas da anatomia local, o que dificulta a realização de possíveis procedimentos cirúrgicos experimentais, além do fato de os ratos não serem naturalmente susceptíveis à doença periodontal, necessitando ser induzida experimentalmente (PELLEGRINI *et al.*, 2009).

Para a indução experimental de periodontite em roedores, os métodos mais comuns são a inserção de ligadura no sulco gengival ao redor de um ou mais dentes, a inoculação de LPS diretamente no periodonto e a inoculação de periodontopatógenos específicos (GRAVES *et al.*, 2008; VARGAS-SANCHEZ *et al.*, 2017). Os resultados obtidos, porém, são mais representativos da periodontite em humanos quando o modelo utilizado é o de ligadura, especialmente em experimentos em curto prazo. Tal fato é atribuído principalmente à reprodução do acúmulo de biofilme na ligadura em contato com o periodonto, à participação de vários microrganismos vivos e diversos fatores de virulência além dos LPS, resultando em uma resposta do hospedeiro mais complexa do que a inoculação de LPS (AQUINO *et al.*, 2009; MOLON *et al.*, 2014).

Similarmente, o modelo por ligadura parece ser mais representativo do que a monoinfecção por inoculação de microrganismos presentes em humanos, mas

ausentes em roedores. A diversidade da microbiota do roedor, auxiliada pelo acúmulo de biofilme pela retenção mecânica da ligadura, leva a uma complexidade de antígenos interagindo com o sistema imunológico do hospedeiro (SOUZA *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que o modelo de periodontite experimental por ligadura induz a reabsorção óssea já nas primeiras 24 horas, sendo por isso um modelo consistente não apenas para reproduzir a reabsorção alveolar, mas também gerando diminuição do tecido conjuntivo e infiltração celular inflamatória (MOLON *et al.*, 2018).

Os períodos experimentais diferem entre os diversos estudos, variando de 6 a 60 dias (FERNANDES *et al.*, 2010; HOSADURGA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017; ÖZDEN *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2019), porém, foi observado que, em um período inicial de 15 dias de permanência da ligadura, o modelo demonstra uma fase aguda, com intensa expressão gênica de citocinas inflamatória e reabsorção óssea ativa quando medida radiograficamente ou por morfometria. Após este período, inicia-se uma fase distinta de inflamação crônica, com redução significativa da progressão da perda óssea (KUHR *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2011; VARGAS-SANCHEZ *et al.*, 2017; MOLON *et al.*, 2018).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Investigar a eficácia da própolis vermelha em inibir a progressão da doença periodontal induzida em ratos.

### **2.2 Específicos**

- a) Determinar o perfil cromatográfico do extrato etanólico de própolis vermelha;
- b) Descrever as propriedades organolépticas dos géis preparados e do veículo;
- c) Avaliar a citotoxicidade in vitro dos componentes dos géis preparados;
- d) Analisar o suporte ósseo alveolar remanescente nas amostras nos diversos grupos experimentais e controle.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Preparação do Extrato Etanólico Bruto da Própolis**

A própolis bruta (250g) foi coletada do apiário Ilha do Porto, Marechal Deodoro, Alagoas, Brasil (coordenadas geográficas 9°44.555' S, 35° 52.080' O, 18,1m de altitude em relação ao nível do mar) durante o mês de julho de 2016. A matéria bruta foi triturada manualmente e depositada em um frasco contendo 600 mL de etanol 80% e permaneceu em agitador (Thornton, Modelo T14, EUA), por 48 horas. Decorrido este período, o macerado (parte líquida) foi retirado com uma pipeta e compôs uma primeira extração, ao passo que a massa sólida passou por uma re-extração com 600 mL de etanol 80% em recipiente de vidro. A mistura foi deixada novamente no agitador durante 24 horas e ao fim desse tempo, mantida sem agitar por mais 24 horas.

Após esse período, o macerado foi novamente retirado com uma pipeta, reunido com a primeira extração, filtrado em filtro de papel e levado para destilação sob pressão reduzida no rotaevaporador (Fisatom, EUA), em banho-maria, com temperatura entre 80°C e 90°C e pressão de 650mm de mercúrio, a uma velocidade de 80-90 rpm, para a retirada do solvente. Ao fim desse processo, o extrato etanólico de própolis (EEP) foi depositado em recipiente de vidro e submetido a evaporação espontânea do solvente, (aproximadamente por três dias) quando assumiu um aspecto semi-sólido (MENDONÇA *et al.*, 2015).

#### **3.2 Reagentes**

Padrões analíticos: pinobanksin, isoliquiritigenina, formononetina e biochanina A foram purificados a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e liquiritigenina foi adquirido da Extrasynthese (Lyon, França). O acetonitrila de grau HPLC foi adquirido de J. T. Baker Mallinckrodt-Avantor (NJ, EUA).

#### **3.3 Determinação dos Compostos do Extrato Etanólico de Própolis por Cromatografia Líquida**

O perfil cromatográfico do extrato etanólico de própolis foi realizado com cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada com detector de redes de diodos - UPLC-DAD (Shimadzu, Tokio, Japão). O UPLC-DAD foi composto pelos

seguintes módulos: bomba de alta pressão (modelo LC-20ADRX), degaseificador (modelo DGU20A3R), auto-injetor (modelo SIL-20AgXR), coluna cromatográfica, detector de rede de diodos (modelo EPDM-20A), detector de fluorescência (modelo RF-20A), controlador (modelo CBM-20A) e o software Lab solutions da Shimadzu.

A separação de flavonoides e outros constituintes ocorreu usando uma coluna de fase reversa (C<sub>18</sub>, 150 × 4,6 mm; 5 µm) Phenomenex (Torrance, CA, EUA), uma fase móvel composta pelo solvente A (água Milli-Q) e solvente B (acetonitrila), bombeado a uma taxa de fluxo de 0,3 ml /min. O gradiente inicial de eluição consistiu em água (70%) e acetonitrilo (30%) (V / V). A coluna foi eluída com uma porcentagem de variação (B) da seguinte maneira: 0–2 min 30% de B, 2–5 min 36% de B, 5–8 min 46% de B, 8–11 min 52% de B, 11 a 14 minutos 52% de B, 14 a 17 minutos 57% de B, 17 a 20 min 62% de B, 20–24 min 62% de B, 24–28 min 68% de B, 28-32 min 72% de B, 32-36 min 90% de B, 36-42 min 97% de B, 42-50 min 100% de B, 50-55 min 100% de B, 55-57 min, o acetonitrilo foi reduzido para 30% e esta condição foi mantida até 60 min. Uma concentração de 500 µg / ml foi preparada, filtrada através de um filtro de 0,22 µm e 2 µl da amostra foi injetada em UPLC-DAD (NASCIMENTO et al., 2018).

### **3.4 Teste de Citotoxicidade**

A citotoxicidade foi determinada pela viabilidade celular, após exposição aos componentes das fórmulas (clorexidina e extrato de própolis vermelha, assim como a associação clorexidina + extrato de própolis vermelha), através do teste de detecção colorimétrica da atividade mitocondrial por MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) à formazan (MOSMANN, 1983; HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993). Para isto, macrófagos da linhagem J774.A1 foram plaqueados em placas de 96 poços (1x10<sup>5</sup> células/poço) e expostos a quatro amostras de cada componente em concentrações de 0,1, 1, 10, 50 e 100 µM por 48 horas em estufa a 37° C, 95% de umidade e 5% CO<sub>2</sub>. Os poços controles continham células cultivadas somente com meio de cultura ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO 0,1%). Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em PBS). As placas foram novamente incubadas por um período de 1 hora em estufa nas mesmas condições descritas anteriormente. A seguir, foi retirado o

sobrenadante e adicionados 100  $\mu$ L de DMSO. A leitura da densidade óptica (DO) das soluções resultantes foi feita em espectrofotômetro (Thermo Plate) a 550 nm. A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte nas culturas controle a partir dos valores de absorbância obtidos após leitura. Os valores médios de DO obtidos a partir de células não expostas aos componentes da fórmula foram utilizados como referência de controle negativo (100% de sobrevivência celular). A citotoxicidade dos materiais testados foi expressa como o percentual de viabilidade celular em relação ao controle negativo (100%).

A avaliação estatística dos dados foi realizada no *software* Graphpad Prism versão 5.01 com a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação múltipla de Tukey com nível de significância de  $p < 0,05$ .

### **3.5 Preparação dos Géis e Caracterização Organoléptica**

O extrato etanólico bruto de própolis vermelha a 20% foi encaminhado à farmácia de manipulação Ao Farmacêutico (Maceió - Alagoas) para a formulação dos géis a serem testados. Seis géis foram manipulados: (1) natrosol puro (veículo), (2) clorexidina 2% em natrosol, (3) própolis vermelha 10mg/ml em natrosol, (4) própolis vermelha 15mg/ml em natrosol, (5) própolis vermelha 10mg/ml associada com clorexidina 2% em natrosol e (6) própolis vermelha 15mg/ml associada com clorexidina 2% em natrosol.

Para a avaliação das características organolépticas, cada gel teve uma porção de 10 mL armazenada em geladeira ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e 10mL armazenada em temperatura ambiente ( $24 \pm 5^\circ\text{C}$ ). Semanalmente, durante 30 dias, um examinador avaliou as seguintes características: aroma, cor, aspecto e sabor.

### **3.6 Modelo de Periodontite Experimental em Ratos**

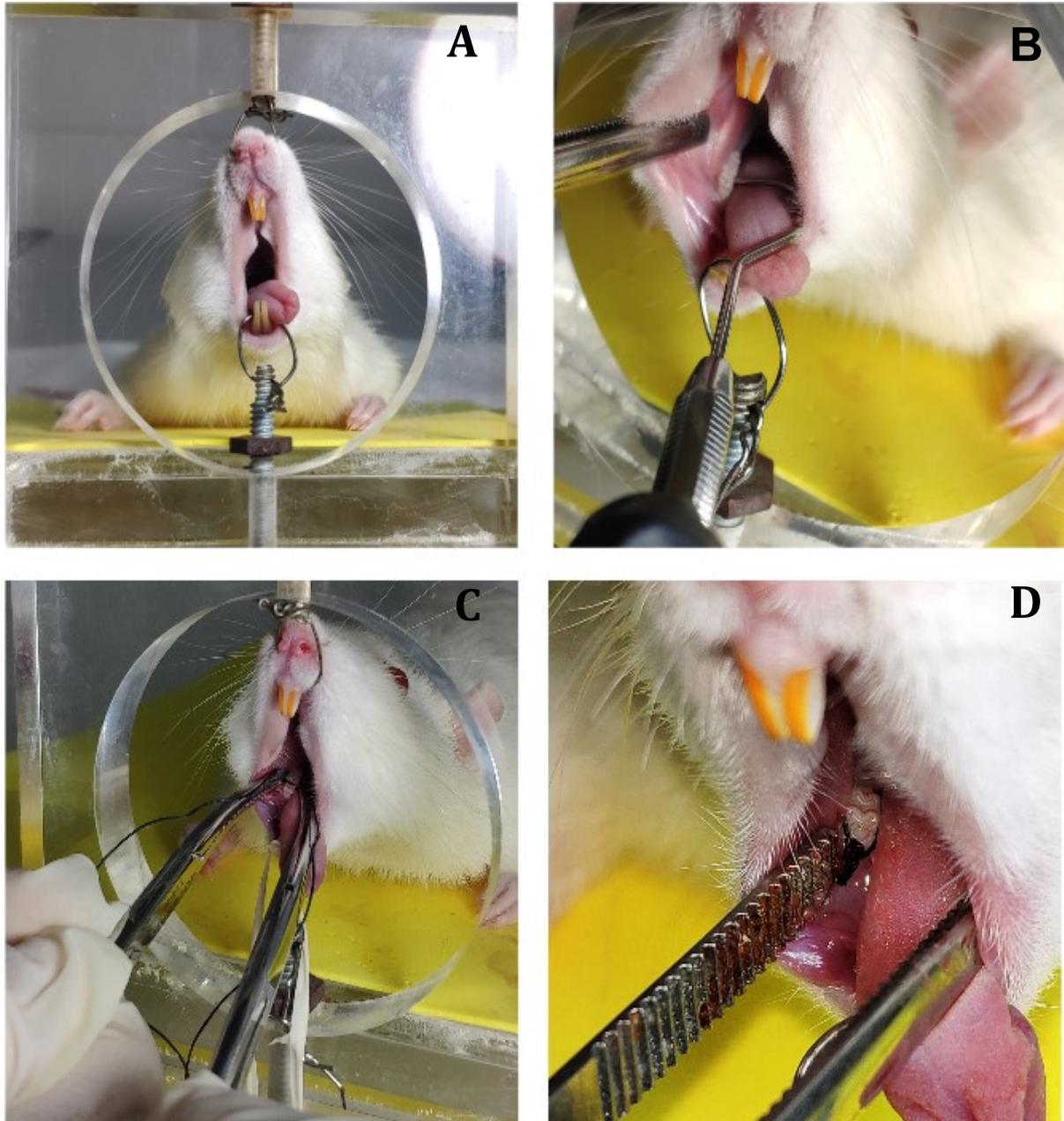
Todos os experimentos obedeceram aos princípios éticos da manipulação animal, de acordo com as normas e princípios do cuidado e manejo éticos de animais utilizados para fins científicos, estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA - UFAL). O protocolo de indução de periodontite experimental em ratos e demais procedimentos desta pesquisa foram aprovados pelo CEUA-UFAL sob o número 69/2018.

As amostras consistiram de 42 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos (60 dias) Wistar da mesma linhagem com peso variando de 200 a 260 g, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. O modelo animal usado neste estudo está em concordância com a literatura, em que ratos são frequentemente usados para o estudo da periodontite crônica. (VARGAS-SANCHEZ *et al.*, 2017; OZDEN *et al.*, 2017; PRIETTO, 2017; KUHR *et al.*, 2004).

Para inserção da ligadura, os animais foram pesados previamente para calcular a dose correta de anestésico. Os animais foram anestesiados com doses de 0,8mL/100 mg de cloridrato de cetamina e 0,4mL/100 mg de cloridrato de xilazina (NASSAR *et al.*, 2003; RÉGO *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Após anestesia, em mesa cirúrgica, a cavidade oral foi mantida aberta por argolas feitas de fios ortodônticos de níquel-cromo nº. 0,07 (Dental Morelli Ltda, Sorocaba – SP) presas aos incisivos (superiores e inferiores) (Figura 3-A). Usando-se uma sonda exploradora nº. 5, foi executada a separação temporária entre o primeiro e o segundo molares direitos inferiores (Figura 3-B) de modo a permitir a inserção subgengival da ligadura (fio de seda No 3-0, agulha triangular, CT 1,7 cm, comprimento de 45 cm, preto, Ethicon, São Paulo, Brasil) usando-se pinças Kelly (Golgran Instrumentos Cirúrgicos e Odontológicos Ltda, São Paulo – SP), para apreender e inserir o fio no espaço interproximal entre os dentes (Figura 3-C). A ligadura foi estabilizada com nó simples na região mesial do primeiro molar (Figura 3-D) (PENTEADO *et al.*, 2017).

**Figura 3**-Modelo de periodontite experimental por ligadura. A – Posicionamento e abertura de boca; B – Separação temporária entre o primeiro e segundo molares inferiores direitos com sonda exploradora N° 5; C – Inserção de fio de sutura de seda 3-0 Subgingivalmente com auxílio de pinças kelly; D-Aspecto final da ligadura com nó simples na mesial do primeiro molar.



Fonte: Do Autor (2021).

### 3.7 Procedimento Experimental

Imediatamente após a inserção da ligadura, os animais foram codificados e aleatoriamente incluídos por sorteio, de acordo com o tratamento recebido, nos grupos (n=6) descritos no Quadro 1.

**Quadro 1-** Grupos Experimentais.

<b>Grupo</b>	<b>Código</b>	<b>Tratamento</b>
Controle	C	Sem tratamento, apenas inspeção visual da permanência da ligadura
Natrosol (veículo)	N	Os ratos receberam aplicações do gel natrosol puro (veículo)
Clorexidina	CHX	Os ratos receberam aplicação tópica de clorexidina (2%) em gel natrosol
Própolis Vermelha 10 mg/ml	PV10	Os ratos receberam aplicação tópica da formulação de própolis vermelha 10 mg/ml em gel natrosol
Própolis Vermelha 15 mg/ml	PV15	Os ratos receberam aplicação tópica da formulação de própolis vermelha 15 mg/ml em gel natrosol
Própolis Vermelha 10 mg/ml + Clorexidina	PV10+CHX	Os ratos receberam aplicação tópica de própolis vermelha a 10 mg/ml associada à clorexidina 2% em gel natrosol
Própolis Vermelha 15 mg/ml + Clorexidina	PV15+CHX	Os ratos receberam aplicação tópica de própolis vermelha a 15 mg/ml associada à clorexidina 2% em gel natrosol

**Fonte:** Do autor (2021).

Imediatamente após a inserção da ligadura e durante os 14 dias seguintes, foram aplicados de forma atraumática, diariamente, 0,2 mL das substâncias experimentais utilizando-se seringas descartáveis. As ligaduras foram checadas antes de cada aplicação e, em caso de perda ou folga, foram reposicionadas. Todas as ligaduras foram feitas e verificadas por um mesmo operador. O período experimental e de permanência total das ligaduras foi de 15 dias (VARGAS-SANCHEZ et al., 2017; KUHR et al., 2004). O primeiro molar inferior esquerdo (sem qualquer ligadura e tratamento) serviu de controle negativo para comprovar a eficácia do método em reproduzir a periodontite (controle negativo – CN). Os animais foram mantidos em gaiolas e receberam água e comida *ad libitum* e mantidos em ambiente controlado (ciclo de luz 12h e temperatura de 22°C).

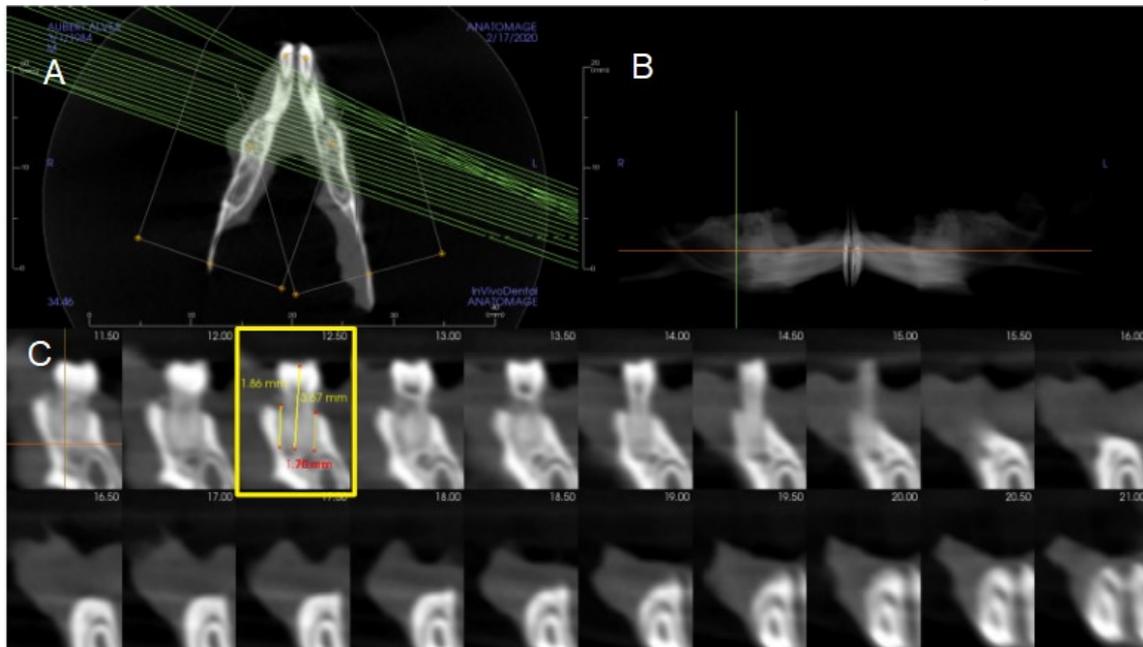
Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados com a administração de uma dose anestésica de Cloridrato de Cetamina, 180 mg/kg, intramuscular e Xilazina, 30 mg/kg, Intraperitoneal (AVMA, 2013) seguido de exsanguinação por punção cardíaca, observando-se todas as recomendações do

Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia (CFMV, 2012). As mandíbulas foram removidas e mantidas por inteiro em formol a 10% tamponado com fosfato (pH=7,0) até a realização das tomografias.

### **3.8 Avaliação do Suporte Ósseo Remanescente por Tomografia Computadorizada**

As mandíbulas foram escaneadas por tomografia computadorizada *cone beam* (Kavo ORTOPANTOMOGRAPH™ OP 3D Pro Kavo Dental, Alemanha). Cada amostra foi escaneada e reconstruída em estrutura 3D com tamanho de 0,2 voxels. A voltagem do tubo de raio-X foi de 90kV, e a corrente de 12,5 mA, com tempo de exposição de 8,7s e campo de visão de 5 x 5 cm. As imagens geradas foram rotacionadas em uma posição padrão: 1) no plano transaxial: o primeiro molar inferior teve seu eixo axial verticalmente posicionado (Figura 4A); 2) no plano coronal: as raízes foram posicionadas verticalmente (Figura 4B); 3) no plano sagital: todos os dentes foram posicionados horizontalmente ao primeiro molar (Figura 4C). Após a delimitação da curvatura do arco mandibular, obteve-se reconstrução panorâmica e cortes coronais sequenciados (Fig. 4). O corte coronal foi analisado utilizando-se o *software* Anatomage Invivo6 (San Jose, EUA) em intervalos de 0,5mm e espessura de 0,5mm. Foi levado em consideração o primeiro corte distal a contemplar todo o comprimento corono-apical do primeiro molar. Foram medidas as seguintes distâncias lineares: A) do ápice radicular à fóssula central da coroa; B) do topo da crista óssea alveolar vestibular ao ápice radicular; e C) do topo da crista óssea alveolar vestibular ao ápice radicular do primeiro molar inferior direito (dente com ligadura) ou do topo da crista óssea alveolar vestibular ao ápice radicular do primeiro molar inferior esquerdo (dente sem ligadura).

**Figura 4**-Sequência de trabalho para mensuração de tomografias no software Anatomage InVivo6. A: Delimitação da curvatura do arco mandibular; B: Reconstrução panorâmica do arco mandibular; C: Cortes coronais sequenciais; Destaque em amarelo: Corte selecionado para medições.



Fonte: Do autor (2021).

Todas as medidas foram feitas por um único examinador previamente treinado por um radiologista experiente. Este treinamento consistiu na familiarização com as ferramentas digitais, seguido por avaliação supervisionada de 16 imagens aleatórias. As médias das medições foram utilizadas para medição do suporte ósseo periodontal (SOP), adaptado de Cavallini (2006). Um valor percentual expresso pelas proporções entre as medidas obtidas foi calculado seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{SOP (\%)} = \{[(B+C) / 2] / A\} * 100$$

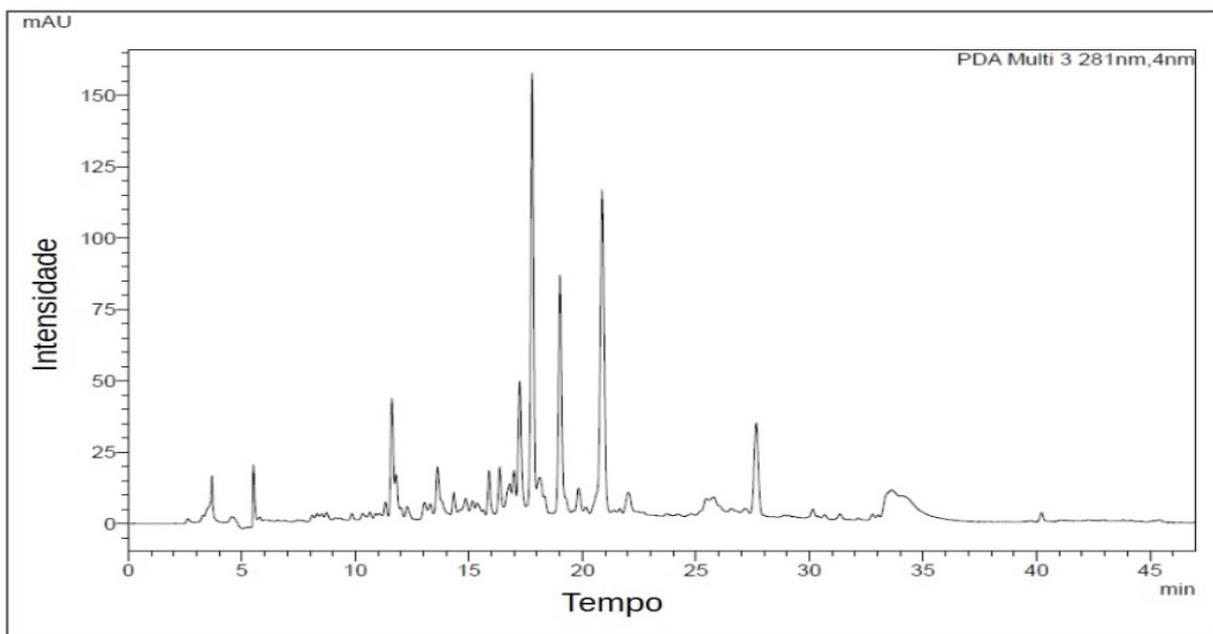
As medidas de SOP foram submetidas a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação dos pares. A determinação da calibração do avaliador se deu por meio da verificação da reprodutibilidade das mensurações em aproximadamente 10% das amostras. Repetiu-se as medições de 5 amostras (11,90%) aleatórias, três dias após as medições iniciais. Os dados foram submetidos ao teste de Correlação de Pearson.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise Cromatográfica

A Figura 5 apresenta o cromatograma UPLC-DAD do extrato etanólico de própolis vermelha (550µg) com a identificação de flavonoides e seus respectivos tempos de retenção: (1) liquiritigenina (11,5 min), (2) daidzeína (11,7 min), (3) pinobanksina (13,5 min), (4) isoliquiritigenina (16,3 min), (5) formononetina (17,1 min), (6) biochanina A (21,8 min) e pinocembrina (22,9 min), apresentando correspondência e similaridade com os flavonoides utilizados como padrões cromatográficos.

**Figura 5**-Cromatograma de EEP obtido por UPLC-DAD mostrando a identificação dos biodeterminação de marcadores da própolis vermelha em extrato etanólico (550µg). Foi confirmada a presença dos flavonoides (1) liquiritigenina (2) pinobanksina, (3) isoliquiritigenina (4) formononetina, (5) biochanina A e (6) pinocembrina no comprimento de onda de 280 nm.



Fonte: Do autor (20210).

A tabela 1 mostra as concentrações (µg/ml) obtidas para cada flavonoide identificado por UPLC-DAD.

**Tabela 1**-Concentração de flavonoides em 500µg de extrato etanólico de própolis vermelha alagoana quantificada por UPLC-DAD.

Flavonoide	Concentração
Liquiritigenina	3,08 µg/ml
Pinobanksina	0,45 µg/ml
Isoliquiritigenina	4,28 µg/ml

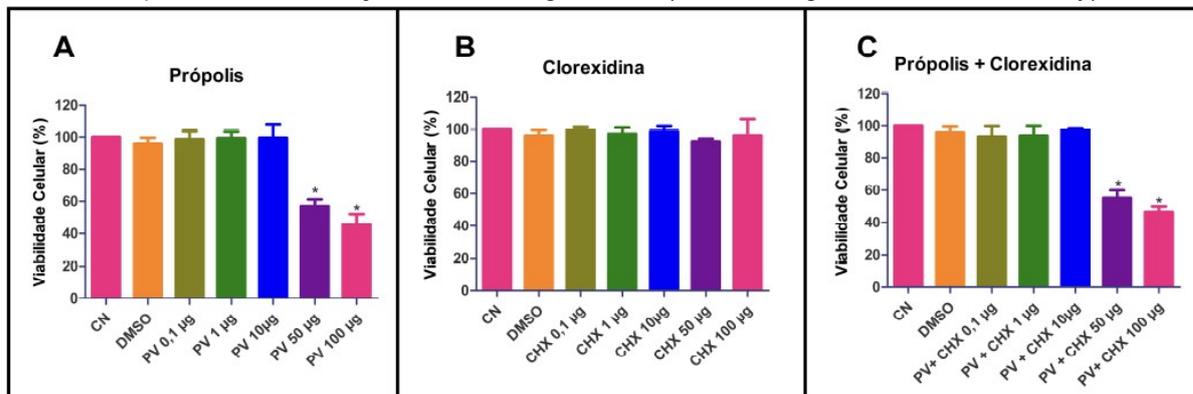
Formononetina	5,03 µg/ml
Biochanina A	0,40 µg/ml
Pinocembrina	0,10 µg/ml
Daidzeína	1,43 µg/ml

Fonte: Do autor (2021).

## 4.2 Teste de citotoxicidade

A viabilidade celular relativa (%) das culturas de macrófagos J774.A1, após 48 horas de incubação das células expostas a cada componente dos géis, está expressa na Figura 6. Não houve diferença significativa no percentual de sobrevivência das células expostas à própolis vermelha, à clorexidina e à associação dos dois componentes, em concentrações de até 10µg/mL ( $p \geq 0,05$ ), comparados ao grupo controle (meio de cultura puro). Considerando-se não citotóxicas as formulações do gel experimental utilizado. As concentrações de 50 µg/ml e 100 µg/ml de própolis vermelha isolada, reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) a viabilidade celular a 57,09% e a 45,81%, respectivamente, sendo considerada, portanto, citotóxica de maneira dose-dependente. Similarmente, a associação da própolis vermelha alagoana com clorexidina apresentou o mesmo padrão de redução significativa de viabilidade celular após exposição às concentrações de 50 µg/ml (55,18%) e 100 µg/ml (46,65%). Contrariamente, a clorexidina, nas concentrações testadas, não reduziu significativamente a viabilidade celular ( $p \geq 0,05$ ).

**Figura 6** - Viabilidade celular de macrófagos J774.A1 após exposição durante 48 h aos componentes dos géis. A: Própolis Vermelha Alagoana; B: Clorexidina; C: associação Própolis + Clorexidina. CN: Controle Negativo; DMSO: Dimetilsulfóxido; PV: Própolis Vermelha; CHX: Clorexidina. Símbolos diferentes representam diferença estatística significativa (ANOVA seguido de teste de Tukey).



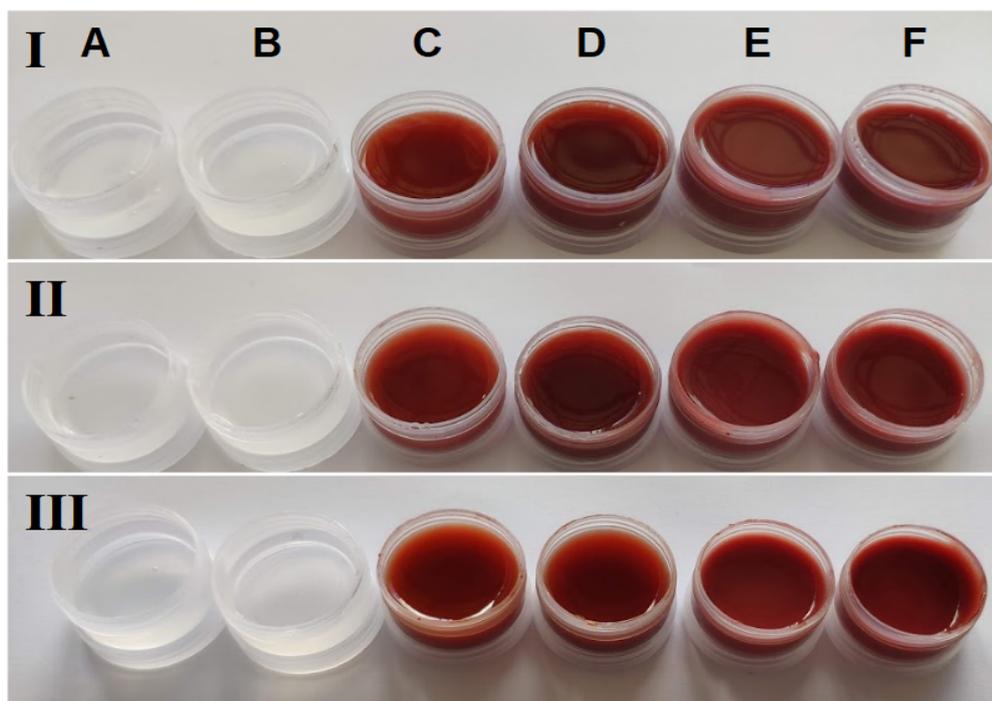
Fonte: Do Autor (2020).

### 4.3 Estabilidade Física Macroscópica

Todos os géis tiveram como base o polímero natrosol (veículo) que, em sua forma pura, apresentou-se incolor, inodoro, insípido e de viscosidade compatível para manuseio por seringas para irrigação. O gel de clorexidina apresentou aspecto incolor e inodoro e sabor amargo intenso.

Os géis com própolis apresentaram coloração vermelho-vivo, com maior intensidade do gel contendo 15µg/ml de própolis. O aroma resinoso e sabor levemente amargo apresentaram correlação com o produto *in natura*, foram suavizados pela diluição no veículo. Nas associações com clorexidina, porém, predominou a característica amarga no sabor. Todos os géis apresentaram aspecto homogêneo. Após o período de 30 dias, as amostras armazenadas resfriadas, comparadas com aquelas mantidas em temperatura ambiente, não apresentaram alteração de cor, odor, sabor e aspecto macroscópico. A figura 6 mostra o aspecto visual a olho nu das formulações e veículo utilizados nesta pesquisa.

**Figura 7**-Aspecto macroscópico dos géis preparados. I – Imediatamente após abertura da embalagem; II – 30 dias após abertura da embalagem, armazenado em geladeira ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ); III – 30 dias após abertura da embalagem, à temperatura ambiente ( $24 \pm 5^\circ\text{C}$ ). A: Base de natrosol (veículo), B: Clorexidina 2% em natrosol, C: Própolis Vermelha 10mg/ml em natrosol, D: Própolis Vermelha 15mg/ml em natrosol, E: Própolis Vermelha 10mg/ml + Clorexidina 2% em natrosol, F: Própolis Vermelha 15mg/ml + Clorexidina 2% em natrosol.



Fonte: Do Autor (2021).

#### **4.4 Avaliação do Suporte Ósseo Remanescente por Tomografia Computadorizada**

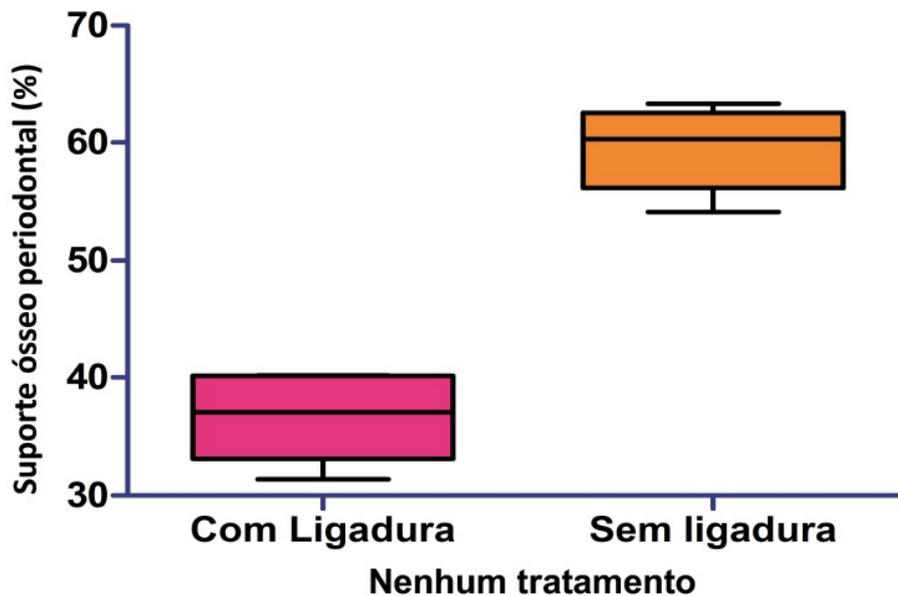
Nenhum animal apresentou alterações de comportamento ou de metabolismo durante o experimento. Todas as ligaduras permaneceram atadas durante todo o período experimental e não necessitaram de troca.

Para as medições com auxílio do software, a calibração intraexaminador demonstrou replicabilidade excelente (FLEISS, 1986), tanto para as medidas geradas para o lado com ligadura ( $R^2=0.98$ ) como para o lado sem ligadura ( $R^2=0.93$ ).

As mensurações lineares em tomografia computadorizada demonstraram a eficácia do método de indução de periodontite experimental por ligadura em reproduzir perda óssea. No grupo controle, no qual nenhuma substância foi administrada durante o período experimental, a média de suporte ósseo periodontal remanescente no elemento dentário que recebeu ligadura foi de  $36,58 \pm 3,92\%$  ao passo que o lado que não recebeu ligadura teve suporte ósseo periodontal de  $59,51 \pm 3,45\%$  ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 8). Nenhum dos géis testados induziu perda óssea no dente sem ligadura. A Figura 9 mostra que não houve diferença significativa de suporte ósseo dos primeiros molares sem ligadura, entre os grupos que receberam gel e o grupo controle ( $p=0.837$ ).

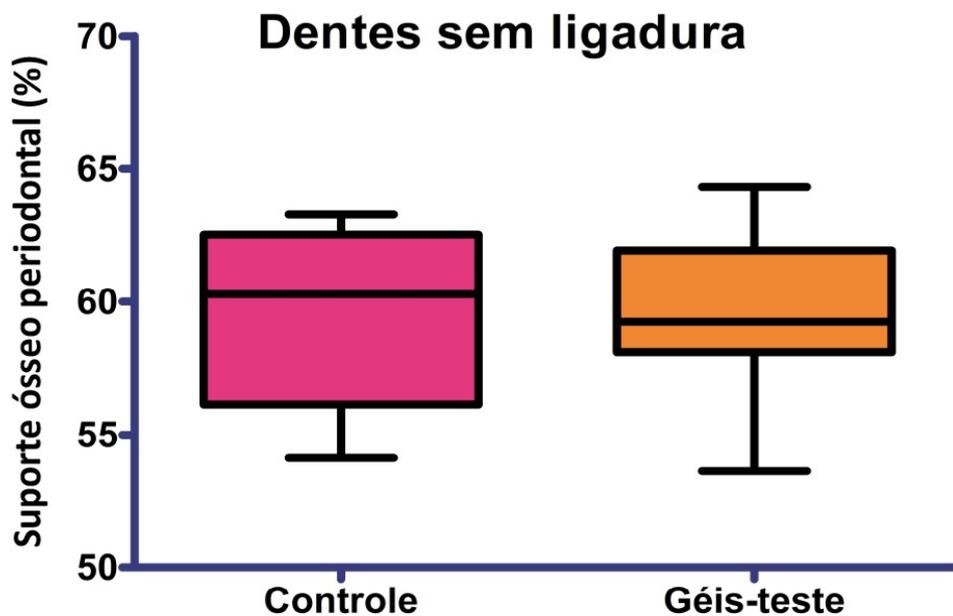
Na comparação intergrupos (Fig. 10), a média de suporte ósseo periodontal remanescente foi significativamente maior nos grupos que receberam substâncias teste do que nos grupos controle e veículo ( $p<0.05$ ). Não houve diferença significativa entre as diversas concentrações usadas de própolis vermelha, clorexidina, nem nas associações própolis com clorexidina. As imagens de cortes coronais de tomografias computadorizadas mostram as medidas de suporte ósseo periodontal representativas de primeiros molares de ratos após o período experimental de 15 dias (Fig. 11).

**Figura 8**-Suporte Ósseo Periodontal remanescente após 15 dias de período experimental nos dentes do grupo controle (sem tratamento) com e sem ligadura (Teste t de Student).



Fonte: Do Autor (2021).

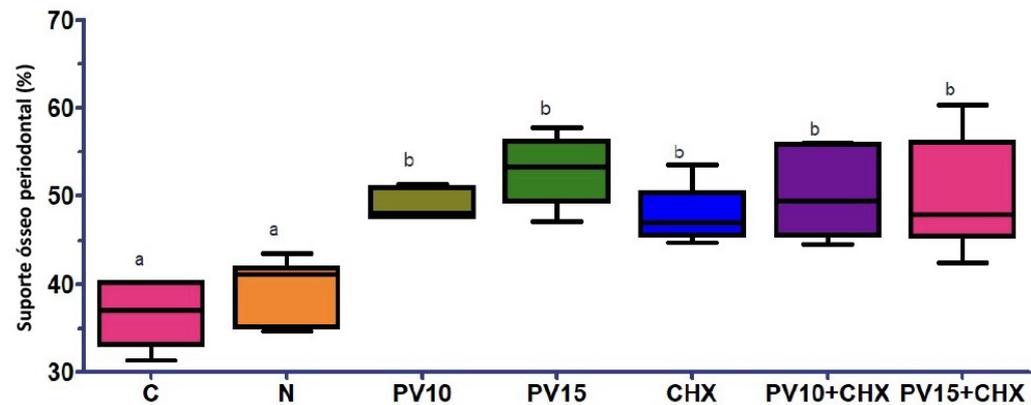
**Figura 9**-Suporte Ósseo Periodontal remanescente, após 15 dias de período experimental, nos dentes sem ligadura. Comparação entre no grupo Controle (Sem tratamento) com os demais grupos experimentais ( $p=0,11$ ) (Teste t de Student).



Fonte: Do autor (2021).

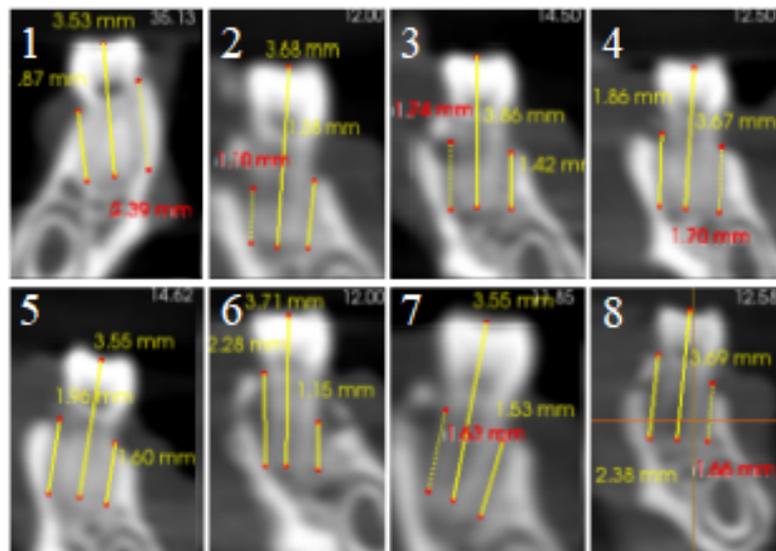
**Figura 10**-Suporte Ósseo Periodontal remanescente entre os grupos após 15 dias de permanência da ligadura. Letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de significância. C: Sem tratamento; N: Natrosol (Gel veículo); PV10: Própolis

10mg/ml; PV15: Própolis 15mg/ml; CHX: Clorexidina 2%; PV10+CHX: Própolis 10mg/ml + Clorexidina 2%; PV15+CHX: Própolis 15mg/ml + Clorexidina 2% (ANOVA).



Fonte: Do Autor (2020).

**Figura 11**-Imagens representativas de tomografia computadorizada cone-beam (cortes coronais). 1: Sem ligadura; 2: Sem tratamento; 3: Natrosol (Gel veículo); 4: Própolis 10mg/ml; 5: Própolis 15mg/ml; 6: Clorexidina 2%; 7: Própolis 10mg/ml + Clorexidina; 8: Própolis 15mg/ml + Clorexidina 2%; 6: Clorexidina 2%; 7: Própolis 10mg/ml + Clorexidina; 8: Própolis 15mg/ml + Clorexidina 2%.



Fonte: Do Autor (2021).

## 5 DISCUSSÃO

De acordo com a revisão literária empreendida, esse é o primeiro estudo a avaliar, por meio de tomografia computadorizada, o efeito de um gel com própolis vermelha, aplicado topicamente, na progressão da periodontite. Os resultados mostraram que a ação do gel com própolis vermelha é similar aos resultados decorrentes do uso tópico do gel com clorexidina.

A técnica UPLC-DAD demonstrou linearidade, precisão e acurácia e foi validada previamente para identificar e quantificar seis flavonoides no extrato etanólico de própolis vermelha. Os resultados produzidos, neste estudo, estão em consonância com resultados previamente publicados com própolis vermelha alagoana (NASCIMENTO *et al.*, 2016; 2018; PORTO *et al.*, 2018). Sforcin (2007) aponta que os estudos biológicos abordando o uso de própolis devem sempre ser executados mediante a identificação de suas fontes botânicas e composição química, dada a heterogeneidade da composição dos diversos tipos de própolis a partir de suas diferentes regiões geográficas, flora local, época de colheita, método de criação e tipo de coletores, características genéticas das abelhas (NUNES *et al.*, 2009). Portanto, para garantir a eficácia, segurança e qualidade, a própolis necessita de caracterização química (BANKOVA, 2005b).

Os biomarcadores liquiritigenina, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A, pinocembrina e daidizeína, identificados na própolis vermelha utilizada, são responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras de interesse para o manejo da periodontite. Adicionalmente, os efeitos biológicos positivos observados no presente estudo podem, também, estar relacionados também a outras substâncias já identificadas na própolis vermelha alagoana, como neovestitol e vestitol, com atividade comprovadamente anti-inflamatória e antimicrobiana (BUENO-SILVA *et al.*, 2013).

A presença de flavonoides no extrato etanólico de própolis vermelha pode contribuir para a alteração do curso da patogenia inicial e da progressão da periodontite, já que são capazes realçar a atividade reparadora de células periodontais, tais como fibroblastos gengivais, células do ligamento periodontal e osteoblastos (SANKARI *et al.*, 2014).

Existem avanços recentes no entendimento da forma como os flavonoides atuam na promoção da saúde óssea, seja na prevenção e tratamento de perdas

ósseas, ou em doenças ligadas ao estresse oxidativo e metabólico. No geral, os benefícios mais frequentes ligados às terapias experimentais com flavonoides na doença periodontal e outras patologias ósseas incluem a diminuição da resposta inflamatória, da oxidação local e proteção vascular, além da redução na reabsorção óssea, o principal desfecho adverso da periodontite (FERNÁNDEZ-ROJAS; GUTIÉRRES-VENEGAS, 2018).

A identificação de liquiritigenina no extrato etanólico de própolis vermelha aponta para uma possível efetividade terapêutica, especialmente relacionada às células ósseas. A exposição de células osteoblásticas murinas à liquiritigenina *in vitro* foi capaz de aumentar o seu crescimento e atividade de síntese colágena (CHOI, 2012), além de inibir a diferenciação em osteoclastos. Sendo assim, a liquiritigenina tem efeito duplo na proliferação de células da matriz óssea, estando envolvida na promoção da diferenciação de osteoblastos e na inibição da diferenciação de osteoclastos (UCHINO et al., 2015).

A isoliquiritigenina, também quantificada no extrato utilizado para a manufatura dos géis, já demonstrou ser capaz de inibir a diferenciação e função de osteoclastos induzidas pelo sistema RANK-RANKL-OPG *in vitro*, não sendo este efeito associado com citotoxicidade. A atuação deste sistema na patogenia das doenças periodontais responde pela formação ou reabsorção óssea. Além disso, em experimento *in vivo*, camundongos expostos à administração de isoliquiritigenina e submetidos a periodontite experimental por inoculação de LPS tiveram menor reabsorção óssea quando comparado a animais que não foram expostos à isoliquiritigenina. Atribuiu-se a redução de perda óssea tanto pela supressão de inflamação induzida por citocinas estimuladas por LPS, quanto pela diminuição da osteoclastogênese (ZHU et al., 2012).

De maneira similar, a isoflavona formononetina foi capaz de suprimir a osteoclastogênese estimulada por RANKL, inibindo a ativação de vias de sinalização como NF- $\kappa$ B, c-Fos e NFAT c1, tornando esse flavonoide de interesse para pesquisa em prevenção e tratamento de doenças inflamatórias com implicações na remodelação óssea (HUH et al., 2014). Adicionalmente, a formononetina demonstrou capacidade de induzir cicatrização e regeneração óssea em modelos de defeitos de osso cortical em camundongos, aumentando a expressão local de fatores osteogênicos (SINGH et al., 2017).

A biochanina A, por sua vez, foi correlacionada com efeitos anti-inflamatórios, dentre outras múltiplas funções biológicas (YU et al., 2019). Presume-se que sua ação na inflamação seja atribuída à capacidade de inibição da expressão de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1) e da ativação de NF- $\kappa$ B induzidas por lipopolissacarídeos (MING et al., 2015).

A flavonona pinocembrina demonstrou ser capaz de exercer efeitos anti-inflamatórios, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10, atuando pela diminuição da ativação das vias MAPK e NF- $\kappa$ B (SOROMOU et al, 2012; 2013).

Existem avanços recentes no entendimento da forma como os flavonoides atuam na promoção da saúde óssea, seja na prevenção e tratamento de perdas ósseas, ou em doenças ligadas ao estresse oxidativo e metabólico (Weaver et al, 2012). No geral, os benefícios mais frequentes ligados às terapias experimentais com flavonoides na doença periodontal e outras patologias ósseas incluem a diminuição da resposta inflamatória, da oxidação local e proteção vascular, além da redução na reabsorção óssea, o principal desfecho adverso da periodontite (FERNÁNDEZ-ROJAS; GUTIÉRRES-VENEGAS, 2018).

Os componentes dos géis testados separadamente não apresentaram citotoxicidade em concentrações até 10  $\mu$ g/ml. Os achados do presente estudo estão de acordo com estudo prévio de Mendonça et al. (2015) que avaliou a citotoxicidade do extrato etanólico de própolis vermelha em células tumorais SF-295, OVCAR-8 e HCT-116 (glioblastoma humano, ovário e cólon, respectivamente) demonstrando viabilidade celular similar ao controle negativo em concentrações de até 25  $\mu$ g/ml e apresentando citotoxicidade significativa na concentração de 50  $\mu$ g/ml.

A maioria dos estudos de citotoxicidade da própolis vermelha avalia sua ação em células tumorais e apresentaram resultados diferentes a depender da região geográfica, sendo o IC<sub>50</sub> da própolis de Sergipe em células imortais de câncer cervical - HeLa (de 7,5  $\mu$ g/ml (ALENCAR et al. 2007) e 81,40  $\mu$ g/ml o da própolis alagoana (FROZZA et al., 2013)

O natrosol, um polímero carbono biocompatível, foi a base usada para as preparações em gel neste estudo. O polímero não demonstrou efeito citotóxico em outros estudos, podendo-se atribuir qualquer efeito citotóxico para preparações com natrosol às substâncias ativas adicionadas. (LESSA et al.2010a; LESSA et al.2010b). As preparações utilizadas apresentam, portanto, potencial para uso

clínico em humanos em uso intrasulcular, dada a sua biocompatibilidade com os tipos celulares do periodonto.

Ainda que os demais componentes dos géis apresentem potencial citotóxico, a sua ação em tecidos orgânicos vivos difere daquela observada *in vitro*, dada as características teciduais e fisiológicas, tais como, estratificação de células, queratinização, secreção de fluido crevicular e salivar e movimentação tecidual.

A inserção de ligadura mostrou-se eficiente em induzir perda óssea alveolar, como percebido pela comparação das medições de suporte ósseo periodontal remanescente entre o lado teste do grupo controle, que não sofreu interferência de nenhuma substância e o lado sem ligadura de todos os grupos.

O período escolhido para avaliar a influência da própolis na progressão da periodontite está de acordo com estudos prévios, que demonstram uma fase inicial aguda de 15 dias, com posterior cronificação e estabilização da perda óssea após este período (MOLON et al., 2014). Adicionalmente, Vargas-Sanchez et al. (2017) afirmam que, ao investigar processos biológicos associados à inflamação, protocolos curtos de perda óssea alveolar são indicados, já que após o décimo quinto dia, o processo de reabsorção é estabilizado.

No presente estudo, o uso dos géis experimentais iniciou-se concomitante à indução da periodontite, avaliando-se, portanto, a capacidade da própolis vermelha interferir na instalação e progressão dos processos patogênicos da periodontite. Atribui-se aos períodos iniciais do modelo de periodontite experimental uma forte atuação das citocinas inflamatórias. Sendo assim, agentes imunomoduladores, como a própolis vermelha alagoana, seriam de importante interesse para intervenções em Periodontia. Tal efeito tem sido comprovado por diversos estudos sugerindo-se mecanismos pelos quais a resposta imune é modificada, sobretudo a inibição de secreção de citocinas pró-inflamatórias e redução da migração neutrofílica (BUENO-SILVA et al., 2015; 2016).

Ribeiro et al. (2015), avaliaram o efeito da aplicação diária de extrato alcoólico de própolis verde sobre a perda óssea medida por meio de radiografia. Os autores comprovaram uma perda óssea significativamente menor nos grupos que utilizaram própolis do que no grupo controle e no grupo que usou clorexidina. E atribuíram o efeito positivo inferior da clorexidina ao fato de terem usado a forma líquida, com menos viscosidade do que a própolis. Em nosso estudo, todos os géis aplicados tinham viscosidades equivalentes e os efeitos dos géis contendo própolis vermelha

foram similares ao efeito do gel de clorexidina e dos géis associando clorexidina e própolis na inibição da perda óssea.

A administração sistêmica de própolis foi capaz de reduzir a perda óssea de ratos com ou sem diabetes (ARAL *et al.*, 2015). De maneira similar, Toker *et al.* (2008) administraram própolis sistemicamente e encontraram menor perda óssea comparada ao grupo controle, assim como menor atividade osteoclástica mediada por inflamação.

Outras formulações de própolis em meio semisólido têm sido estudadas quanto a propriedades físico-químicas como dureza, maleabilidade, liberação da droga e mucoadesão (BRUSCHI *et al.*, 2007; ASLANI & MALEKPOUR, 2016). A base de natrosol utilizada para os géis deste estudo apresentou característica de fácil manuseio pelo operador, não interferiu no sabor das substâncias ativas e demonstrou estabilidade no aspecto macroscópico ao longo do tempo.

Quando associada com um composto herbal em gel, a própolis demonstrou melhorar os parâmetros clínicos, de forma similar ao gel de clorexidina, em pacientes com gengivite, apresentando benefícios adicionais em termos de ação anti-oxidante (GIAMMARINARO *et al.*, 2018). No presente estudo, observando-se a influência sobre a progressão da periodontite induzida, também não houve diferença estatística entre o uso de gel com própolis e do gel com clorexidina ou associações. Atribui-se esse resultado ao fato de que a própolis, tal como a clorexidina, também exerce efeito antimicrobiano. Assim, estudos clínicos que abordem as implicações da aplicação de géis com própolis no controle microbiano e efeitos na perda óssea são necessários.

Nesse estudo, optou-se pela administração tópica dos géis. A via tópica apresenta a vantagem de levar a substância ativa diretamente ao sítio de atuação, mitigando interferências das etapas de biotransformação e eliminação por parte do organismo antes que o fármaco atinja o alvo terapêutico, assim como redução de potenciais efeitos adversos. Entretanto, a aplicação subgengival exige que seja realizada por um profissional qualificado.

A clorexidina é o adjunto antimicrobiano mais utilizado no manejo das doenças periodontais e é comumente referida como o padrão ouro no controle químico do biofilme. James *et al.* (2017) concluíram que o bochecho com clorexidina por quatro a seis semanas resulta em uma ampla redução no acúmulo do biofilme, o que é desejável como resultado positivo em Periodontia. Na forma de gel, a

clorexidina também demonstra ótimos resultados em diversas aplicações odontológicas como na cirurgia oral, dentística, prevenção, periodontia e implantodontia. Porém, os efeitos adversos da clorexidina são bem conhecidos e vão desde o manchamento dentário extrínseco, perda de paladar, ardor bucal, irritação e descamação até a erosão ou ulceração da mucosa oral (FIORILLO, 2019).

Nesse estudo ficou demonstrado que foram alcançados resultados benéficos com a aplicação tópica de gel com própolis vermelha. Mesmo na concentração mais baixa (10µg/ml), o gel com própolis apresentou efeito protetor da reabsorção alveolar similar ao da clorexidina. Portanto, o uso da própolis vermelha alagoana pode ser uma opção à clorexidina na terapia das doenças periodontais, sem apresentar os efeitos adversos relatados.

A apresentação farmacêutica utilizada mostrou-se adequada, de fácil manipulação e aplicação, e pode ser uma opção para o manejo terapêutico da periodontite por meio de irrigação de bolsas periodontais. No entanto, devido à própolis utilizada nesse estudo apresentar uma coloração vermelha intensa, sugere-se que estudos futuros avaliem os efeitos do gel contendo própolis vermelha alagoana no manchamento de dentes e restaurações.

## 6 CONCLUSÃO

A partir da metodologia utilizada neste estudo foi possível concluir que, os animais submetidos à periodontite experimental por ligadura por um período de 15 dias e tratados com gel contendo própolis vermelha alagoana apresentaram maior suporte ósseo periodontal remanescente em comparação aos grupos controle e veículo.

Todos os géis, independente da temperatura de armazenamento, apresentaram aspecto homogêneo e sem alteração de cor, odor, sabor e aspecto macroscópico. A clorexidina, pura ou em associação com própolis, adiciona ao gel um sabor amargo.

A eficácia do gel com própolis vermelha foi similar ao gel de clorexidina em inibir a progressão da perda óssea sem apresentar citotoxicidade.

A presença de importantes flavonoides na própolis, com ação anti-inflamatória e imunomoduladora, importantes na regulação do metabolismo de reabsorção óssea, e a biocompatibilidade de seus componentes fazem do gel com própolis um produto apicêutico potencialmente útil para administração intrasulcular nas terapias periodontais.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S.M. et al. **Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis**. Journal of Ethnopharmacology, [s.l.], v. 113, n. 2, p.278-283, set. 2007.
- ALMEIDA, Erika Tayse da Cruz et al. **Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract**. Journal Of Pharmaceutical Analysis, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 280-287, out. 2017.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **GUIDELINES FOR THE EUTHANASIA OF ANIMALS**: 2013 Edition. Schaumburg: S. I., 2013. 102 p.
- APATZIDOU, Danae A.; KINANE, Denis F. Nonsurgical Mechanical Treatment Strategies for Periodontal Disease. **Dental Clinics of North America**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.1-12, jan. 2010.
- AQUINO, Sabrina Garcia de et al. **Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats**. Archives of Oral Biology, [s.l.], v. 54, n. 7, p.609-617, jul. 2009.
- ARAL, Cüneyt Asım et al. **Alveolar Bone Protective and Hypoglycemic Effects of Systemic Propolis Treatment in Experimental Periodontitis and Diabetes Mellitus**. Journal Of Medicinal Food, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 195-201, fev. 2015
- ARAÚJO, Aurigena Antunes et al. **Alterações bioquímicas em ratos com doença periodontal e tratados com olmesartana, captopril e atorvastatina**. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, [s.l.], v. 12, n. 1, p.50-54, 21 ago. 2013.
- ARAUJO, Marcio A. R. et al. **Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review**. Revista Brasileira de Farmacognosia, [s.l.], v. 22, n. 1, p.208-219, fev. 2012.
- ASLANI, Abolfazl; MALEKPOUR, Negar. **Design, formulation, and physicochemical evaluation of periodontal propolis mucoadhesive gel**. Dental Research Journal, [s.l.], v. 13, n. 6, p.484-493, 2016.
- AZUMA, M. **Fundamental mechanisms of host immune responses to infection**. Journal of Periodontal Research, [s.l.], v. 41, n. 5, p.361-373, out. 2006.
- BADERSTEN, Anita; NILVEUS, Rolf; EGELBERG, Jan. **Effect of nonsurgical periodontal therapy**. II. Severely advanced periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, [s.l.], v. 11, n. 1, p.63-76, jan. 1984.
- BANKOVA, Vassya et al. **Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results**. Zeitschrift Für Naturforschung C, [s.l.], v. 57, n. 5-6, p.530-533, 1 jun. 2002.

BANKOVA, Vassya. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization.** Journal of Ethnopharmacology, [s.l.], v. 100, n. 1-2, p.114-117, ago. 2005.

BANKOVA, Vassya. **Recent trends and important developments in propolis research.** Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 2, n. 1, p.29-32, 2005.

BARTOLD, P. Mark; VAN DYKE, Thomas E. **Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis.** Unlearning learned concepts. Periodontology 2000, [s.l.], v. 62, n. 1, p.203-217, 11 abr. 2013.

BEGNINI, Karine Rech et al. **Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis-Like Cell Death and Decreases Migration Potential in Bladder Cancer Cells. Evidence-based Complementary And Alternative Medicine,** [s.l.], v. 2014, p.1-13, 2014.

BÍBLIA. **Jeremias 8:22.** 2. ed. Barueri: Sociedade Bíblica do Brasil, 2008. 1273 p. Traduzida por João Ferreira de Almeida.

BRUSCHI, Marcos L. et al. **Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: in vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. : In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties.** Journal Of Pharmaceutical Sciences, [s.l.], v. 96, n. 8, p. 2074-2089, ago. 2007

BUENO-SILVA, B. et al. **Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo.** Biofouling, [s.l.], v. 29, n. 10, p.1233-1242, 7 out. 2013.

BUENO-SILVA, Bruno et al. **Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis.** Journal of Agricultural And Food Chemistry, [s.l.], v. 61, n. 19, p.4546-4550, 3 maio 2013.

BUENO-SILVA, Bruno et al. **Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process.** Phytomedicine, [s.l.], v. 23, n. 13, p.1583-1590, dez. 2016.

BUENO-SILVA, Bruno et al. **The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity.: chemical composition and antibacterial activity.** Natural Product Research, [s.l.], v. 31, n. 11, p. 1318-1324, 4 out. 2016.

BUNTE, Kübra et al. **Polyphenols in the prevention and treatment of periodontal disease: a systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies.: A systematic review of in vivo, ex vivo and in vitro studies.** Fitoterapia, [s.l.], v. 132, p. 30-39, jan. 2019.

BURLEW, Rusty. **Propolis And The Resin Connection.** American Bee Journal. [s.l.], p. 1-4. out. 2018. Disponível em: <<https://americanbeejournal.com/propolis-and-the-resin-connection/>>. Acesso em: 20 nov. 2019.

CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro et al. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira.** Química Nova, [s.l.], v. 32, n. 6, p.1523-1527, 2009.

CHAVA, Vijaykumar; NUVVULA, Sivakumar; NUVVULA, Sailavanya. **Primary culprit for tooth loss!!** Journal of Indian Society of Periodontology, [s.l.], v. 20, n. 2, p.222-224, 2015.

CHOI, Eun Mi. **Liquiritigenin isolated from Glycyrrhiza uralensis stimulates osteoblast function in osteoblastic MC3T3-E1 cells.** International Immunopharmacology, [s.l.], v. 12, n. 1, p.139-143, jan. 2012.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS EM EUTANÁSIA EM ANIMAIS: Conceitos e Procedimentos Recomendados.** Brasília: Comissão de Ética, bioética e Bem-estar Animal/cfmv, 2012. 66 p.

CORBET, Ef; HO, Dkl; LAI, Sml. **Radiographs in periodontal disease diagnosis and management.** Australian Dental Journal, [S.L.], v. 54, p. 27-43, set. 2009.

COUTINHO, Amita. **Honeybee propolis extract in periodontal treatment: A clinical and microbiological study of propolis in periodontal treatment.** Indian Journal of Dental Research, [s.l.], v. 23, n. 2, p.294-299, 2012.

DARVEAU, Richard P. **Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis.** Nature Reviews Microbiology, [s.l.], v. 8, n. 7, p.481-490, 1 jun. 2010.

DAUGSCH, Andreas et al. **Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin.** Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 5, n. 4, p.435-441, 2008.

EBERSOLE, Jeffrey L. et al. **The periodontal war: microbes and immunity.** Periodontology 2000, [s.l.], v. 75, n. 1, p.52-115, 31 jul. 2017.

EKE, Paul I. et al. **Periodontitis in US Adults.** The Journal of The American Dental Association, [s.l.], v. 149, n. 7, p.576-588, jul. 2018.

FERES, Magda et al. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. **Periodontology 2000**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.131-186, 12 dez. 2014.

FERNANDES, Leandro Araújo et al. **Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats.** Journal of Applied Oral Science, [s.l.], v. 18, n. 6, p.635-640, dez. 2010.

FERNÁNDEZ-ROJAS, Berenice; GUTIÉRREZ-VENEGAS, Gloria. **Flavonoids exert multiple periodontic benefits including anti-inflammatory, periodontal ligament-supporting, and alveolar bone-preserving effects.** Life Sciences, [s.l.], v. 209, p.435-454, set. 2018.

FIORILLO, Luca. **Chlorhexidine Gel Use in the Oral District: a systematic review: A Systematic Review.** Gels, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 31-47, 11 jun. 2019.

FOKT, H. et al. **How do bees prevent hive infections?: The antimicrobial properties of propolis**. Current Research, Technology And Education Topics In Applied Microbiology And Microbial Biotechnology, S.I., v. 1, p.481-493, 2010.

FREIRES, Irlan Almeida et al. **The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review**. Archives of Oral Biology, [s.l.], v. 87, p.196-203, mar. 2018.

FREIRES, Irlan Almeida; ALENCAR, Severino Matias de; ROSALEN, Pedro Luiz. **A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases**. European Journal of Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 110, p.267-279, mar. 2016.

FREIRES, Irlan Almeida; ROSALEN, Pedro Luiz. **How Natural Product Research has Contributed to Oral Care Product Development? A Critical View**. Pharmaceutical Research, [s.l.], v. 33, n. 6, p.1311-1317, 14 mar. 2016.

FROZZA, Caroline Olivieri da Silva et al. **Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis**. Food and Chemical Toxicology, [s.l.], v. 52, p.137-142, fev. 2013.

GAFFEN, S.I. et al. **Recent Advances in Host Defense Mechanisms/ Therapies against Oral Infectious Diseases and Consequences for Systemic Disease**. Advances in Dental Research, [s.l.], v. 26, n. 1, p.30-37, 15 abr. 2014.

GHISALBERTI, E. L. **Propolis: A Review**. Bee World, [s.l.], v. 60, n. 2, p.59-84, jan. 1979.

GJERTSEN, Anjanette W. et al. **Effect of propolis on proliferation and apoptosis of periodontal ligament fibroblasts**. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, And Endodontology, [s.l.], v. 112, n. 6, p.843-848, dez. 2011.

GRAVES, Dana T. et al. **The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases**. Journal of Clinical Periodontology, [s.l.], v. 35, n. 2, p.89-105, 10 jan. 2008.

GRAVES, Dana T.; OATES, Thomas; GARLET, Gustavo P. **Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions**. Journal of Oral Microbiology, [s.l.], v. 3, n. 1, p.5304-5319, jan. 2011.

GROOT, Anton C. de. **Propolis: A Review of Properties, Applications, Chemical Composition, Contact Allergy, and Other Adverse Effects**. Dermatitis, [s.l.], v. 24, n. 6, p.263-282, 2013.

HAAS, Alex Nogueira et al. **A population-based cohort study of oral health in South Brazil: the porto alegre study: The Porto Alegre Study**. Revista Brasileira de Epidemiologia, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 515-519, jun. 2015.

HAFFAJEE, Anne D. et al. **Controlling the plaque biofilm**. International Dental Journal, [s.l.], v. 53, n. 3, p.191-199, jun. 2003.

- HAFFAJEE, Anne D.; SOCRANSKY, Sigmund S.; GUNSOLLEY, John C. **Systemic Anti-Infective Periodontal Therapy. A Systematic Review.** Annals of Periodontology, [s.l.], v. 8, n. 1, p.115-181, dez. 2003.
- HASHIM, Nada Tawfig. **Oral Microbiology in Periodontal Health and Disease.** In: **BHARDWAJ, Sonia Bhonchal.** Oral Microbiology in Periodontitis. Panjab: Intechopen, 2018. Cap. 4. p. 33-52.
- HIENZ, Stefan A.; PALIWAL, Sweta; IVANOVSKI, Saso. **Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis.** Journal of Immunology Research, [s.l.], v. 2015, p.1-10, 2015.
- HOSADURGA, Rajeshramesh et al. **Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis.** Pharmacognosy Research, [s.l.], v. 6, n. 4, p.326-333, 2014.
- HU, Fuliang et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 100, n. 3, p.276-283, set. 2005.
- HUH, Jeong-eun et al. **Formononetin Attenuates Osteoclastogenesis via Suppressing the RANKL-Induced Activation of NF- $\kappa$ B, c-Fos, and Nuclear Factor of Activated T-Cells Cytoplasmic 1 Signaling Pathway.** Journal of Natural Products, [s.l.], v. 77, n. 11, p.2423-2431, 14 nov. 2014. American Chemical Society (ACS).
- HUSSAIN, R.F.; NOURI, A.M.E.; OLIVER, R.T.D. **A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay.** Journal of Immunological Methods, [s.l.], v. 160, n. 1, p.89-96, jan. 1993.
- JAMES, Patrice et al. **Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health.** Cochrane Database of Systematic Reviews, [s.l.], p. 1-45, 31 mar. 2017.
- KAMIYA, Tetsuro et al. **Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, [s.l.], v. 60, n. 44, p.11065-11070, 24 out. 2012.
- KAPOOR, Anoop et al. **Systemic antibiotic therapy in periodontics.** Dental Research Journal, [s.l.], v. 9, n. 5, p.505-515, 2012.
- KASSEBAUM, N.j. et al. **Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010.** Journal of Dental Research, [s.l.], v. 93, n. 11, p.1045-1053, 26 set. 2014.
- KAYA, Emre; YILMAZ, Seval; CERIBASI, Songul. **Protective role of propolis on low and high dose furan-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats.** Journal of Veterinary Research, [s.l.], v. 63, n. 3, p.423-431, 13 set. 2019.
- KINANE, Denis F.; STATHOPOULOU, Panagiota G.; PAPAPANOU, Panos N.. **Periodontal diseases.** Nature Reviews Disease Primers, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-14, 22 jun. 2017.

- KOOK, Sung-ho et al. **Periodontal Fibroblasts Modulate Proliferation and Osteogenic Differentiation of Embryonic Stem Cells Through Production of Fibroblast Growth Factors**. Journal of Periodontology, [s.l.], v. 85, n. 4, p.645-654, abr. 2014.
- KUHR, A. et al. **Observations on experimental marginal periodontitis in rats**. Journal of Periodontal Research, [s.l.], v. 39, n. 2, p.101-106, abr. 2004.
- KUROPATNICKI, Andrzej K.; SZLISZKA, Ewelina; KROL, Wojciech. **Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times**. Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 2013, p.1-11, 2013.
- LEE, Hae Jin et al. **Antiperiodontitis Effects of Magnolia biondii Extract on Ligature-Induced Periodontitis in Rats**. Nutrients, [s.l.], v. 11, n. 4, p.934-946, 25 abr. 2019.
- LEE, Hye Ji et al. **Angelica dahurica ameliorates the inflammation of gingival tissue via regulation of pro-inflammatory mediators in experimental model for periodontitis**. Journal of Ethnopharmacology, [s.l.], v. 205, p.16-21, jun. 2017.
- LESSA, Fernanda Campos Rosetti et al. **Direct and transdentinal antibacterial activity of chlorhexidine**. American Journal Of Dentistry, S. L., v. 23, n. 5, p. 255-9, out. 2010.
- LESSA, Fernanda Campos Rosetti et al. **Transdentinal cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine gel applied on acid-conditioned dentin substrate**. Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, [s.l.], v. 92, n. 1, p. 40-47, jan. 2010
- LI, Feng et al. **Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 16, n. 10, p.5434-5440, maio 2008.
- LISTGARTEN, Max A. **Similarity of Epithelial Relationships in the Gingiva of Rat and Man**. Journal of Periodontology, [s.l.], v. 46, n. 11, p.677-680, nov. 1975.
- LIU, Yen-chun G.; LERNER, Ulf H.; TENG, Yen-tung A. **Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles**. Periodontology 2000, [s.l.], v. 52, n. 1, p.163-206, fev. 2010.
- LÖE, Harald; THEILADE, Else; JENSEN, S. Börglum. **Experimental Gingivitis in Man**. Journal of Periodontology, [s.l.], v. 36, n. 3, p.177-187, maio 1965.
- LUSTOSA, Sarah Rodrigues. **Padronização de extrato de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007
- MAYWORM, Marco A. S. et al. **Does Propolis Contain Tannins?** Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 2014, p.1-4, 2014.

MCCAUL, L K; JENKINS, W M M; KAY, e J. **The reasons for extraction of permanent teeth in Scotland: a 15-year follow-up study**. British Dental Journal, [s.l.], v. 190, n. 12, p.658-662, jun. 2001.

MENDONÇA, Izabel Cristina Gomes de et al. **Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells**. BMC Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-12, 14 out. 2015.

MEYER, Waltraud; ULRICH, W. **'Propolis Bees' and Their Activities**. Bee World, [s.l.], v. 37, n. 2, p.25-36, fev. 1956.

MING, Xiaodong et al. **Biochanin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells**. Life Sciences, [s.l.], v. 136, p.36-41, set. 2015.

MIRANDA, Stela Lima Farias et al. **Brazilian red propolis reduces orange-complex periodontopathogens growing in multispecies biofilms**. Biofouling, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 308-319, 16 mar. 2019

MOLON, Rafael Scaf de et al. **Characterization of ligature-induced experimental periodontitis**. Microscopy Research and Technique, [s.l.], v. 81, n. 12, p.1412-1421, 23 out. 2018.

MOLON, Rafael Scaf de et al. **Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice**. Journal of Periodontology, [s.l.], v. 85, n. 3, p.465-477, mar. 2014.

MONTANDON, Andréia Affonso Barretto; ZUZA, Elizangela Partata; TOLEDO, Benedicto Egbert Corrêa de. **Prevalence and Reasons for Tooth Loss in a Sample from a Dental Clinic in Brazil**. International Journal of Dentistry, [s.l.], v. 2012, p.1-5, 2012.

MOSMANN, Tim. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of Immunological Methods, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p.55-63, dez. 1983.

MUNIZ, Francisco Wilker Mustafa Gomes et al. **Azithromycin: A new concept in adjuvant treatment of periodontitis**. European Journal of Pharmacology, [s.l.], v. 705, n. 1-3, p.135-139, abr. 2013.

NASCIMENTO, Ticiano Gomes do et al. **Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study**. Scientific Reports, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-16, dez. 2019.

NASCIMENTO, Ticiano Gomes do et al. **Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis**. Journal of Apicultural Research, [s.l.], v. 57, n. 2, p.246-254, 13 fev. 2018.

NASCIMENTO, Ticiano Gomes do et al. **Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal**

**activity: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity.** *Nanoscale Research Letters*, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-16, 17 jun. 2016.

NASSAR, Carlos Augusto et al. **Efeito de Antiinflamatório no Desenvolvimento da Doença Periodontal Induzida.** Avaliação Radiográfica em Ratos. *Revista de Odontologia da Unesp, S.I.*, v. 32, n. 2, p.125-130, jul. 2004.

NUNES, Lívio César Cunha et al. **Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em Artermia salina.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, [s.l.], v. 19, n. 2, p.524-529, jun. 2009.

OLCZYK, Pawel et al. **Propolis Modulates Fibronectin Expression in the Matrix of Thermal Injury.** *Biomed Research International*, [s.l.], v. 2014, p.1-10, 2014.

OLIVEIRA, Guilherme José Pimentel Lopes de et al. **Effects of avocado/soybean unsaponifiables (ASU) on the treatment of ligature-induced periodontitis in rats.** *Brazilian Oral Research*, [s.l.], v. 31, p.1-11, 2017.

ÖZDEN, Feyza Otan et al. **Effects of grape seed extract on periodontal disease: an experimental study in rats.** *Journal of Applied Oral Science*, [s.l.], v. 25, n. 2, p.121-129, abr. 2017.

PALASKA, Iro et al. **Use of polyphenols in periodontal inflammation.** *European Journal Of Pharmacology*, [s.l.], v. 720, n. 1-3, p. 77-83, nov. 2013

PASUPULETI, Visweswara Rao et al. **Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits.** *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, [s.l.], v. 2017, p.1-21, 2017.

PAULINO, Niraldo et al. **Antiulcerogenic Effect of Brazilian Propolis Formulation in Mice.** *Pharmacology & Pharmacy*, [s.l.], v. 06, n. 12, p.580-588, 2015.

PELLEGRINI, G. et al. **Pre-clinical Models for Oral and Periodontal Reconstructive Therapies.** *Journal of Dental Research*, [s.l.], v. 88, n. 12, p.1065-1076, 3 nov. 2009.

PENTEADO, Luiz Alexandre Moura et al. **Evaluation of the effect of tacrolimus on periodontitis induced in rats.** *Archives of Oral Biology*, [s.l.], v. 80, p.89-94, ago. 2017.

PIHLSTROM, Bruce L; MICHALOWICZ, Bryan S; JOHNSON, Newell W. **Periodontal diseases.** *The Lancet*, [s.l.], v. 366, n. 9499, p.1809-1820, nov. 2005.

PIPPI, B. et al. **In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on Candida spp.** *Journal of Applied Microbiology*, [s.l.], v. 118, n. 4, p.839-850, 4 fev. 2015.

POPOVA, Christina; DOSSEVA-PANOVA, Velitchka; PANOVA, Vladimir. **Microbiology of Periodontal Diseases.** A Review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, [s.l.], v. 27, n. 3, p.3754-3759, jan. 2013.

- PORTO, Isabel Cristina Celerino de Moraes et al. **Mechanical and aesthetics compatibility of Brazilian red propolis micellar nanocomposite as a cavity cleaning agent.** *Bmc Complementary And Alternative Medicine*, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 1-17, 18 jul. 2018.
- PRIETTO, Núbia Rosa. **Tratamento da Periodontite Experimental em Ratos com Clorexidina como Adjuvante à Terapia Periodontal Não-Cirúrgica.** 2017. 38 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.
- RAVISHANKAR, Divyashree et al. **Exploring quercetin and luteolin derivatives as antiangiogenic agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, [s.l.], v. 97, p.259-274, jun. 2015.
- RÊGO, Roberto Dias et al. **Avaliação Morfométrica Do Efeito Do Óleo Essencial Do Croton Zehntneri (OECZ) Sobre A Perda Óssea Alveolar Em Ratos Com Periodontite Induzida.** *Rev Periodontia, S. L.*, v. 20, n. 2, p.69-75, jun. 2010.
- REGUEIRA, M.S. et al. **Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening.** *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 107, p.572-580, set. 2017.
- RIBEIRO, M.R.G.. et al. **Resultados da aplicação tópica do extrato de própolis na redução da progressão da doença periodontal.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, [s.l.], v. 17, n. 42, p.915-921, 2015.
- SALATINO, Antonio et al. **Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis.** *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, [s.l.], v. 2, n. 1, p.33-38, 2005.
- SALOMÃO, Kelly et al. **Brazilian Propolis: Correlation between Chemical Composition and Antimicrobial Activity.** *Evidence-based Complementary And Alternative Medicine*, [s.l.], v. 5, n. 3, p.317-324, 2008.
- SANKARI, Sleena et al. **Flavonoids - Clinical effects and applications in dentistry: A review.** *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, [s.l.], v. 6, n. 5, p.26-29, 2014.
- SEOL, Yang-jo et al. **Preclinical Methods for the Evaluation of Periodontal Regeneration In Vivo.** *Methods In Molecular Biology*, [s.l.], v. 666, p.285-307, 2010.
- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Indicações Geográficas Brasileiras: Mel e Própolis.** Brasília: Inpi, 2015. 52 p.
- SFORCIN, J.M. **Propolis and the immune system: a review.** *Journal of Ethnopharmacology*, [s.l.], v. 113, n. 1, p.1-14, ago. 2007.
- SFORCIN, José M. **Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis.** *Phytotherapy Research*, [s.l.], v. 30, n. 6, p.894-905, 14 mar. 2016.

- SILVA, Bruno B. et al. **Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis**. Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 5, n. 3, p.313-316, 2008.
- SILVA, F. R. G. et al. **Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas**. Brazilian Journal of Biology, [s.l.], v. 79, n. 3, p.452-459, set. 2019.
- SIMONE-FINSTROM, Michael et al. **Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health**. Insects, [s.l.], v. 8, n. 2, p.46-66, 29 abr. 2017.
- SINGH, Krishna Bhan et al. **Formononetin, a methoxy isoflavone, enhances bone regeneration in a mouse model of cortical bone defect**. British Journal of Nutrition, [s.l.], v. 117, n. 11, p.1511-1522, 14 jun. 2017.
- SOCRANSKY, S.s. et al. **Microbial complexes in subgingival plaque**. Journal of Clinical Periodontology, [s.l.], v. 25, n. 2, p.134-144, fev. 1998.
- SONMEZ, Sule et al. **The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts**. Journal of Ethnopharmacology, [s.l.], v. 102, n. 3, p.371-376, dez. 2005.
- SOROMOU, Lanan Wassy et al. **In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses**. International Immunopharmacology, [s.l.], v. 14, n. 1, p.66-74, set. 2012.
- SOROMOU, Lanan Wassy et al. **Protection of mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by pinocembrin is correlated with regulation of cytokine secretion**. Journal of Immunotoxicology, [s.l.], v. 11, n. 1, p.56-61, 22 maio 2013.
- STEPANOVI, Srdjan et al. **In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs**. Microbiological Research, [s.l.], v. 158, n. 4, p.353-357, 2003.
- STRUILLLOU, Xavier et al. **Experimental Animal Models in Periodontology: A Review**. The Open Dentistry Journal, [s.l.], v. 4, n. 1, p.37-47, 29 abr. 2010.
- TEIXEIRA, Érica Weinstein et al. **Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples**. Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 7, n. 3, p.307-315, 2010.
- TEIXEIRA, Érica Weinstein et al. **Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Brazilian Propolis Samples**. Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 7, n. 3, p.307-315, 2010.
- TENG, Yen-tung A. et al. **Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection**. Journal of Clinical Investigation, [s.l.], v. 106, n. 6, p.59-67, 15 jan. 2000.

TOKER, Hulya et al. **A Morphometric and Histopathologic Evaluation of the Effects of Propolis on Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats**. Journal of Periodontology, [s.l.], v. 79, n. 6, p.1089-1094, jun. 2008.

TRUSHEVA, Boryana et al. **Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis**. Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 3, n. 2, p.249-254, 2006.

UCHINO, Kaho et al. **Dual Effects of Liquiritigenin on the Proliferation of Bone Cells: Promotion of Osteoblast Differentiation and Inhibition of Osteoclast Differentiation**. Phytotherapy Research, [s.l.], v. 29, n. 11, p.1714-1721, 14 jul. 2015.

VARGAS-SANCHEZ, Paula Katherine et al. **Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model**. Journal of Applied Oral Science, [s.l.], v. 25, n. 5, p.490-497, out. 2017.

VETTORE, Mario Vianna; MARQUES, Regina Auxiliadora de Amorim; A PERES, Marco. **Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrazil 2010: abordagem multinível**. Revista de Saúde Pública, [s.l.], v. 47, n. 3, p.29-39, dez. 2013.

WALTERS, John; LAI, Pin-chuang. **Should Antibiotics Be Prescribed to Treat Chronic Periodontitis?** Dental Clinics of North America, [s.l.], v. 59, n. 4, p.919-933, out. 2015.

WONIAK, Magdalena et al. **The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes**. Revista Brasileira de Farmacognosia, [s.l.], v. 29, n. 3, p.301-308, maio 2019.

XIE, Yixi et al. **Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism**. Current Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 22, n. 1, p.132-149, 26 nov. 2014. 6113443.

YU, Chen et al. **Perspectives Regarding the Role of Biochanin A in Humans**. Frontiers In Pharmacology, [s.l.], v. 10, p.1-11, 12 jul. 2019.

ZABAIYOU, Nada et al. **Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product**. Chemistry And Physics of Lipids, [s.l.], v. 207, p.214-222, out. 2017.

ZHU, Lingxin et al. **Licorice isoliquiritigenin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo**. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, [s.l.], v. 44, n. 7, p.1139-1152, jul. 2012.

ZHU, Lingxin et al. **Licorice isoliquiritigenin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo**. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, [s.l.], v. 44, n. 7, p.1139-1152, jul. 2012.

## ANEXO

## Anexo Único: Certificado CEUA – UFAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Influência da aplicação tópica do gel de Propólis Vermelha Brasileira na progressão da periodontite experimental em ratos*”, registrada com o nº 69/2018, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 15 de março de 2019.

Vigência da autorização	15.04.2019 a 20.03.2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	42
Peso/idade	220 g / 70 dias
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da ESENFAR/UFAL
Colaboradores	Luiz Alexandre M. Penteado e Aubert Kristhian S. Alves

Maceió, 19 de março de 2019.

Elvan Nascimento dos Santos Filho

Coordenador da CEUA

SIAPE 1756479