



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO DE
SUSPENSÕES DE PRÓPOLIS NA DOENÇA PERIODONTAL
INFLAMATÓRIA INDUZIDA EM RATOS**

SAMUEL LUNGAREZE

**MANAUS
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

SAMUEL LUNGAREZE

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO DE
SUSPENSÕES DE PRÓPOLIS NA DOENÇA PERIODONTAL
INFLAMATÓRIA INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração Princípios Bioativos Pró-Saúde da Diversidade Amazônica.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Tatiana Nayara Libório dos Santos

**MANAUS
2010**

L963a

LUNGAREZE, Samuel

Avaliação histopatológica do efeito de suspensões de própolis na doença periodontal inflamatória induzida em ratos./Samuel Lungareze. Manaus: UFAM, 2010.

99p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Manaus, 2010.

1. Periodontia 2. Própolis 3.Irrigação Subgengival 4.Bolsa periodontal. I Título.

CDU: 616.311.2

SAMUEL LUNGAREZE

**AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO EFEITO DE
SUSPENSÕES DE PRÓPOLIS NA DOENÇA PERIODONTAL
INFLAMATÓRIA INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração Princípios Bioativos Pró-Saúde da Diversidade Amazônica.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. André Augusto Franco Marques
Universidade Estadual do Amazonas

Dedicatória

A minha esposa, Wanderlene, que me acompanhou e incentivou em todas as etapas desse projeto, ajudando-me a atingir mais essa meta em minha vida profissional.

Aos meus pais, Thiago e Lourdes, por suas orações diárias.

Agradecimentos,

Sou grato a Deus, aquele que até aqui tem sido presente em minha vida e me deu condições para mais esta vitória.

A minha família, que durante todo esse período me apoiou para poder vencer os obstáculos do dia a dia.

As Professoras, Dra. Fulgência e Dra. Tatiana Libório, pela dedicação, orientações e contribuições à minha formação científica.

Ao Sr. Egydio Schwade e Mauricio Adú Schwade, pelo auxílio e colaboração na coleta da Própolis.

Ao Professor Dr. Emerson Lima e ao Farmacêutico Ricardo, pelas orientações para elaboração das suspensões de própolis.

Aos companheiros do INPA (Rosenice, Plíneo, Gomes, Barbara) pelo apoio técnico dispensado nessa instituição de pesquisa.

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFAM e as companheiras Fátima, Iolanda e Neybe, técnicas do laboratório de Histopatologia da UFAM, pela dedicação e pelo empenho em nossas atividades laboratoriais.

Aos professores do Mestrado em Ciências da Saúde, pelos ensinamentos.

Muito obrigado.

RESUMO

A doença periodontal (DP) está intimamente associada com a formação de biofilme dental, podendo progredir para formação de uma bolsa periodontal. A própolis tem sido utilizada como produto medicinal desde 300 a.C., e apresenta como características: atividades anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica. A atividade antimicrobiana da própolis frente aos periodontopatógenos já foi investigada através de testes *in vitro* e *in vivo*, principalmente através de extratos etanólicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar histologicamente a resposta da DP inflamatória induzida no tecido periodontal de ratos após a utilização de suspensões aquosas de própolis (SAP) a 0,1%, 1% e 10%, para irrigação subgengival. Foram utilizados 84 ratos wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 210 e 290g, com oito semanas de idade, distribuídos nos seguintes grupos experimentais: grupo I (n=14, SAP a 0,1%), grupo II (n=14, SAP a 1%), grupo III (n=14, SAP a 10%), grupo IV (n=14, Solução de Tween 80 a 5%), grupo V (controle positivo, n=14, com DP induzida e sem tratamento), grupo VII (n=14, clorexidina a 2%) e grupo VI (n=84, controle negativo, dentes contralaterais não induzidos e não tratados nos animais dos grupos I, II, III, IV, V e VII). A DP inflamatória foi induzida através da técnica da ligadura com fios de algodão durante um período de 15 dias na cervical do 1º molar inferior esquerdo. Após a remoção do fio a bolsa periodontal foi irrigada 3 vezes (1º, 4º e 7º dias) com as Soluções testes e o sacrifício foi realizado com 15 e 30 dias após o tratamento. Foi realizado teste exato de Fisher (p-valor 0,05). Analisando comparativamente os resultados pode-se sugerir que a SAP foi eficiente considerando principalmente a resposta inflamatória em curto prazo (15 dias) e na concentração de 0,1%, associada à presença de fibras gengivais densas, vasos sanguíneos sem congestão, ausência de reabsorções dentárias e perdas ósseas, podendo ser uma alternativa de tratamento da DP necessitando de estudos futuros para demonstrar a viabilidade biológica na utilização como coadjuvante na terapêutica periodontal.

Palavras chave: Própolis, Irrigação Subgengival, Bolsa Periodontal, Periodontite, ratos.

ABSTRACT

The Periodontal disease (DP) is very strongly associated with the dental biofilm and may evolve the formation of a periodontal pocket. The propolis has been used as a medicinal product since 300 b.C, and has the following characteristics: anti-cancer activities, antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, and antifungal. The propolis antimicrobial activity in face of periodontal pathogens has been investigated though *in vitro* and *in vivo* tests, mainly with the etanolic extracts. The following paper had as an objective evaluate the histological response of the inflammatory DP induced on the rats periodontal tissue after the use of a watery suspension of propolis (SAP), at 0,1%, 1%, and 10%, for subgingival irrigation. Was used 84 wistar rats (*Rattus novergicus*), weighting between 210 and 290g with eight weeks old. They were distributed in the following experimental groups: group I (n= 14, SAP at 0,1%), group II (n=14, SAP at 1%), group III (n=14, SAP at 10%), group IV (n=14, Tween`s solution 80 at 5%), group V (positive control, n=14, with induced DP and without treatment), group VII (n=14, chlorhexidine at 2%) and group VI (n=84, negative control, not induced contralateral teeth and not treated on animals of groups I, II, III, IV, V e VII). The inflammatory DP was induced with the technique that uses the ligation with cotton yarn during a period of 15 days on the cervical of the first left inferior molar. After the removal of the yarn the periodontal pocket was irrigated 3 times (1st, 4th and 7th days) with the tests solution and the sacrifice was done on the 15th and 30th day after treatment. Was done the test exact of Fisher (p-value 0,05). Analyzing comparatively the results you may suggest that the propolis suspension on the concentration of 0,1% is efficient considering the short term inflammatory response (15 days), associated to the presence of dense gingival fibers, blood vessels without congestion, no dental reabsorption and bone loss. There for may be used as an alternative treatment for the periodontal disease, needing further studies to demonstrate the biological viability on the use as supporting on the periodontal therapeutic.

Key words: Propolis, Subgingival irrigation, periodontal pocket, periodontitis, rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A. Própolis coletada. B. Pilão e cadinho de porcelana utilizado na trituração da própolis.....	39
Figura 2	A. Amostra sob agitação em banho de água termostatzada. B. Sobrenadante – EEP.....	39
Figura 3	A. Tubos de ensaio com 5mL de EEP. B. Centrivap Concentrator da Labconco.....	40
Figura 4	A. Béquer com “Pasta de Própolis”. B. SAP a 0,1%, C. SAP a 1,0% e D. SAP a 10,0%.....	40
Figura 5	SAP a 0,1% (I), SAP a 1% (II), SAP a 10% (III) e T80 a 5% (IV).....	40
Figura 6	A. Fio instalado com nó na mesial. B. 1º molar inferior esquerdo com ligadura e biofilme acumulado.....	46
Figura 7	A. Irrigação subgingival. B. Peça preparada e acondicionada em cassete. C. Peça marcada com tinta nanquim sendo incluída em parafina em molde metálico.....	46
Figura 8	Junção dentogengival mostrando os limites entre o Epitélio gengival (EG), Epitélio sulcular (ES), Epitélio juncional (EJ) e Junção cimento-esmalte (JCE) (H.E. 250x).....	51
Figura 9	Diagrama da relação entre gengiva e junção amelo-cementária na mesial do 1º molar inferior do rato (adaptado de Johnson, 1975).....	51
Figura 10	Padrão de corte mostrando área de furca (F), raiz mesial (RM), raiz distal (RD), gengiva mesial (GM) e gengiva distal (GD) (H.E. 40x).....	52
Figura 11	A. Região mesial em exemplar do grupo I e 15 dias com biofilme leve. B. Biofilme moderado em dente do grupo II e 30 dias C. Biofilme intenso em dente do grupo IV com 30 dias (H.E. 100x).....	52
Figura 12	A. Fibras gengivais esparsas e vasos congestos (seta) na região de furca de um dente do grupo IV e 15 dias (H.E. 200x). B. Fibras gengivais moderadas na região de furca de um dente do grupo III e 15 dias (H.E. 200x). C. Fibras gengivais densas e vasos congestos (seta) na mesial de um dente do grupo II e 15 dias (H.E. 200x). D. Região de fibras gengivais esparsas e infiltrado inflamatório moderado (H.E. 400x). E. Fibras gengivais esparsas na região de furca em dente do grupo IV e 15 dias com infiltrado inflamatório mononuclear e vasos congestos (seta) (H.E. 400x).....	53
Figura 13	A. Região mesial com infiltrado inflamatório leve em dente do grupo I e 15 dias (H.E. 200x). A1. Retângulo de A em maior aumento mostrando região do epitélio juncional com exocitose de células inflamatórias mononucleares e inflamação leve no tecido conjuntivo (setas) (H.E. 400x). B. Região de furca com infiltrado inflamatório moderado em dente do grupo VII e 30 dias (H.E. 200x). B1. Retângulo de B em maior aumento mostrando região do epitélio de bolsa com exocitose de células inflamatórias mononucleares (setas), fibras moderadas, vasos congestos (H.E. 400x). C. Região interproximal em dente do grupo I mostrando infiltrado inflamatório moderado polimorfonuclear (H.E. 400x), com inserto evidenciando neutrófilos (H.E 1000x).....	54
Figura 14	A. Região de furca em dente do grupo IV e 15 dias com perda óssea total e infiltrado inflamatório intenso e difuso (H.E. 40x). A1. Retângulo de A em maior aumento mostrando infiltrado inflamatório intenso e células mononucleares difusas e vasos congestos (setas) (H.E. 200x). Inserto em A1 evidenciando infiltrado intenso com células mononucleares (setas) (H.E. 400x).....	55

Figura 15	A. Região de furca com infiltrado inflamatório intenso polimorfonuclear em dente do grupo V e 15 dias (H.E. 400x). A1. Retângulo de A em maior aumento evidenciando polimorfonuclear neutrófilo (setas) (H.E. 1000x).....	55
Figura 16	Exemplos de perda óssea: A. Furca sem perda (grupo VI, 30dias), B. Furca no terço cervical (grupo IV, 15 dias) , C. Mesial no terço cervical (grupo VI, 15 dias), D. Furca e mesial no terço médio (grupo VII, 15 dias), E. Furca na cervical e mesial no terço apical (grupo I, 15 dias), F. Perda total (grupo IV, 30 dias), G. Distal no terço apical (grupo IV, 30 dias), H. Perda total (grupo IV, 30 dias) (H.E. 40x).....	56
Figura 17	Região de furca em dente com extensa perda óssea mostrando sequestro ósseo (S), epitélio de bolsa (E), dentina radicular com extensa área de reabsorção (R) (H.E. 40x). A1. Retângulo em maior aumento de A mostrando osteoclasto e vasos congestos (H.E. 400x) A2. Retângulo em maior aumento de A mostrando Resto Epitelial de Malassez (seta) e reabsorção dentária (R) (H.E. 400x).....	57
Figura 18	A. Sequestro ósseo na região de furca, grupo VII e 30 dias (H.E. 40x). B. Sequestro ósseo ainda envolto por tecido conjuntivo, grupo VII e 15 dias (H.E. 100x) e C. Sequestro ósseo na região interdental, grupo V e 15 dias (H.E. 100x).....	57
Figura 19	Perda óssea mesial (M) e distal (D) classificadas ao nível do terço médio e perda óssea no terço cervical da região da furca (F) em um dente do grupo I de 15 dias (H.E. 40x).....	66
Figura 20	Dente tratado com Tween 80 a 5%, do período de 30 dias apresentando perda óssea nas regiões mesial (M), distal (D) e furca (F) ao nível do $\frac{1}{3}$ apical, presença de sequestro ósseo (S) na região da furca e na distal, reabsorção dentária (RD) extensa na raiz mesial (H.E. 40x).....	66
Figura 21	Fibras moderadas na região de furca. Exemplo no grupo I (A), grupo V (B) e grupo VII (C) (H.E. 200x).....	75
Figura 22	Exemplar de dente do grupo VI mostrando nível ósseo na mesial e distal no terço cervical. A. Raiz distal (RD). B. Raiz mesial (RM). ★ Nível ósseo. (H.E. 40x).....	82
Figura 23	A. Mesial (H.E. 200x). B. Região do retângulo aumentada sem exocitose, fibras gengivais densa e ausência de infiltrado inflamatório (H.E. 400x).....	82
Figura 24	Distal de dente do grupo VI mostrando epitélios com exocitose, fibras gengivais densas (F), vasos sanguíneos congestos (V) e infiltrado inflamatório moderado com células mononucleares e polimorfonucleares. Junção cimento-esmalte (J) (H.E. 400x).....	83
Figura 25	Fluxograma das atividades e etapas experimentais.....	92
Figura 26	Clivagem: (A) Antes do 1º corte, (B) após 1º corte e fragmento distal a ser eliminado, (C) antes do 2º corte, (D) após 2º corte e fragmento vestibular a ser eliminado, (E) antes do 3º e 4º corte e (F) após 3º e 4º corte e fragmentos mesial e apical a serem eliminado.....	94
Figura 27	Protocolo de inscrição no Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da UFAM.....	99

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Distribuição dos grupos experimentais.....	41
Quadro 2	Redistribuição dos grupos experimentais com vista ao sacrifício.....	43
Tabela 1	Cruzamento entre perda óssea com os Subgrupos.....	63
Tabela 2	Cruzamento entre Infiltrado Inflamatório com Subgrupos.....	68
Tabela 3	Cruzamento entre Fibras com subgrupos.....	75
Tabela 4	Cruzamento entre Reabsorção Dentaria com os Subgrupos.....	79
Tabela 5	Frequência de perda óssea no grupo VI.....	83
Tabela 6	Frequência da intensidade do infiltrado inflamatório no grupo VI.....	83
Tabela 7	Frequência de tipo de fibras gengivais no grupo VI.....	83
Tabela 8	Tabela utilizada no exame histopatológico (1ª parte).....	97
Tabela 9	Tabela utilizada no exame histopatológico (2ª parte).....	98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Dentes sem perda óssea (SP) ou perda óssea no nível do $\frac{1}{3}$ cervical (C) na região da furca nos subgrupos com sacrifício em 30 dias.....	65
Gráfico 2	Dentes com perda óssea no $\frac{1}{3}$ médio (M), Perda no nível do $\frac{1}{3}$ apical (A) e perda óssea total (T) na região da furca nos subgrupos com sacrifício em 30 dias.....	65
Gráfico 3	Incidência de Infiltrado inflamatório ausente (0), leve (1) ou moderado (2) na região mesial nos subgrupos sacrificados em 15 dias.....	69
Gráfico 4	Incidência de Infiltrado inflamatório ausente (0), leve (1) ou moderado (2) na região mesial nos subgrupos sacrificados em 30 dias.....	69
Gráfico 5	Incidência do tipo celular entre os subgrupos sacrificados em 15 dias na região mesial (0: ausencia de céls. Inflamatórias, M: células mononucleares e M/P: células mononucleares e polimorfonucleares.....	70
Gráfico 6	Distribuição dos tipos celulares do infiltrado inflamatório nos subgrupos sacrificados em 30 dias na região da furca: polimorfonucleares (P), mono e polimorfonucleares (M/P) e mononucleares (M)	72
Gráfico 7	Distribuição dos tipos celulares do infiltrado inflamatório nos subgrupos sacrificados em 15 dias na região distal: polimorfonucleares (P), mono e polimorfonucleares (M/P) e mononucleares (M).....	73
Gráfico 8	Incidência de fibras gengivais Densas na mesial nos subgrupos sacrificados em 30 dias.....	76
Gráfico 9	Incidência de fibras densas (D) ou moderadas (M) por subgrupo (região distal).....	76
Gráfico 10	Presença (P) ou Ausência (A) de vasos sanguíneos congestos nos subgrupos na distal.....	78
Gráfico 11	Presença (P) ou ausência (A) de Reabsorções Dentárias nos subgrupos com sacrifício em 30 dias.....	79
Gráfico 12	Média do Biofilme por grupo experimental.....	95
Gráfico 13	Média do Biofilme por subgrupo no período de 15 dias.....	95
Gráfico 14	Média do Biofilme por subgrupo no período de 30 dias.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

-	Negativo
%	Por cento
+	Positivo
a.C.	Antes de Cristo
C+	Controle positivo
CCDAE-FR	A cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa
CG/EM	cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
Clorex	Clorexidina
CONAP	Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda.
CONAPIS	Órgão de informação da CONAP
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EEP	extrato etanólico de própolis
FEI-UEM	Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá
g	Gramas
HE	Hematoxilina e Eosina
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MG	Minas Gerais
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Mato Grosso do Sul
°C	Graus Célsius
°GL	“graus Gay-Lussac”, diz qual a porcentagem de etanol existente na solução
pH	grandeza físico-química “ <i>potencial hidrogeniônico</i> ”, indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução líquida.
PR	Paraná
rpm	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SAP	Suspensão aquosa de própolis
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório
SP	São Paulo
T80	Tween 80
U.V.	Ultravioleta
UFAM	Universidade federal do Amazonas
UNESP	Universidade do Estado de São Paulo
FOAr/SP	Faculdade de Odontologia de Araraquara/São Paulo
µg/mL	Micrograma por mililitro
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1 A doença periodontal.....	18
1.2 Doença periodontal inflamatória experimental.....	19
1.3 Própolis.....	21
1.3.1 Composição da própolis.....	22
1.3.2 Propriedades biológicas da própolis.....	24
1.3.2.1 Ação anti-inflamatória.....	25
1.3.2.2 Ação antimicrobiana.....	25
1.3.2.3 Ação contra os periodontopatógenos.....	29
1.3.3 Uso da própolis na Odontologia/Periodontia.....	30
2. OBJETIVOS.....	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1 Modelo de Estudo.....	36
3.2 Locais da pesquisa.....	36
3.3 Considerações éticas.....	36
3.4 Benefícios.....	37
3.5 Coleta das amostras de própolis da <i>Apis mellifera</i>.....	37
3.6 Tratamento das amostras de própolis <i>In Natura</i>.....	37
3.7 Obtenção do extrato etanólico de própolis.....	38
3.8 Obtenção das Suspensões de Própolis a 0,1%, 1% e 10%.....	38
3.9 Avaliações histopatológicas das Suspensões de Própolis na doença periodontal	41
3.9.1 Os Animais.....	41
3.9.2 Indução de Doença Periodontal inflamatória.....	41
3.9.3 Tratamento da Doença Periodontal.....	42
3.9.4 Sacrifício dos animais.....	43
3.9.5 Preparo histotécnico.....	43
3.9.6 Análise histopatológica morfológica.....	45
3.9.6.1 Junção dentogengival.....	47
3.9.6.2 Tecido conjuntivo.....	47
3.9.6.3 Ligamento periodontal.....	49
3.9.6.4 Tecido ósseo.....	49
3.9.6.5 Biofilme.....	50
3.10 Análise estatística.....	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 Comparação entre os grupos experimentais.....	63
4.1.1 Perda óssea.....	63
4.1.2 Infiltrado inflamatório.....	67

4.1.3 Fibras gengivais.....	73
4.1.4 Vasos sanguíneos.....	77
4.1.5 Reabsorções dentárias.....	78
4.1.6 Outras observações.....	79
4.2 Grupo VI (controle negativo).....	80
CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICE A – Fluxograma das atividades e etapas experimentais.....	92
APÊNDICE B – Clivagem das peças.....	93
APÊNDICE C – Biofilme.....	95
APÊNDICE D – Modelo de ficha para avaliação histológica.....	97
APÊNDICE E – Comitê de ética e pesquisa animal.....	99

INTRODUÇÃO

A doença periodontal está associada a infecções oportunistas e com a formação de biofilme dental nas superfícies radiculares. Fatores como a patogenicidade e a especificidade bacterianas e predisposição do indivíduo para manifestar a doença, como por exemplo, resistências locais e sistêmicas podem influenciar no estabelecimento, na taxa de progressão e nas características clínicas das desordens dentais associadas ao biofilme (LINDHE et al., 2005).

Nesse contexto a bolsa periodontal se caracteriza por ser um sulco aprofundado patologicamente entre a gengiva e o dente, pode causar retração da gengiva marginal e o desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento de bactérias anaeróbias e outros microrganismos responsáveis pela doença na superfície da raiz do dente e na camada mais externa do cimento (CARRANZA et al., 2004).

A própolis é uma substância resinosa, coletada, transformada pelas abelhas *Apis Mellifera*, utilizada nas colmeias como selante e vedante. A vegetação, o clima e outros fatores ambientais influem nas características e composição da própolis de cada região (PARK et al., 1995, 1997).

Há referências históricas que a própolis tem sido utilizada como produto medicinal desde 300 a.C., sendo que no Antigo Egito foi usado no processo de embalsamento das múmias e na Grécia foi utilizada na forma de unguento (MARCUCCI et al., 2001). Estudos demonstraram que a própolis é composta de mais de 300 (trezentas) substâncias, entre estas as mais importantes são os flavonoides e seus compostos fenólicos. Tendo a própolis as seguintes propriedades: atividades anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, antibiótica e antifúngica (BANSKOTA et al., 2001; BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1995).

Especificamente quanto à ação anti-inflamatória verificou-se que a própolis é um

potencial anti-inflamatório que atua em estágios agudos e crônicos. Algumas substâncias encontradas contribuem para a supressão da síntese de prostaglandinas e leucotrienos por macrófagos (RAMOS; MIRANDA, 2007). Entre os flavonóides encontrados na própolis, a galangina apresenta atividade inibitória contra a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase e o ácido fenil éster caféico (CAPE) inibi a liberação de ácido araquidônico da membrana celular, suprimindo as atividades das enzimas COX-1 e COX-2 (BORRELLI et al., 2002).

A ação antimicrobiana da própolis foi confirmada por estudos *in vitro*, inclusive com ação antifúngica, agindo sobre as bactérias do grupo Gram positivo com maior eficácia, muito embora os efeitos sejam satisfatórios também sobre o grupo Gram negativo. Destacando-se que a ação antimicrobiana está diretamente relacionada aos níveis de compostos fenólicos e flavonoides existentes em sua composição (GONZALES et al., 2006; LONGHINI et al., 2007; OTA et al., 2001).

Na odontologia a aplicação da própolis tem sido objeto de estudo nas diversas especialidades por sua ação terapêutica, anestésica, cicatrizante e como antisséptico bucal, e na periodontia sua aplicação abrange a ação antisséptica e anti-inflamatória.

Deste modo, estudos *in vivo* com irrigação de extrato etanólico de própolis na bolsa periodontal mostraram sua eficácia na diminuição do total de bactérias viáveis e dos níveis de *P. Gingivalis*. A proporção de sítios com presença detectável de fungos diminuiu com o tratamento com extrato de própolis, não levando à seleção de organismos oportunistas tais como Estafilococos coagulase positiva e *Pseudomonas sp.* Ocorrendo também uma diminuição da profundidade de sondagem após seis meses do procedimento de irrigação (GEBARA et al., 2001).

As propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias e sua eficácia já comprovada em relação aos periodontopatógenos sugerem que a utilização de suspensão aquosa de própolis para fins de irrigação subgengival pode contribuir como coadjuvante no tratamento

periodontal propiciando a diminuição da colonização bacteriana subgengival e a redução do processo inflamatório da doença periodontal, assim esta pesquisa se faz importante e oportuna. Além disso, proporcionará a comprovação da eficácia de uma suspensão que contém princípios ativos com propriedades biológicas oriundos da biodiversidade amazônica e a possível viabilidade de sua introdução na Odontologia.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A doença periodontal

A doença periodontal é caracterizada por infecções oportunistas associadas com a formação de biofilme bacteriano sobre as superfícies dentárias. Fatores como a patogenicidade e a especificidade bacterianas, bem como fatores relacionados à predisposição do indivíduo para manifestação da doença, como exemplo, resistências locais e sistêmicas podem influenciar o estabelecimento, a taxa de progressão e as características clínicas das desordens dentais associadas ao biofilme (LINDHE et al., 2005).

A bolsa periodontal é um sulco aprofundado patologicamente entre a gengiva e o dente, que pode causar a retração da gengiva marginal e o desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento na superfície da raiz do dente e na camada mais externa do cemento de bactérias anaeróbias e outros microrganismos responsáveis pela doença. Classificam-se em bolsas gengivais (pseudobolsas) quando ocorre apenas um aumento gengival, e em bolsas periodontais quando ocorre destruição dos tecidos de suporte. As bolsas periodontais podem ainda ser de dois tipos: supra-óssea (quando o fundo da bolsa é coronário ao osso alveolar de suporte) e infra-óssea (quando o fundo da bolsa se encontra apical ao nível do osso alveolar adjacente e a parede lateral da bolsa se encontra entre a superfície dentária e o osso alveolar) (CARRANZA et al., 2004)

Os principais sinais da periodontite são a perda de inserção e a formação de bolsa. Entre as características histopatológicas da bolsa periodontal destaca-se: vilosidades irregulares junto ao tecido conjuntivo, para o lado da bolsa, recobrando as papilas de tecido conjuntivo, áreas de epitélio muito delgado e parcialmente ulcerado, na região apical o epitélio da bolsa se transforma em um curto epitélio juncional, migração de granulócitos

neutrófilos polimorfonucleares através do epitélio da bolsa, complexo da lâmina basal junto do tecido conjuntivo parcialmente lesado, grande infiltrado inflamatório, perda de colágeno no tecido conjuntivo subepitelial, reabsorção alveolar e áreas mais profundas da medula óssea transformadas em tecido conjuntivo fibroso (RATEITSCHAK et al., 2006).

O epitélio juncional dental é um tecido que não possui a barreira de permeabilidade superficial, constituindo uma via pela qual toxinas, antígenos e enzimas derivados de biofilme bacteriano, que se formam na superfície dental, podem penetrar e atingir o tecido conjuntivo subepitelial. Isto inicia um ciclo inflamatório e de injúrias teciduais, que facilitam a entrada de irritantes pelo sulco dental e exacerbam os danos (BRUSCHI et al., 2006).

Assim, o tratamento periodontal tem por objetivo a cura do tecido inflamado, a redução do número de bactérias patogênicas e a eliminação da bolsa.

1.2 Doença periodontal inflamatória experimental

Diferentes metodologias animais podem ser utilizadas para se avaliar a patogênese em relação à doença periodontal inflamatória e, considerando ainda, que a anatomia da junção dentogengival da região de molares de ratos é muito semelhante às descritas no homem, esta ferramenta é muito útil para estudos em periodontia (LISTGARTEN, 1975).

A doença periodontal pode ser induzida através da manipulação dietética (ROBINSON et al., 1991), ou pela inoculação de periodontopatógenos ou de seus produtos (FIEHN, et al., 1992), ou mesmo pela colocação de ligaduras no primeiro molar superior ou inferior propiciando a formação e a manutenção de biofilme na região (GYÖRFI, et al., 1994).

Na doença periodontal experimental induzida em ratos, os achados clínicos de sangramento gengival sob sondagem suave, assim como os achados microscópicos de

alterações graduais no epitélio juncional como a formação de cristas epiteliais e migração apical, e ainda no tecido conjuntivo a presença de infiltrado inflamatório contendo linfócitos T e B, macrófagos e PMNs neutrófilos, bem como destruição de fibras colágenas e atividade osteoclástica, são características semelhantes as que ocorrem no homem (IRVING, et al., 1978).

Rodini (2005) caracterizou o modelo experimental da doença periodontal inflamatória induzida por ligadura em ratos, com ênfase na avaliação clínica e microscópica, bem como no estudo quantitativo dos mastócitos e da presença de RNA mensageiro codificador das enzimas óxido nítrico sintase induzível e metaloproteinases -2 e -9. Para isso induziu a doença em diferentes períodos experimentais (1, 3, 7, 14, 28, 42 e 56 dias) e avaliou a evolução microscópica por meio das colorações de hematoxilina-eosina e azul de toluidina.

Muitos estudos procuram avaliar o desenvolvimento da doença periodontal através do modelo experimental da indução da doença mediante a colocação do fio em molares de ratos, podendo a administração das substâncias testes ocorrer concomitante à indução da doença. Em outros casos alterações sistêmicas podem ser provocadas antes mesmo da indução da doença periodontal inflamatória, a exemplo do diabetes. Os estudos são focados principalmente na verificação do nível de perda óssea e relacionam os melhores resultados aos grupos experimentais com menor perda óssea. Diferem ainda na metodologia de avaliação utilizada, seja pelo uso de radiografias (SCHMITD, 2005), morfometria (CAVAGNI et al., 2005; GALVÃO et al., 2003; TOKER et al., 2008) ou histometria (FERNANDES et al., 2007; GONÇALVES et al., 2003; GURGEL, 2003).

1.3 Própolis

A própolis consiste em uma substância resinosa coletada, transformada e utilizada pelas abelhas com o propósito de selar orifícios presentes nas colmeias, vedando a parede interna da mesma e protegendo-a contra a entrada de intrusos. Segundo relatos da literatura, a própolis tem sido utilizada como produto medicinal desde 300 a.C. (GHISALBERTI, 1979) apresentando como características: atividade anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatória, antibiótica e antifúngica (BANSKOTA et al., 2001; BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1995).

Os sacerdotes do antigo Egito utilizavam a própolis para embalsamar os mortos e posteriormente os gregos passaram a utilizá-la na forma de unguento e, por conseguinte, a eles se deve a etimologia da palavra: *pro*, que significa “em defesa de” e *épolis*, “cidade”, ou seja, “em defesa da cidade” (ou colmeia). Na colmeia a própolis tem a função de evitar a entrada de corrente de ar ou frio, embalsamar os cadáveres dos inimigos que entram no interior da colmeia evitando sua decomposição, envernizar o interior (atuando como agente desinfetante) e os favos de crias antes que a rainha desove, para obter assepsia dos ninhos, protegendo-os contra bactérias e vírus (ANDRÉA et al., 2005).

Aristóteles, em seu livro denominado “Catálogo Animal”, registrou a própolis como medicamento para tratar abscessos e feridas, ou seja, utilizada na prevenção de infecções. As abelhas operárias da espécie *Apis mellifera* removem a própolis dos brotos e secreções resinosas presentes nas árvores. Através de suas mandíbulas e de suas patas, realizam a mistura dessas secreções com a cera por elas sintetizadas. As glândulas mandibulares das operárias secretam o ácido 10-hidroxidecenóico, fato este que possibilita o acabamento da própolis (ASIS, 1988; GHISALBERTI, 1979; NIKOLAEV, 1978).

1.3.1 Composição da própolis

A própolis apresenta aroma característico, cor variando entre amarelada, esverdeada clara ao pardo escuro e consistência também variada, dependendo da sua origem botânica. Coletada pelas abelhas *Apis mellifera* em diferentes pontos das plantas: broto, botões florais e exsudatos resinosos, sendo transportadas até a colmeia, onde são acionadas e modificadas em sua composição, através de secreções próprias das abelhas, como cera e secreções salivares essenciais ou, ainda, sendo resultante do processo de digestão do pólen (GHISALBERTI, 1979).

Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas. Mais de trezentas substâncias foram identificadas, com predominância de flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas) das quais se destacam: galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, campferol e quercetina, bem como os aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzoico) e alguns oligoelementos, tais como: alumínio, vanádio, ferro, cálcio, silício, manganês, estrôncio, e vitaminas B1, B2, B6, e C (BANKOVA et al., 1998, 2000; MARCUCCI, 2001).

Os efeitos terapêuticos da própolis têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos que compõem a mesma. Destes, os flavonoides podem ser considerados os principais compostos, encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos e seus ésteres, alcoóis e cetonas (BANKOVA et al., 1983, 1992).

Fatores como a ecologia vegetal da região onde a própolis foi coletada e, até mesmo, a variabilidade genética das rainhas, também influenciam na composição química da própolis. Segundo a CONAPIS (órgão de informação da CONAP, Conselho Nacional de Apicultura Ltda.), a própolis ideal é aquela produzida em regiões onde exista o mínimo possível de

poluição ambiental, longe dos centros urbanos e de fábricas que emitam poluentes (PARK, 1995; PARK et al., 1997).

Segundo Ghisalberti (1979), de modo geral a própolis é composta por 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E.

Nas regiões da Europa, América do Norte e oeste da Ásia, o exsudato do botão do álamo (*Papulus sp.*) constitui a fonte dominante da própolis (MARKHAM et al., 1996; WOLLENWEBER; BUCHMANN, 1997).

Daugusch et al. (2008) estudaram a própolis vermelha e sua origem botânica através de amostras coletadas nos manguezais dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. As abelhas foram observadas coletando exsudatos resinoso vermelho de *Dalbergia ecastophyllum* (família *Leguminosae-Papilionatae*) para produção de própolis. Utilizaram os métodos cromatográficos CLAE-FR e CCDAE-FR para analisar os flavonoides da própolis e da resina vermelha. Concluíram que a origem botânica da própolis vermelha é a *D. ecastophyllum* e que quando é coletada exclusivamente desta planta apresentam atividade antimicrobiana maior que a misturada a outras plantas. Nas áreas onde a *D. ecastophyllum* é rara ou não estar presente, as abelhas coletam de outras plantas.

Park et al. (2002) avaliaram a própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai em busca de evidências fitoquímicas de sua origem vegetal por meio de técnicas cromatográficas. Relataram que a composição da própolis depende da época, vegetação e área da coleta. Após os resultados obtidos por CCDAE-FR, CLAE-FR e CG-EM, as própolis do Sul do Brasil foram classificadas e com base nas evidências fitoquímicas, *Papulus alba* foi identificada como a principal fonte da própolis do sul do Brasil, Argentina e Uruguai.

Alencar et al. (2005) realizaram análises fitoquímicas de própolis produzidas através

de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo) por abelhas *Apis mellifera* africanizadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Os autores relataram a presença de alta proporção de artepilin C e outros derivados do ácido cinâmico. Com base nas evidências fitoquímicas, *B. dracunculifolia* foi identificada como a principal fonte vegetal das própolis produzidas nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Ishida (2006) avaliou *in vitro* a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis coletadas em apiários do estado do Amazonas. Análises como reações de identificação para hidróxidos fenólicos, espectrofotometria U.V., espectrofotometria infravermelho, cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas e os resultados demonstraram a presença de compostos fenólicos, sendo que as características dos espectros de absorção das amostras estudadas na análise com espectrofotômetro U.V. foram similares, correspondente a benzenos substituídos, ou seja, de substâncias aromáticas do tipo compostos fenólicos, sendo uns dos principais compostos com atividade biológica.

1.3.2 Propriedades biológicas da própolis

A própolis possui diversas propriedades terapêuticas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica, anticariogênica, antifúngica, antiprotozoária e antiviral. Algumas outras propriedades biológicas e farmacológicas tem sido investigados, como por exemplo a inibição da reabsorção óssea e regeneração da polpa dental. Também, investigações de componentes isolados, como os flavonóides, tem crescido. Esses compostos são biologicamente mais ativos e são responsáveis pela ação espasmódica (quercetin, kaempferol e pectolinarigenin), anti-inflamatória (acacetin) e atividades antiulcerativas (apigenin) (RAMOS; MIRANDA, 2007).

1.3.2.1 Ação anti-inflamatória

A própolis é um anti-inflamatório de baixo custo atuando nos estágios agudos e crônicos, cujas propriedades são usualmente aplicadas para inflamações musculares e nas articulações, bem como para outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções. Estudos em ratos e coelhos tem mostrado que soluções hidroalcoólicas de própolis possuem atividade anti-inflamatória, seja pela administração tópica, injetável ou mesmo uso oral. Algumas substâncias anti-inflamatórias encontradas na própolis já foram isoladas. Essas substâncias são o ácido cafeico, quercetin, naringenin, e ácido cafeico fenetil éster. Estes componentes contribuem para a supressão da síntese de prostaglandinas e leucotrienos por macrófagos e tem efeito inibitório na atividade das mieloperoxidases, NADPH-oxidase, ornitina decarboxilase e tyrosine-proteína-kinase. Também se atribue a atividade anti-inflamatória da própolis a outros componentes, incluindo ácido salicílico, apigenin, ácido ferulico e galangina (RAMOS; MIRANDA, 2007).

Entre os flavonóides encontrados na própolis, a atividade anti-inflamatória observada parece ser devida principalmente a galangina, que apresenta atividade inibitória contra a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase. Tem sido relatado também que o ácido fenil éster caféico (CAPE), possui atividade anti-inflamatória por inibir a liberação de ácido araquidônico da membrana celular, suprimindo as atividades das enzimas COX-1 e COX-2 (BORRELLI et al., 2002).

1.3.2.2 Ação antimicrobiana

Ota et al. (2001) avaliaram a atividade antifúngica da própolis através de testes de sensibilidade, utilizando 75 espécies de *Candida*: 20 *Candida albicans*, 20 *Candida tropicalis*, 20 *Candida krusei* e 15 *Candida guilliermondii*. As amostras apresentaram atividade antifúngica em ordem decrescente: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*. Afirmaram também, que pacientes portadores de prótese total que utilizaram o extrato hidroalcoólico de própolis apresentaram diminuição na quantidade de *Candida* sp.

Longhini et al. (2007) avaliaram a atividade antifúngica de própolis através da obtenção de extrato sob diferentes condições, testando frente a leveduras isoladas de onicomioses, que são infecções de difícil e longo tratamento e que causam efeitos indesejáveis ao paciente. As amostras de própolis foram coletadas das colmeias de abelhas *Apis mellifera* L., na Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (FEI-UEM). Todos os extratos alcoólicos e os glicólicos apresentaram atividade antifúngica, sendo o extrato etanólico mais eficiente que o extrato glicólico.

Vargas et al. (2004) avaliaram a ação antibacteriana da própolis através da inoculação de placas de Agar BHI contendo 5% de extrato alcoólico de própolis a 50% em solução de álcool etílico 96°GL, com inóculo bacteriano de 1×10^6 células/mL⁻¹. Testaram 161 isolados bacterianos, Gram positivos e Gram negativos, e observaram que os isolados foram sensíveis ao extrato, pois não ocorreu crescimento bacteriano na placa após 72 horas de incubação a 72°C. O extrato alcoólico de própolis a 50% avaliado foi capaz de exercer ação antibacteriana efetiva contra a maioria dos isolados testados, inibindo o crescimento de 67,70% das amostras de *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Rhodococcus equi*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas. As bactérias Gram positivas mostraram-se mais sensíveis (92,6%) ao extrato testado do que as Gram

negativas (42,5%). Dentre as bactérias avaliadas, *Nocardia asteroides* foi a bactéria Gram positiva mais sensível (100%) e *Pseudomonas aeruginosas* a Gram negativa que apresenta maior sensibilidade (72,41%) ao extrato de própolis.

Konishi et al. (2004) avaliaram o efeito dos solventes e dos agentes solubilizantes na preparação dos extratos de própolis e na sua atividade antimicrobiana utilizando diversos solubilizantes e entre eles o Polissorbato 80 a 0,5%. Testaram a atividade antimicrobiana contra micro-organismos frequentemente encontrados na cavidade bucal (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*) e concluíram que todos os solventes utilizados foram eficientes em extrair princípios ativos, principalmente os compostos polares presentes na própolis e que os micro-organismos foram sensíveis a todos os extratos de própolis testados, porém somente o extrato alcoólico foi eficiente frente à *Candida albicans*.

Yaghoubi et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de própolis Iraniano sobre alguns micro-organismos, e observaram que esse extrato apresentou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos Gram positivos e fungos. Porém, nenhuma atividade antimicrobiana foi apresentada em relação aos Gram negativos. Na cromatografia de camada delgada, foi revelada a presença de pinocembrina, ácido caféico, kaempferol, crisina e galangina na própolis Iraniana. O total de flavonoides e fenólicos foram 7,3% e 36%, respectivamente, fato este, que sugere que a forte atividade antimicrobiana da própolis Iraniana ocorre devido aos altos níveis de compostos fenólicos e flavonoides.

Gonzales et al. (2006) avaliaram a atividade antibacteriana e suas concentrações de flavonoides em própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil com amostras dos estados de Goiás, Paraná e São Paulo. Extratos etanólicos a 30% foram preparados, testando sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Ampicilina e tetraciclina foram utilizadas como controle. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de própolis inibiu o crescimento de *S. aureus*, mas não para a *E. coli*. Tetraciclina e Ampicilina mostraram-se

eficazes para ambas as bactérias. A concentração de flavonoides foi variável, de acordo com a amostra de própolis. Os resultados do trabalho mostraram que o extrato etanólico de própolis tem uma efetiva ação contra bactérias Gram positivas, independente da origem geográfica, e uma positiva correlação entre atividade antibacteriana e concentração de flavonoides.

Ishida (2006) avaliou *in vitro* a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis coletadas em apiários do estado do Amazonas sobre culturas de *S. mutans*, *S. mitis* e *S. salivarius*. Análises como reações de identificação para hidróxidos fenólicos, espectrofotometria U.V., espectrofotometria infravermelho, cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas. Os resultados demonstraram a presença de compostos fenólicos e os extratos etanólicos testados apresentaram atividade antibacteriana frente ao *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. mitis*. As características dos espectros de absorção das amostras estudadas na análise com espectrofotômetro U.V. foram similares, correspondente a benzenos substituídos, ou seja, de substâncias aromáticas do tipo compostos fenólicos, sendo uns dos principais compostos com atividade biológica.

Almeida et al. (2006) avaliaram uma solução antisséptica à base de extrato de própolis sobre os índices clínicos e contagem de *S. mutans*. Confeccionaram uma solução para bochecho à base de própolis (6,25%) a partir da concentração inibitória mínima, sendo considerada a solução teste, e compararam-na ao controle positivo (clorexidina, 0,12%). Através de um ensaio clínico cruzado, quinze crianças utilizaram a solução teste durante 15 dias consecutivos, em intervalos de 21 dias e realizaram bochechos com clorexidina. Foram coletados os índices para acúmulo de biofilme oral e doença gengival antes e 24 horas após o uso das soluções. Realizou-se a contagem de *S. mutans* de amostras da saliva nos seguintes períodos: antes e 24 horas, 07 dias, 15 dias e 21 dias depois do final de ambos os bochechos. Os resultados indicaram que a solução de própolis apresentou satisfatória atividade

antimicrobiana semelhante à ação da clorexidina a 0,12%, atuando na presença de biofilme oral e doença gengival.

1.3.2.3 Ação contra os Periodontopatógenos

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis contra bactérias periodontopatogênicas foi investigada através de testes *in vitro*. As cepas bacterianas testadas foram: *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada usando-se o método de diluição do extrato de própolis no meio de cultura em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram CIM de 1 µg/mL para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Capnocytophaga gingivalis*; e 0,25 µg/mL para *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Alguns microrganismos que desempenham *in vivo* papel de superinfectantes também foram testados: a susceptibilidade de *Candida albicans* ao extrato etanólico de própolis foi observada na concentração de 12 µg/mL. A CIM para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (tipo selvagem) foi de 14 µg/mL. Todos os patógenos periodontais e microrganismos superinfectantes testados foram sensíveis ao extrato de própolis testado (GEBARA et al., 2002).

Em estudo *in vitro* desenvolvido por Sperança et al. (2007), foram avaliadas a atividade antimicrobianas de soluções à base de própolis sobre microbiota oriunda de bolsas periodontais através do teste de difusão em culturas mistas em condição de anaerobiose facultativa e microaerofilia. Os resultados permitiram observar que o extrato alcoólico em todas as concentrações testadas (30%, 20%, 10% e 5%) inibiu o crescimento bacteriano.

1.3.3 Uso da própolis na Odontologia/Periodontia

As propriedades terapêuticas da própolis na odontologia especificamente na periodontia tem sido foco de investigações, neste sentido Prokopovich (1957) avaliou a utilização de uma solução a 0,01% de própolis como anestésico superficial e verificou ser 4 vezes tão efetiva quanto à procaína. Foi concluído que o extrato de própolis é essencialmente um anestésico de superfície, com insignificante poder penetrante e podendo ser recomendado para uso em procedimentos estomatológicos.

Foi relatado por Magra Filho; Perri de Carvalho (1990) após estudo com 45 ratos para examinar histologicamente os efeitos da própolis em feridas cirúrgicas após extrações dentárias (alvéolo) e feridas de pele (uso local), utilizando solução hidroalcoólica a 10% de própolis e solução hidroalcoólica pura, aplicados no alvéolo imediatamente após a extração e sobre a ferida, diariamente, até o período de sacrifício dos animais. Concluíram que a aplicação de solução hidroalcoólica de própolis acelerou a epitelização de feridas de pele, entretanto não acelerou a cicatrização após extração dentária.

Ikeno et al. (1991) demonstraram em ratos a eficácia da própolis na inibição do crescimento da microbiota cariogênica, especificamente os *S. mutans*., os quais estão fortemente associados com o início do processo da cárie dentária. Ratos inoculados com os *S. mutans* apresentaram 50% das fissuras cariadas nos dentes. Nos ratos submetidos ao uso da própolis as cáries de fissuras nos dentes, foram significativamente menor ($p=0,01$) . Este mesmo estudo utilizou a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e a análise indicou que os compostos presentes, ácido cafeico e ácido cinâmico, estariam supostamente relacionados com a atividade antiestreptococos do grupo *mutans*, e conseqüentemente, com a atividade anticariogênica da própolis.

Extratos hidroalcoólicos de própolis de várias regiões do Brasil (MG, SP, MS, PR,

RS) e compostos isolados apresentaram a capacidade de inibir a atividade da glicosiltransferase, do crescimento de *S. mutans* e da formação e aderência de placa dentária (PARK et al. 1998).

Martinez Silveira et al. (1988) compararam o efeito de Propolan (50% de própolis, propilenoglicol em álcool 95%) e álcool 95% (placebo) em gengivites crônicas e em úlceras bucais recorrentes e inespecíficas. Quarenta pacientes foram divididos em 2 grupos, 20 pacientes com gengivite crônica (grupo A) e 20 pacientes com úlceras bucais com evolução de 24 a 48 horas (grupo B), ambos os grupos foram orientados em relação ao correto controle de placa. No grupo A cada paciente recebeu aplicações da solução de Propolan e placebo, 3 vezes por semana durante 1 mês. No grupo B, o mesmo paciente recebeu aplicação de Propolan e placebo de acordo com a área experimental ou controle. Os pacientes regressavam 24 horas após para nova aplicação, e em alguns casos para uma nova aplicação em 48 horas se as dores persistissem. Comparando a situação inicial e após 30 dias, houve uma melhora significativa no grupo que utilizou Propolan, comparado com o grupo controle. Em relação ao grupo B, as aftas apresentavam diminuição na sintomatologia dolorosa em 48 horas no grupo experimental, enquanto no lado controle, demoravam de 4 a 6 dias para regredirem. A zona tratada com Propolan apresentava uma avançada recuperação em relação às tratadas com placebo. As conclusões revelaram que os efeitos do Propolan sobre os germes Gram positivos da placa supragengival levaram a uma recuperação mais rápida e melhor dos tecidos gengivais. Os efeitos antimicrobianos, cicatrizantes, anestésicos e de incremento da resposta imune local do Propolan parecem favorecer uma regressão mais rápida dos sintomas dolorosos, assim como um melhor efeito curativo das úlceras bucais, comparado com o controle.

Em outro estudo de Martinez Silveira et al. (1992) foi avaliada a ação antisséptica de uma solução hidroalcoólica de própolis a 1,5%. Este estudo *in vivo*, foi realizado em um

grupo de 20 estudantes de 16 anos de idade com gengivite. Foram divididos em 2 grupos e aplicados o índice de higiene bucal e gengival, um grupo utilizou a solução proposta (grupo A), o outro (grupo B) uma solução placebo (sem própolis), os grupos utilizaram a solução 1 vez por dia durante 3 minutos. Após 15 dias verificou-se que a gengivite crônica regrediu quase a normalidade em 80% dos casos do grupo A. De forma menos acentuada, foram observadas melhoras no grupo B, em 80% dos casos nas categorias moderadas e grave. Os autores concluíram que houve uma melhora satisfatória do estado gengival dos estudantes que utilizavam solução hidroalcoólica de própolis a 1,5%. O nível de redução de placa foi adequado em ambos os grupos, porém mais evidente no grupo A e também não foi detectado a presença de irritação bucal.

Garcia; Garguera (1993) estudaram os efeitos da Própolis em aftas bucais, utilizando própolis em solução alcoólica a 70%. Foram avaliados 40 pacientes, dos quais 75% obtiveram cura após a primeira aplicação, 7 pacientes necessitaram de uma segunda aplicação e 3 pacientes de uma terceira aplicação. A sintomatologia dolorosa diminuía significativamente já após a primeira aplicação.

Estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados por Bruschi et al. (2005) para avaliarem a ação antimicrobiana da própolis sobre os periodontopatógenos e organismos oportunistas. Os resultados confirmaram a ação da própolis sobre todos os organismos testados. Estudos *in vivo* revelaram que a própolis aplicada através de procedimentos de irrigação da bolsa periodontal, mostrou-se efetiva na diminuição do total de bactérias viáveis, dos níveis de *P. gingivalis* e dos sítios ativos para leveduras, não levando à seleção de organismos oportunistas. Ocorreu também uma diminuição da profundidade de sondagem após seis meses dos procedimentos de irrigação. Na sequência, foi investigada a ação de um extrato etanólico de própolis como adjuvante no tratamento periodontal em vinte pacientes adultos com periodontite. Estes receberam orientação de higiene oral e foram escolhidos em cada um três

dentes não adjacentes com profundidade de bolsa de 5mm. Um dos dentes foi irrigado com solução etanólica de extrato de própolis, outro recebeu irrigação com placebo (etanol) e o terceiro dente não recebeu nenhum tratamento adicional. Foram coletados dados microbiológicos e clínicos no início e depois de 4, 6 e 24 semanas de tratamento. Ocorreu uma diminuição no total de bactérias viáveis e aumentou a proporção de sítios com *P. Gingivalis*, em quatro semanas e se manteve pelas 24 semanas. A proporção de sítios com presença detectável de fungos diminuiu com o tratamento com extrato de própolis na quarta e sexta semana. O uso de própolis não selecionou organismos oportunista tais como *Estafilococos* coagulase positiva e *Pseudomonas sp.* Concluíram assim que o extrato de própolis foi efetivo, *in vivo*, no tratamento periodontal (GEBARA, 2001 apud BRUSCHI et al., 2005).

A atividade antimicrobiana e a suscetibilidade de diversos microrganismos orais (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii* *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) foi avaliada em estudo *in vitro* utilizando o método de difusão em culturas de Agar com diferentes concentrações de própolis (5%, 10%, 15% e 20%). Todas as espécies bacterianas e fúngicas foram susceptíveis à própolis com concentração inibitória mínima (CIM) de 1,75 a 14,0 µg/mL (GOMES, et al., 2007).

Toker et al. (2008) avaliaram o efeito da utilização da própolis administrado sistemicamente na perda óssea alveolar em periodontite experimental induzida por ligaduras em 40 ratos *wistar* divididos em quatro grupos experimentais. Grupo I (10 ratos sem ligadura), Grupo II (10 ratos apenas com ligaduras), Grupo III (10 ratos com ligaduras e administração sistêmica de própolis com dose de 100 mg/kg) e Grupo IV (10 ratos com ligadura e administração sistêmica de 200 mg/Kg). O período experimental teve a duração de 11 dias com o sacrifício ao final desse período. Os grupos que receberam a administração da

própolis tiveram menor perda óssea, mas não houve diferença significativa entre as doses de própolis administradas. Os achados desse estudo mostraram evidências morfológicas e histológicas que a própolis, quando administrada sistemicamente, previne a perda óssea alveolar em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar morfológicamente a resposta da doença periodontal inflamatória induzida no tecido periodontal de ratos após a utilização de suspensões aquosas de própolis.

2.1 Específicos

- Obter suspensões aquosas de própolis nas concentrações de 0,1%, 1% e 10%;
- Induzir a doença periodontal em molares de ratos;
- Comparar a resposta tecidual nos períodos de 15 e 30 dias após o tratamento com as suspensões de própolis para irrigação subgengival.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo de Estudo

Para avaliar a resposta inflamatória do tecido periodontal de ratos frente à utilização de suspensões aquosas de própolis como solução de irrigação subgengival em lesões periodontais induzidas em dentes de ratos, optou-se por um estudo experimental *in vivo*, cego, com delineamento do tipo relação estímulo-efeito.

3.2 Locais da Pesquisa

A pesquisa foi realizada em Manaus, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM), no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), no Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML/UFAM) e no Laboratório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO/UFAM).

3.3 Considerações éticas

A pesquisa seguiu os princípios éticos para uso de animais de laboratório conforme preconizado pelo SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório) e efetuado cadastro no Comitê de Ética e Pesquisa em Animais (Nº do processo: 23105.021549/2009) da Universidade Federal do Amazonas (Apêndice E).

3.4 Benefícios

A produção de uma suspensão à base de própolis para utilização como agente de irrigação subgingival poderá viabilizar sua utilização nos procedimentos periodontais como agente de uso local coadjuvante ao tratamento periodontal tradicional. Além disso, poderá proporcionar a comprovação da eficácia de um produto da biodiversidade Amazônica e a viabilidade de sua introdução na Odontologia.

3.5 Coleta das amostras de própolis da *Apis mellifera*

As amostras de própolis foram coletadas no município de Presidente Figueiredo, no Estado do Amazonas (Latitude 2,0378° S, Longitude 60,0205° O). A coleta foi através de raspagem com o auxílio de espátula nas partes internas e bordas da melgueira, ninho e tampa das colméias. O material coletado (figura 1A) foi separado dos resíduos de madeira e excessos de cera e acondicionado em caixas metálicas com tampa, esterilizadas, identificadas e transportadas ao laboratório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas para preparação das suspensões.

3.6 Tratamento das amostras de própolis *In Natura*

Posteriormente à coleta, as amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro fechado com lâmina de papel alumínio perfurada para saída de umidade e colocadas em um dessecador com sílica gel, permanecendo por 14 dias em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram trituradas e homogeneizadas com auxílio de um pilão e cadinho (figura 1B).

3.7 Obtenção do extrato etanólico de própolis

Para a obtenção do extrato etanólico de própolis, 2,0 gramas de própolis triturado foram depositado em tubos de ensaio (25mm X 180mm). Em seguida, foi pipetado 25 mL de álcool etílico a 80%. A extração do extrato foi realizada em banho de água termostatizada (Dubnoff modelo 145-FANEM-São Paulo/Brasil) a 70°C durante 30 minutos, sob agitação constante (figura 2A).

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 26 minutos a 5°C (Sigma Laborzentrifugen, 2K15, Alemanha, 2000). O sobrenadante obtido, denominado extrato etanólico de própolis (EEP) (Figura 2B) foi acondicionado em frascos de vidro âmbar previamente lavados, desinfetados e esterilizados. O extrato foi envasilhado e lacrado em condição asséptica, seguindo o criterioso protocolo de controle de qualidade para evitar contaminação.

3.8 Obtenção das Suspensões de Própolis a 0,1%, 1% e 10%.

Inicialmente foi realizada a remoção do álcool do EEP, onde cada tubo de ensaio contendo 5mL de EEP foi centrífugado à vácuo (Centrivap Concentrator, Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, 2000) por 4 horas a temperatura de aproximadamente 35°C (Figuras 3).

Após a remoção do álcool a “Pasta de Própolis” foi transferida para um béquer de 10mL (figura 4A) com auxílio de uma espátula nº 24 e levado ao dissecador por 48 horas.

A “Pasta de Própolis” foi pesada com o auxílio de uma balança analítica (Electronic Balance FA-2104N, Bioprecis, TDS Instrumental Tecnológica LTDA, Tijucas do Sul, PR, 2005) e depositado nos béqueres 5mg, 50mg e 500mg respectivamente. Em seguida foram adicionados nos béqueres 250µL de Tween 80, e com auxílio de um bastão de vidro em uma

cuba ultrassônica (UltraCleaner USC-1400, Unique Ind. e Com. Prod. Eletr. LTDA, Brasil), foi realizado a dissolução inicial com Tween 80 e gradativamente incorporada água destilada até completar um volume total de 5,0mL para cada concentração (Figura 4B, 4C e 4D).

As suspensões foram armazenadas em frascos âmbar previamente esterilizados. Foi preparada uma solução aquosa de Tween 80 a 5% (T80 a 5%) para obtenção da solução controle (Grupo IV) (figura 5).



Figura 1- A. Própolis coletada. B. Pilão e cadinho de porcelana utilizado na trituração da própolis.

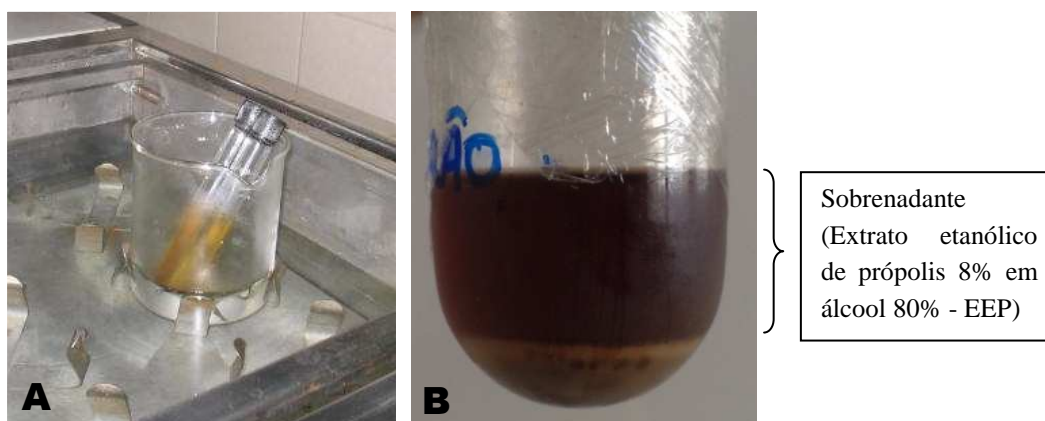


Figura 2 – A. Amostra sob agitação em banho de água termostatizada. B. Sobrenadante – EEP.

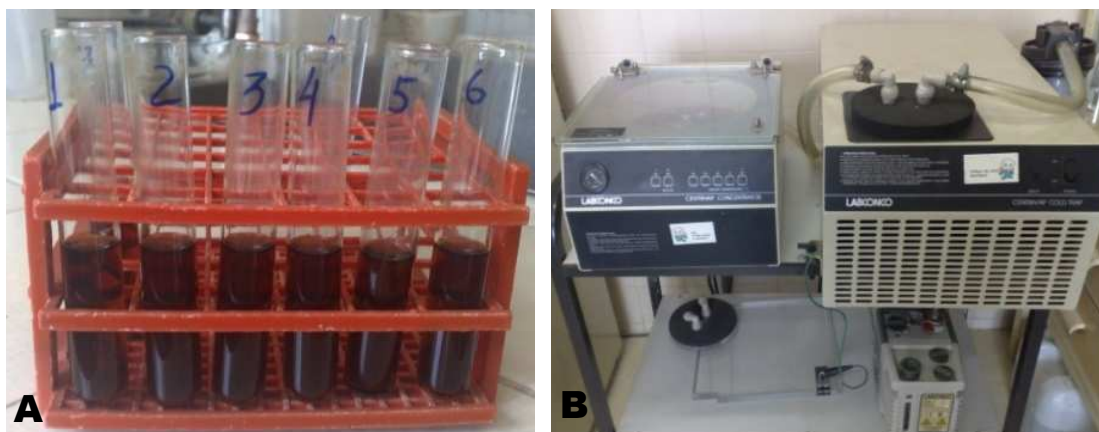


Figura 3 - A. Tubos de ensaio com 5mL de EEP. B. Centrivap Concentrator da Labconco

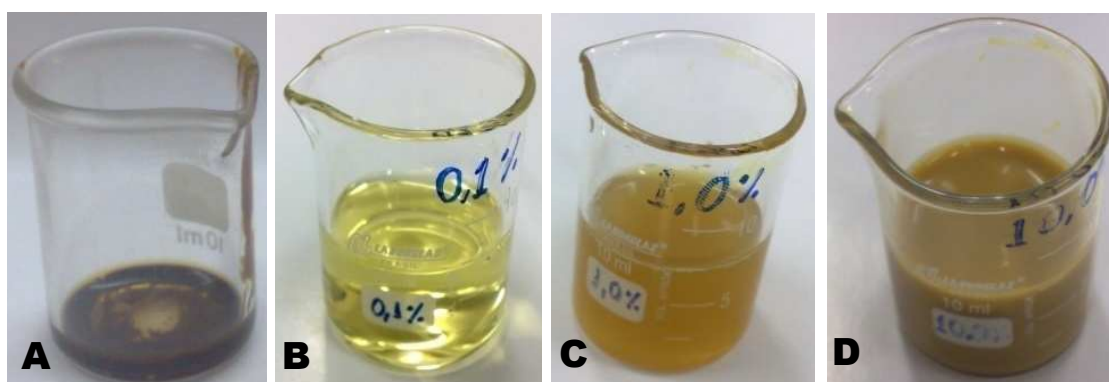


Figura 4 – A. Béquer com “Pasta de Própolis”. B. SAP a 0,1%, C. SAP a 1,0% e D. SAP a 10,0%.



Figura 5 - SAP a 0,1% (I), SAP a 1% (II), SAP a 10% (III) e T80 a 5% (IV).

3.9 Avaliações histopatológicas das Suspensões de Própolis na doença periodontal

3.9.1. Os animais

Foram utilizados 84 ratos *Wistar*, albinos, machos, com peso entre 210 e 290 gramas, com 8 semanas de idade, mantidos no biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), alimentados com ração balanceada e água *ad libitum* organizados em grupos experimentais conforme quadro 1.

Grupos	Quantidade	Substância Irrigadora subgingival
Grupo I	14 ratos	Suspensão aquosa de própolis a 0,1%
Grupo II	14 ratos	Suspensão aquosa de própolis a 1,0%
Grupo III	14 ratos	Suspensão aquosa de própolis a 10,0%
Grupo IV	14 ratos	Tween 80 à 5%
Grupo V	14 ratos	Controle positivo: induzido e sem tratamento
Grupo VI	84 ratos	Controle negativo: sem indução e sem tratamento (lado contralateral nos grupos I, II, III, IV, V e VII)
Grupo VII	14 ratos	Clorexidina à 2,0%

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais.

3.9.2. Indução de Doença Periodontal inflamatória

Foi utilizado um relaxante muscular (Rompum[®]; Cloridrato de xilasina à 2%, 0,01mL/100mg, Bayer do Brasil S/A, Santo Amaro, SP) e um anestésico geral à base de Cetamina (Cetamim[®], Cloridrato de Cetamina 10%, 0,15mL/100mg, Syntec do Brasil, Cotia, SP) por meio de injeção intramuscular. Após a anestesia, os animais foram mantidos na mesa de Doku modificada (DOKU et al., 1966).

Na indução da doença periodontal inflamatória foi realizada a técnica da ligadura utilizando um fio de algodão (Corrente Algodão nº10; Coats Corrente, SP, Brasil) colocado na região cervical do primeiro molar inferior esquerdo, tomando-se o cuidado para penetrar o fio no sulco gengival, em íntimo contato com os tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial (figura 6A), facilitando dessa forma o acúmulo de biofilme bacteriano (figura 6B) (JONHSON, 1975). O fio permaneceu durante 15 dias na região gengival para que houvesse a instalação de processo inflamatório com destruição óssea.

3.9.3 Tratamento da Doença Periodontal

Nos grupos I, II, III, IV e VII, decorrido o período de indução da DP (15 dias), foi realizada a remoção do fio de algodão e a desorganização do biofilme supragengival utilizando pinceis tipo microbrush extrafinos, e em seguida receberam a irrigação de 0,15mL das substâncias testes de acordo com os grupos experimentais com auxílio de seringas de insulina descartáveis de 0,50mL. As irrigações foram realizadas nos 1º, 4º e 7º dias após o período de indução de doença (figuras 7A).

Os animais do grupo V (controle positivo) ao final do período de indução da doença foram anestesiados, as ligaduras retiradas e não receberam tratamento.

Após o período de tratamento, os animais foram redistribuídos, conforme o quadro 2 abaixo, em grupos a e b, com 7 ratos cada para aguardar pelo período de sacrifício de 15 e 30 dias, respectivamente.

Grupos Iniciais	Subdivisão dos grupos	Período de espera para o sacrifício
Grupo I	Grupo Ia	15 dias após tratamento
	Grupo Ib	30 dias após tratamento
Grupo II	Grupo Iia	15 dias após tratamento
	Grupo Iib	30 dias após tratamento
Grupo III	Grupo IIIa	15 dias após tratamento
	Grupo IIIb	30 dias após tratamento
Grupo IV	Grupo Iva	15 dias após tratamento
	Grupo Ivb	30 dias após tratamento
Grupo V	Grupo Va	15 dias após período de indução
	Grupo Vb	30 dias após período de indução
Grupo VII	Grupo VIIa	15 dias após tratamento
	Grupo VIIb	30 dias após tratamento
Grupo VI	Grupo Via	Sem indução e sem tratamento correspondendo ao dente contralateral dos grupos I,II, III, IV e V
	Grupo Vib	

Quadro 2 - Redistribuição dos grupos experimentais com vista ao sacrifício

3.9.4 Sacrifício dos animais

Decorridos os períodos experimentais foram realizadas as biópsias e os animais foram sacrificados com sobredose anestésica. As hemimandíbulas contendo as regiões das furcas dos primeiros molares foram removidas bilateralmente em cada animal (Figura 7B).

3.9.5 Preparo histotécnico

Para descalcificação das peças foi utilizado durante um período de 5 a 6 dias a Solução de Morse (50% de solução de citrato de sódio à 20% e 50% de ácido fórmico a 100%). Por volta do 3º e 4º dia as peças foram testadas para verificar o quanto já haviam sido descalcificadas, através da introdução de uma agulha, onde a mesma deveria atravessar o

tecido ósseo sem resistência. Quando as peças atingiram um bom estado de desmineralização, o que ocorria por volta do 4º dia, as mesmas poderiam ser clivadas, conforme descrito no apêndice B.

As peças foram recolocadas em seus cassetes previamente numerados e retornaram para a Solução de Morse para aguardar o fim do período de 5 a 6 dias. Após esse período foram lavadas em água corrente por 24 horas para remoção completa da solução de Morse e posteriormente colocadas em uma solução neutralizante de Sulfato de Sódio à 5% por mais 24 horas.

Após o período de descalcificação e neutralização as peças foram marcadas com tinta nanquim em sua porção lingual para auxiliar posteriormente durante a fase de inclusão.

As peças foram levadas ao Processador automático de tecidos (Lupe PT2000, Lupe Ind. e Com. LTDA, São Paulo, SP, Brasil) para completar o processamento histotécnico onde passaram pelas fases de desidratação (1 hora em álcool 70%, 1 hora em álcool 80%, 1 hora em álcool 90% e 1 hora em álcool 100%), diafanização (3 banhos de 1 hora em xilol) e parafinização (2 banhos de 1 hora em parafina).

Através da utilização de moldes metálicos pré-fabricados, e seguindo a orientação da marcação realizada em cada peça com a tinta nanquim, todas as peças foram incluídas seguindo um padrão de disposição no molde para posterior padronização dos cortes. A marca em tinta nanquim direcionava a face lingual da peça que deveria permanecer voltada para cima no momento da inclusão (figura 7C).

Foi escolhida a orientação de corte méso-distal para a delimitação da região de furca dos primeiros molares inferiores e devido ao preparo prévio das peças, foram realizadas 5 lâminas para cada peça com cortes seriados de 5µm de espessura utilizando o Micrótomo rotativo Lupe MRP-03 (Lupe Ind. e Com. Epp., São Paulo, SP, Brasil).

Todas as lâminas foram examinadas antes de serem coradas utilizando o microscópio Olympus BX41 (BX41TF, Olympus Optical Co. LTDA., Japão) em aumento de 40x. As lâminas que não continham a região de interesse eram descartadas e as lâminas de interesse foram numeradas e encaminhadas para o processo de coloração de hematoxilina e eosina. Cada lâmina corada continha uma média de 8 cortes da área de interesse e foram coradas uma média de 3 lâminas para cada peça a ser analisada.

Considerando que o 1º molar inferior possui 5 raízes, duas maiores e mais amplas (mesial e distal), uma raiz menor central por vestibular e duas menores centrais por lingual, a área de interesse para avaliação consistia na porção central do 1º molar inferior, ou seja, quando no corte obtínhamos a imagem com as raízes mesial e distal, sem as raízes centrais (vestibular e lingual) e mostrando a região de furca maior entre as raízes mesial e distal (figura 10).

3.9.6 Análise histopatológica morfológica

A análise morfológica foi descritiva e incluiu parâmetros microscópicos quanto a junção dentogengival, tecido conjuntivo subjacente, ligamento periodontal e tecido ósseo conforme parâmetros e escores descritos a seguir:

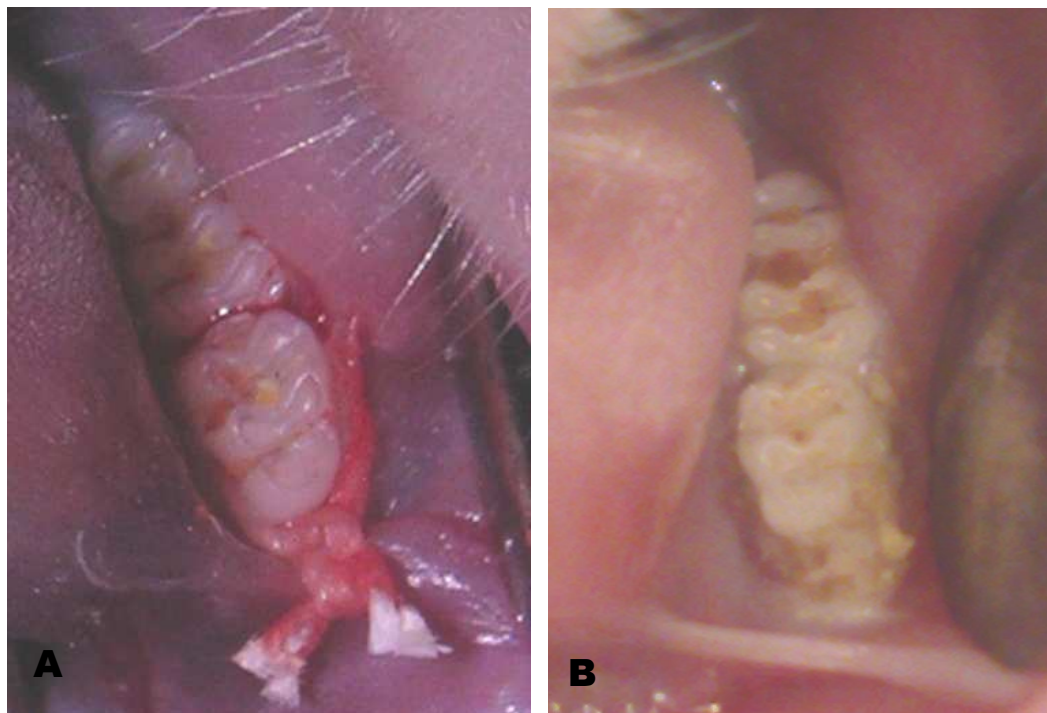


Figura 6 – A. Fio instalado com nó na mesial. B. 1º molar inferior esquerdo com ligadura e biofilme acumulado.

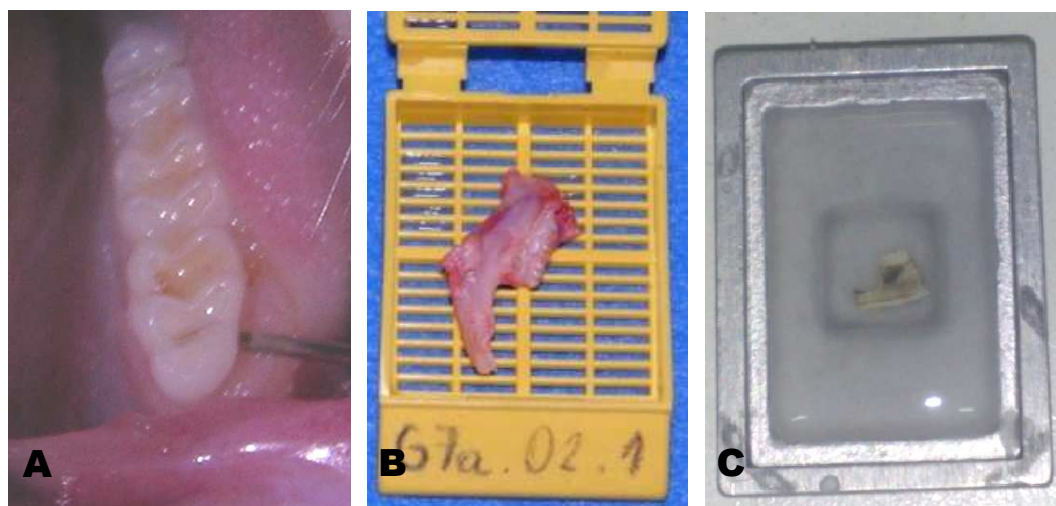


Figura 7 – A. Irrigação subgingival. B. Peça preparada e acondicionada em cassete. C. Peça marcada com tinta nanquim sendo incluída em parafina em molde metálico.

3.9.6.1 Junção dentogengival

A junção dentogengival, representada pelos epitélios gengival, sulcular e juncional (figura 8 e 9) foi avaliada a partir de critérios qualitativos, com base nos seguintes parâmetros modificados de Rodini (2005):

- H - Hiperplasia epitelial: aumento do número de células da camada espinhosa do epitélio;
- A - Atrofia: diminuição do número de células da camada espinhosa com diminuição da espessura do epitélio;
- E - Exocitose: presença de células inflamatórias no tecido epitelial;
- Q - Hiperparaqueratose: espessamento da camada de paraqueratina na superfície epitelial.

Observação: será também avaliado o epitélio de bolsa periodontal quando presente nas regiões mesial e distal (substituindo o epitélio juncional) e quando presente na região de furca, seguindo os mesmos parâmetros acima descritos.

3.9.6.2 Tecido conjuntivo

O tecido conjuntivo subjacente, representado pelo ligamento gengival foi avaliado quanto à intensidade das fibras, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório de acordo com os parâmetros e escores propostos:

A qualidade das fibras gengivais foi avaliada nas porções de tecido conjuntivo acima da crista óssea, em aumento de 200x, classificadas de forma semelhante ao trabalho de Schmitd (2005) em:

- E - Esparsas: fibras colágenas soltas com aspecto mixoide, com visualização de fibroblastos (figura 12A);
- M - Moderadas: fibras colágenas hialinas ligeiramente soltas com visualização de fibroblastos (figura 12B);
- D - Densas: fibras colágenas hialinas mais compactas com visualização menos evidente de fibroblastos (figura 12C).

O grau de resposta inflamatória foi analisado com aumento de 200x para as três regiões (mesial, distal e furca), bem como também no ligamento periodontal, de forma semelhante ao trabalho de Schmitd (2005) e alguns parâmetros do trabalho de Rodini (2005), este último com modificações para análise qualitativa, conforme os parâmetros a seguir:

- 0 - ausência de infiltrado inflamatório (figura 13A);
- 1 - Infiltrado inflamatório leve: células inflamatórias em pequena quantidade geralmente restritas a região subepitelial (figura 13B);
- 2 - Infiltrado inflamatório moderado: quantidade moderada de células inflamatórias geralmente espalhadas pelo tecido conjuntivo acima da crista óssea (região mesial e distal), acima do tecido ósseo (região de furca), e no espaço do ligamento periodontal (figura 13C);
- 3 - Infiltrado inflamatório intenso: grande quantidade de células inflamatórias geralmente espalhadas pelo tecido conjuntivo acima da crista óssea (região mesial e distal), acima do tecido ósseo (região de furca), e no espaço do ligamento periodontal (figura 14 e 15).

A qualidade do infiltrado inflamatório foi avaliada em aumento de 400x e considerando se o infiltrado inflamatório apresentava-se agudo (predominando polimorfonucleares neutrófilos), misto (equilibrada quantidade de polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares linfócitos e/ou plasmócitos) e crônico (predominando mononucleares linfócitos e/ou plasmócitos) (figuras 13-15).

Quanto à distribuição o infiltrado inflamatório foi classificado em: focal (quando as células se encontravam agrupadas) ou difuso (quando as células se encontravam espalhadas por toda a região analisada). Este parâmetro foi avaliado de maneira independente da intensidade do infiltrado inflamatório.

Em relação aos vasos sanguíneos, foi avaliada a presença de congestão (figuras 12-15).

3.9.6.3 Ligamento periodontal

Na região do ligamento periodontal foi avaliada a presença de restos epiteliais de Malassez e reabsorções dentinárias além dos critérios de inflamação já citados (figura 17).

3.9.6.4 Tecido ósseo

O cortes foram avaliados em aumento de 40x, de modo qualitativo, dividindo a raiz em 3 terços (cervical, médio e apical), com o tamanho total da raiz indo da junção-cemento-esmalte (figura 8 e 9) e/ou teto da câmara pulpar ao ápice. Essa avaliação foi realizada nas seguintes regiões do dente: crista óssea mesial, crista óssea distal e osso da região de furca, de forma semelhante ao trabalho de Schimtd (2005) com algumas modificações.

Para as regiões mesial e distal foi proposto a classificação do nível da crista óssea em quatro parâmetros:

- C - Região do terço cervical - perda óssea leve, com o trabeculado ósseo visível dentro dos limites do terço superior da raiz (figura 16B, 16C e 16E);

- M - Região do terço médio - perda óssea moderada, com o trabeculado ósseo visível dentro dos limites do terço médio da raiz (figura 16D);
- A - Região do terço apical - perda óssea severa, com o trabeculado ósseo visível dentro dos limites do terço apical da raiz (figura 16E e 16G);
- T - Perda óssea total – total ausência de tecido ósseo ao redor ou entre as raízes (figura 16F e 16H).

Para a região da furca além das possibilidades acima descritas ainda podemos considerar o dente com ausência de perda óssea:

- SP - Ausência de perda óssea - com o trabeculado ósseo presente nas proximidades do teto da câmara pulpar (figura 16A).

Em casos de perdas angulares (ou verticais) a classificação considerava o nível mais inferior (figura 16F e 16G). Foi ainda verificada a presença ou ausência de sequestro ósseo e osteoclastos (figura 17 e 18).

3.9.6.5 Biofilme

A presença de biofilme foi classificada histologicamente, no aumento de 100x, em:

- 0 - ausência de biofilme aderido a superfície dentária;
- 1 - presença de pouco biofilme aderido a superfície mesial ou distal com espessura semelhante a espessura do cimento radicular (figura 11A);
- 2 - presença moderada de biofilme aderido as superfície dentária mesial e distal ou com espessura maior que a espessura do cimento radicular (figura 11B);
- 3 - presença intensa de biofilme aderido as superfícies mesial e distal e ainda na região de furca (figura 11C).

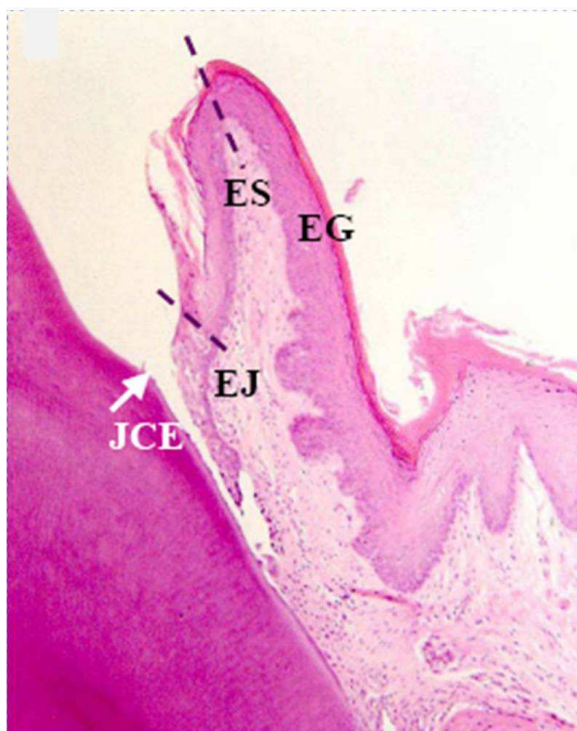


Figura 8 – Junção dentogengival mostrando os limites entre o Epitélio gengival (EG), Epitélio sulcular (ES), Epitélio juncional (EJ) e Junção-cemento-esmalte (JCE) (H.E. 250x).

Fonte: RODINI (2005).

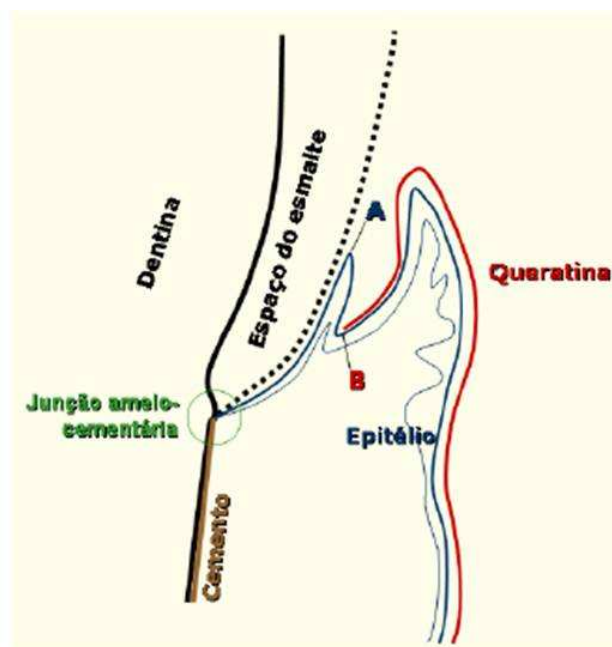


Figura 9 – Diagrama da relação entre gengiva e junção amelo-cementária na mesial do 1º molar inferior do rato (adaptado de Johnson, 1975).

Fonte: SCHMIDT (2005).



Figura 10 - Padrão de corte mostrando área de furca (F), raiz mesial (RM), raiz distal (RD), gengiva mesial (GM) e gengiva distal (GD) (H.E. 40x).

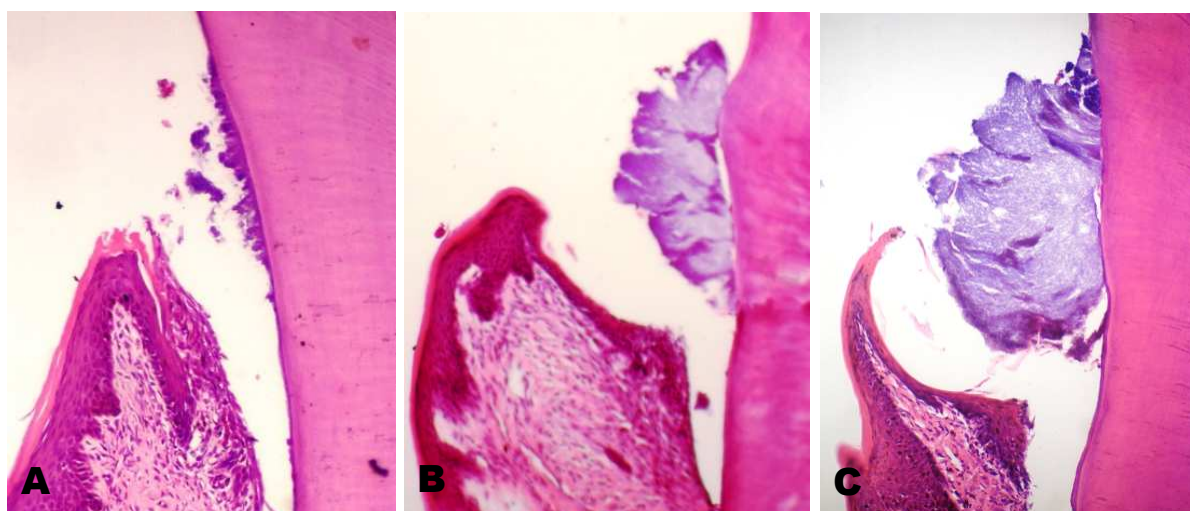


Figura 11 – A. Região mesial em exemplar do grupo I e 15 dias com biofilme leve. B. Biofilme moderado em dente do grupo II e 30 dias C. Biofilme intenso em dente do grupo IV com 30 dias (H.E. 100x).

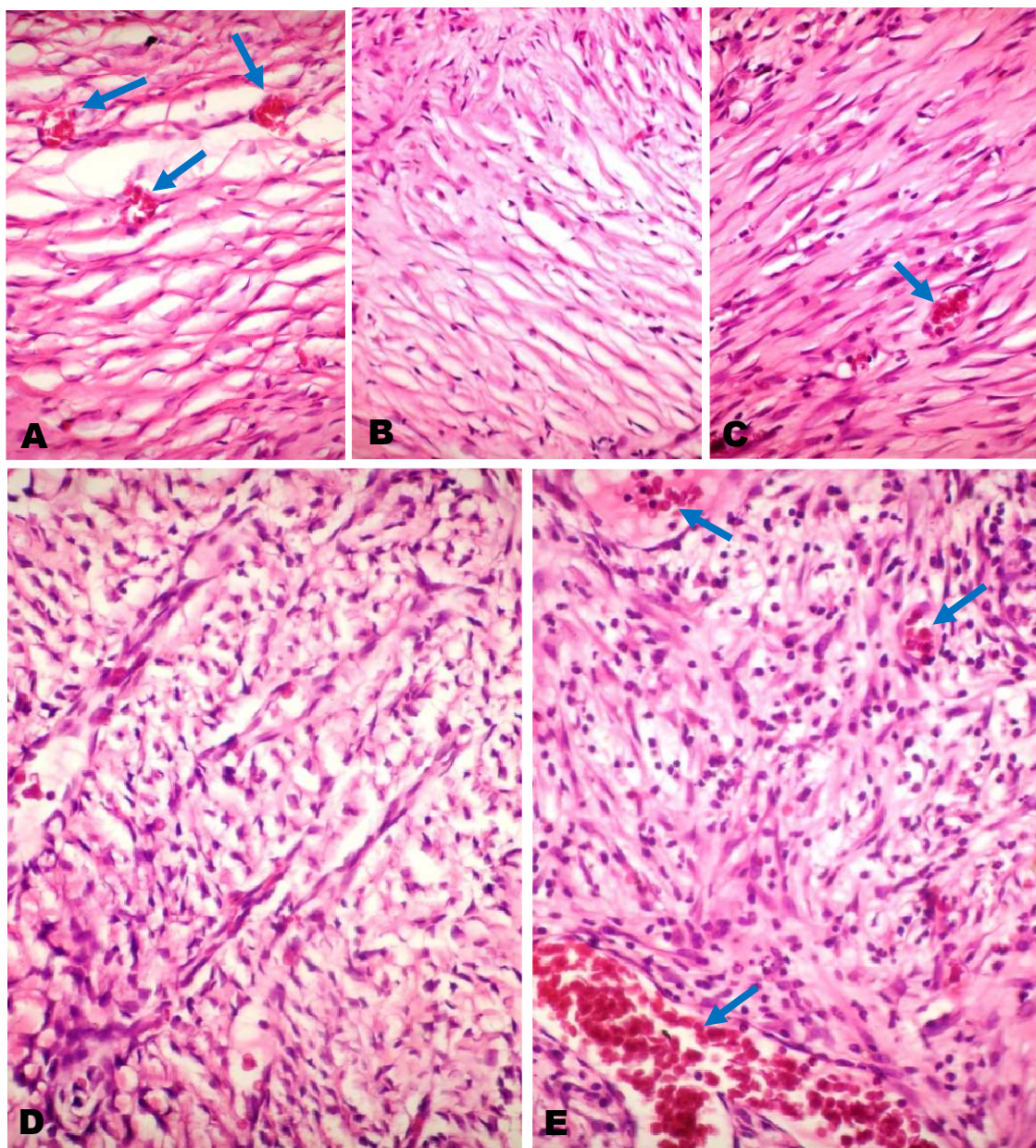


Figura 12 – A. Fibras gengivais esparsas e vasos congestos (seta) na região de furca de um dente do grupo IV e 15 dias (H.E. 200x). B. Fibras gengivais moderadas na região de furca de um dente do grupo III e 15 dias (H.E. 200x). C. Fibras gengivais densas e vasos congestos (seta) na mesial de um dente do grupo II e 15 dias(H.E. 200x). D. Região de fibras gengivais esparsas e infiltrado inflamatório moderado (H.E. 400x). E. Fibras gengivais esparsas na região de furca em dente do grupo IV e 15 dias com infiltrado inflamatório mononuclear e vasos congestos (seta) (H.E. 400x).

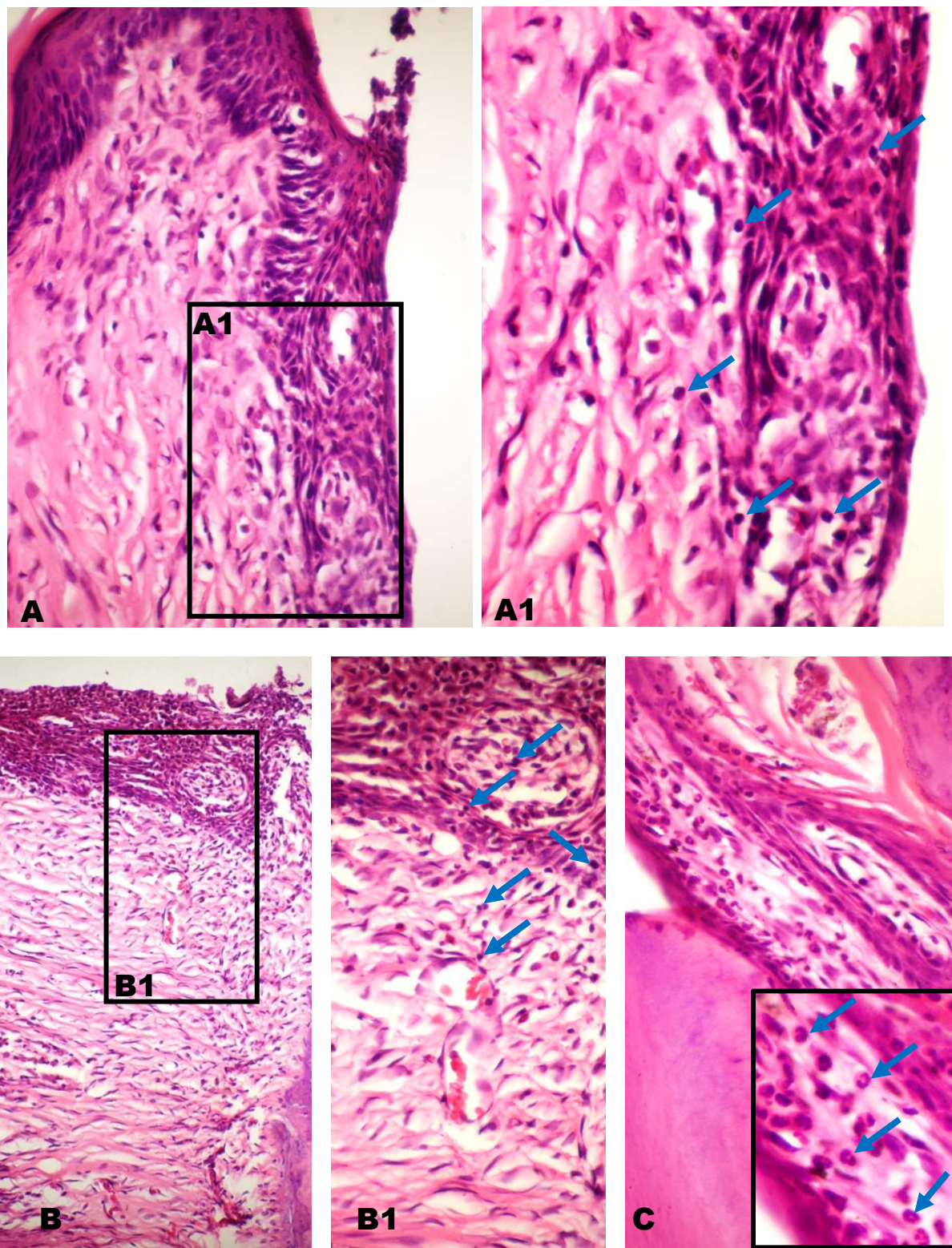


Figura 13 – A. Região mesial com infiltrado inflamatório leve em dente do grupo I e 15 dias (H.E. 200x). A1. Retângulo de A em maior aumento mostrando região do epitélio juncional com exocitose de células inflamatórias mononucleares e inflamação leve no tecido conjuntivo (setas) (H.E. 400x). B. Região de furca com infiltrado inflamatório moderado em dente do grupo VII e 30 dias (H.E. 200x). B1. Retângulo de B em maior aumento mostrando região do epitélio de bolsa com exocitose de células inflamatórias mononucleares (setas), fibras moderadas, vasos congestionados (H.E. 400x). C. Região interproximal em dente do grupo I mostrando infiltrado inflamatório moderado polimorfonuclear (H.E. 400x), com inserto evidenciando neutrófilos (H.E. 1000x).

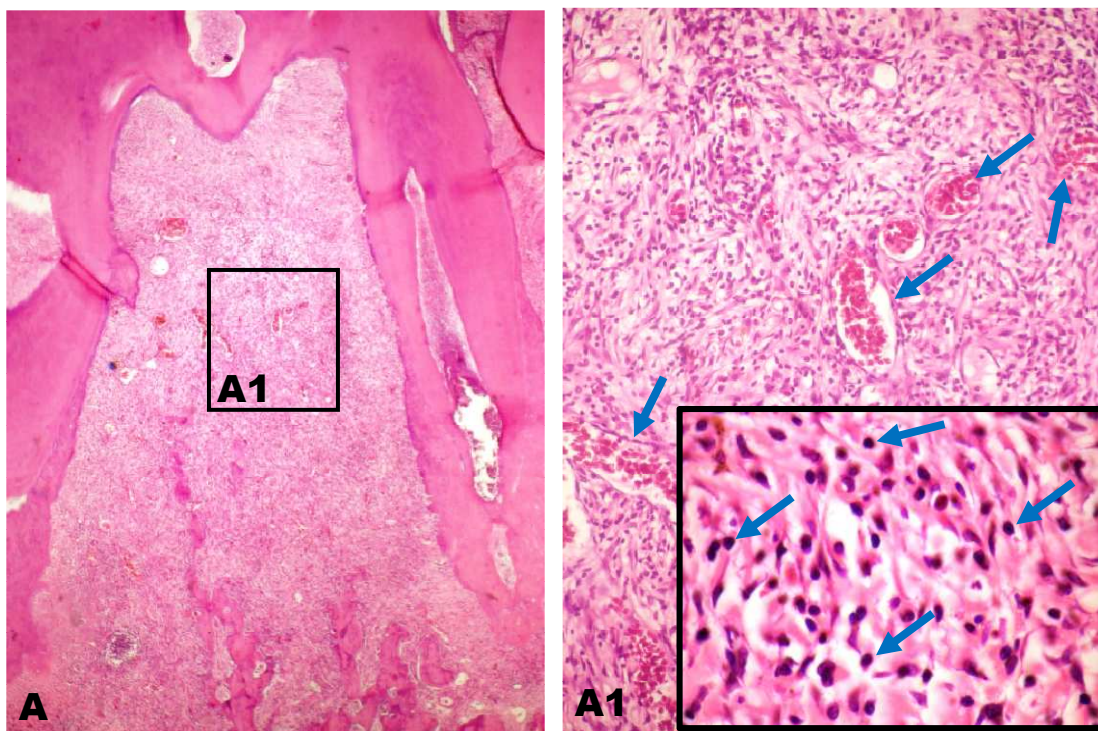


Figura 14 – A. Região de furca em dente do grupo IV e 15 dias com perda óssea total e infiltrado inflamatório intenso e difuso (H.E. 40x). A1. Retângulo de A em maior aumento mostrando infiltrado inflamatório intenso e células mononucleares difusas e vasos congestionados (setas) (H.E. 200x). Inseto em A1 evidenciando infiltrado intenso com células mononucleares (setas) (H.E. 400x).

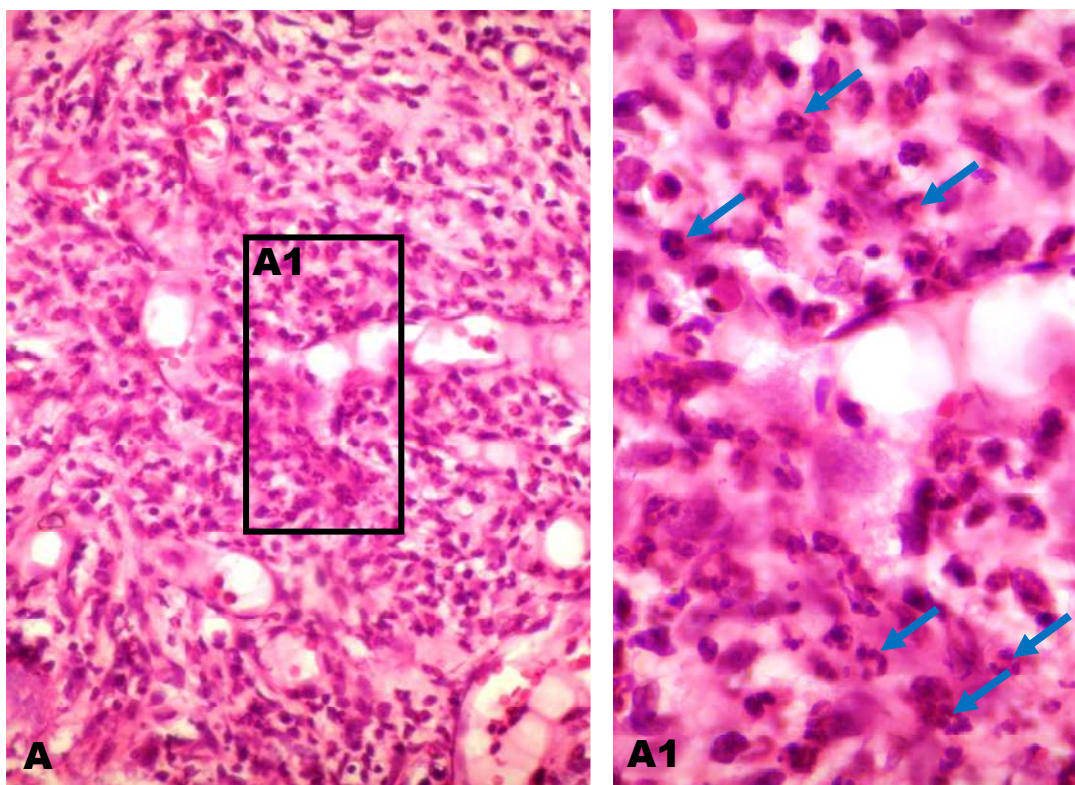


Figura 15 – A. Região de furca com infiltrado inflamatório intenso polimorfonuclear em dente do grupo V e 15 dias (H.E. 400x). A1. Retângulo de A em maior aumento evidenciando polimorfonuclear neutrófilo (setas) (H.E. 1000x).

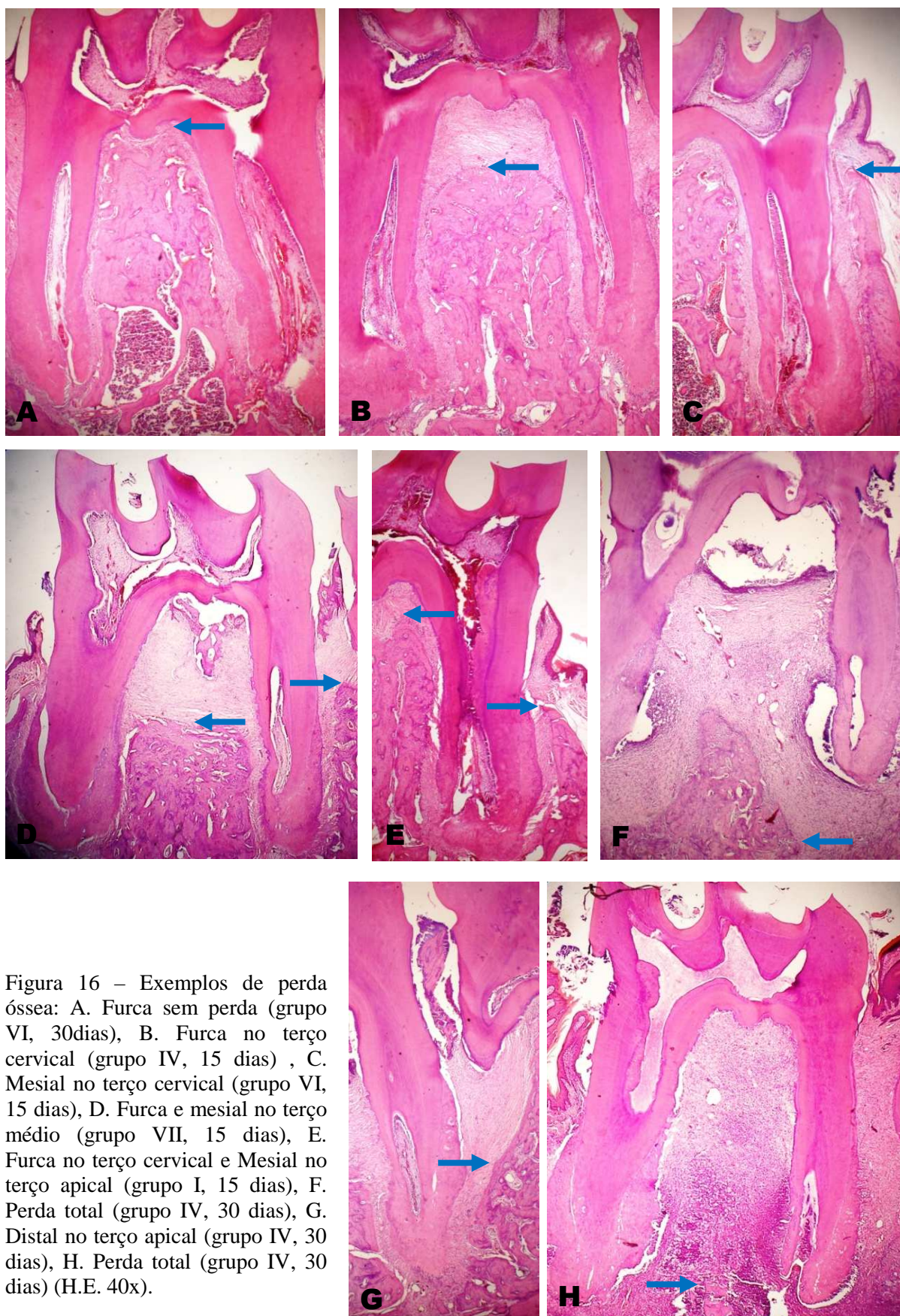


Figura 16 – Exemplos de perda óssea: A. Furca sem perda (grupo VI, 30dias), B. Furca no terço cervical (grupo IV, 15 dias) , C. Mesial no terço cervical (grupo VI, 15 dias), D. Furca e mesial no terço médio (grupo VII, 15 dias), E. Furca no terço cervical e Mesial no terço apical (grupo I, 15 dias), F. Perda total (grupo IV, 30 dias), G. Distal no terço apical (grupo IV, 30 dias), H. Perda total (grupo IV, 30 dias) (H.E. 40x).

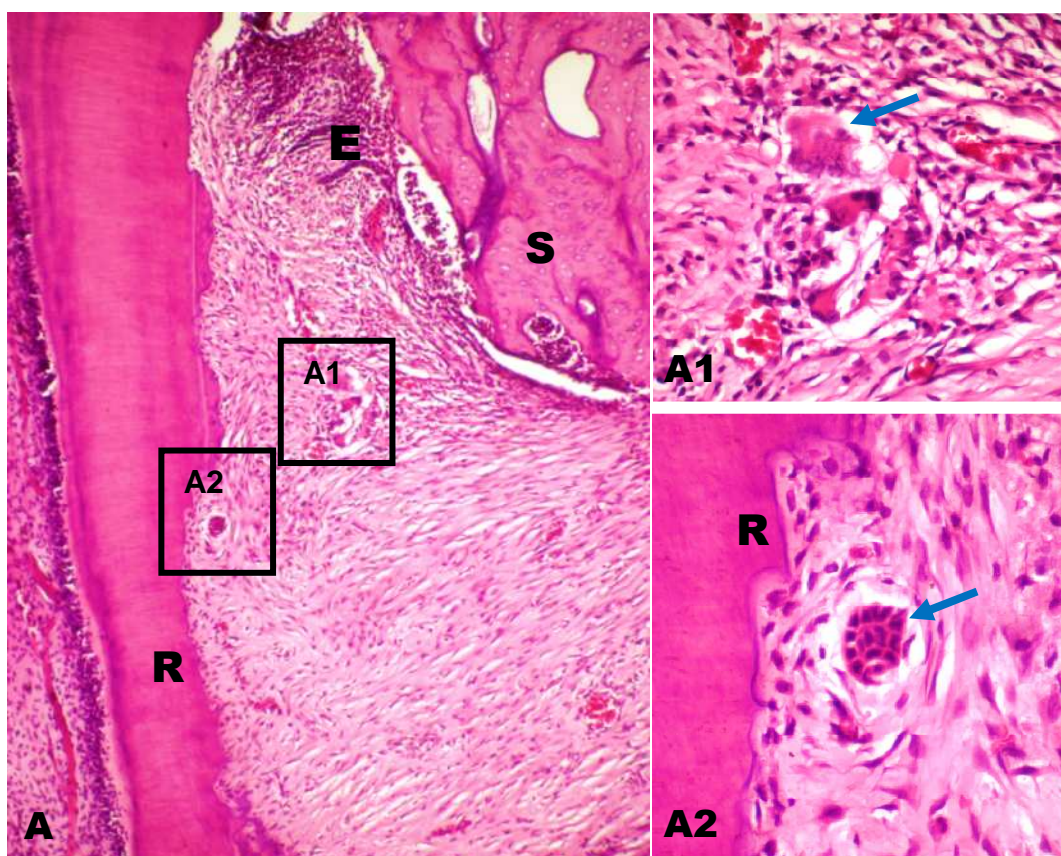


Figura 17 - Região de furca em dente do grupo III e 15 dias com extensa perda óssea mostrando sequestro ósseo (S), epitélio de bolsa (E), dentina radicular com extensa área de reabsorção (R) (H.E. 40x). A1. Retângulo em maior aumento de A mostrando osteoclasto e vasos congestos (H.E. 400x) A2. Retângulo em maior aumento de A mostrando Resto Epitelial de Malassez (seta) e reabsorção dentária (R) (H.E. 400x).

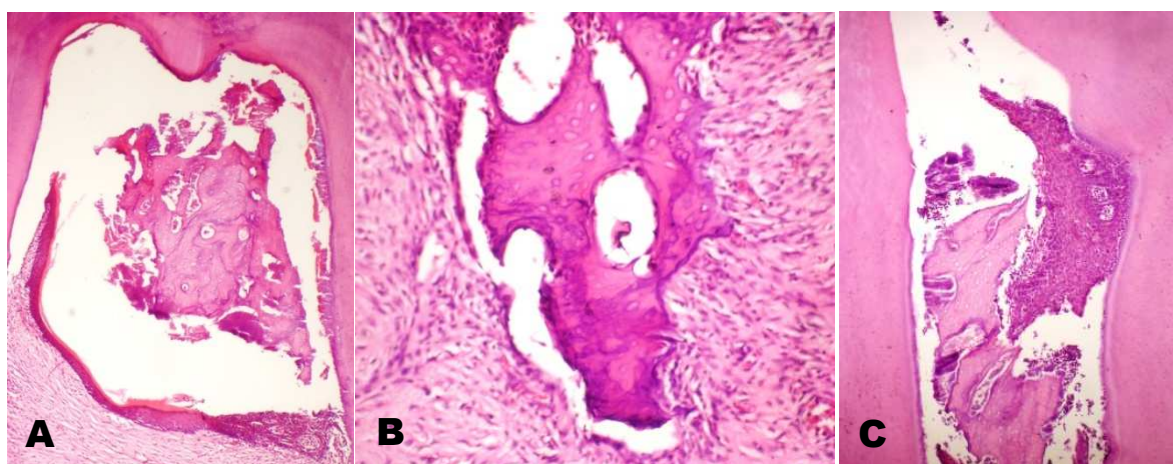


Figura 18 – A. Sequestro ósseo na região de furca, grupo VII e 30 dias (H.E. 40x). B. Sequestro ósseo ainda envolto por tecido conjuntivo, grupo VII e 15 dias (H.E. 100x) e C. Sequestro ósseo na região interdental, grupo V e 15 dias (H.E. 100x).

3.10 Análise estatística

Os testes não paramétricos são utilizados, em geral, quando as amostras são pequenas e quando as pressuposições dos testes paramétricos não são satisfeitas. É bem verdade que, na maioria das vezes, recomenda-se a utilização do teste paramétrico mesmo que as variáveis sejam transformadas para esse fim específico. No entanto, nem sempre é possível garantir condições para que se utilize o teste paramétrico, ficando assim mais plausível utilizar, neste trabalho, o teste equivalente não paramétrico.

O teste estatístico utilizado foi o teste não paramétrico exato de Fisher utilizando os softwares R 2.9.2 e MINITAB 14. O nível de significância utilizado no teste foi de 5%.

As Hipóteses e Regra de Decisão Para o Teste Exato de Fisher são:

H_0 : Não existe diferença entre as proporções;

H_1 : Existe diferença entre as proporções.

A regra de decisão para o Teste Exato de Fisher é:

Rejeita - se H_0 se $p\text{-valor} < \alpha=0,05$ (fixado)

O Conjunto de dados contém 84 observações com doze variáveis divididas em subgrupos, que são:

- **Subgrupo:** Há seis grupos experimentais, cada grupo com diferentes doses de soluções testadas. Cada grupo foi subdividido em dois grupos (A e B) que aguardaram respectivamente o período de 15 e 30 dias para o sacrifício.

- **Epitélios:** Fator com 7 níveis: EGM (Epitélio Gengival Mesial), ESM (Epitélio Sulcular Mesial), EJM (Epitélios Juncional Mesial), EBF (Epitélio de bolsa na Furca), EGD (Epitélio Gengival Distal), ESD (Epitélio Sulcular Distal), EJD (Epitélio Juncional Distal). Com 5 Subníveis (N=Normal, A=Atrofia, E=Exocitose, H=Hiperplasia, Q=Hiperparaqueratose).

- **Biofilme:** Fator com escalas de 0 (Ausente), 1 (Pouco), 2 (Moderado) e 3 (Intenso), os quais indicam a presença e quantidade de biofilmes microbianos.

- **Fibras:** Fator com 3 níveis: FGM (Fibras Gengivais na Mesial), FGF (Fibras Gengivais na Furca), FGD (Fibras Gengivais na Distal). Com 3 subníveis (E= Esparsas, M=Moderadas, D=Densas).

- **Vasos:** Fator com 9 níveis: VSM.PRES. (Vasos Sanguíneos na Mesial – Presença sem congestão), VSM.CONG. (Vasos Sanguíneos na Mesial – com congestão), VSM.TROMB. (Vasos Sanguíneos na Mesial - Trombose), VSF. PRES. (Vasos Sanguíneos na furca – Presença sem congestão), VSF.CONG. (Vasos Sanguíneos na furca – com congestão), VSF.TROMB. (Vasos Sanguíneos na furca - Trombose), VSD. PRES. (Vasos Sanguíneos na distal – Presença sem congestão), VSD.CONG. (Vasos Sanguíneos na distal – com congestão) VSD.TROMB. (Vasos Sanguíneos na distal - Trombose).

- **Infiltrado Inflamatório:** Fator com 9 níveis: IIM.INT. (Infiltrado Inflamatório na Mesial - Intensidade), IIM.QUAL. (Infiltrado Inflamatório na Mesial - Qualidade), IIM.DISTR. (Infiltrado Inflamatório na Mesial - Distribuição), IIF.INT. (Infiltrado Inflamatório na Furca - Intensidade), IIF.QUAL. (Infiltrado Inflamatório na Furca - Qualidade), IIF.DISTR. (Infiltrado Inflamatório na Furca - Distribuição), IID.INT. (Infiltrado Inflamatório na Distal - Intensidade), IID.QUAL. (Infiltrado Inflamatório na Distal - Qualidade), IID.DISTR. (Infiltrado Inflamatório na Distal Distribuição). Os subníveis de Intensidade são: (0=Ausente, 1=Leve, 2=Moderado e 3=Intenso). Para os subníveis de Qualidade são: (A=Agudo, C=Crônico e M=Misto). Para os subníveis de Distribuição são: (F=Focal e D=Difuso).

- **Ligamento Periodontal:** Fator com 3 níveis: IILP.INT. (Infiltrado Inflamatório do Ligamento Periodontal - Intensidade), IILP.QUAL. (Infiltrado Inflamatório do Ligamento Periodontal - Qualidade), IILP.DISTR. (Infiltrado Inflamatório do Ligamento Periodontal -

Distribuição). Para os subníveis de Intensidade são: (0=Ausente, 1=Leve, 2=Moderado e 3=Intenso). Para os subníveis de Qualidade são: (A=Agudo, C=Crônico e M=Misto). Para os subníveis de Distribuição são: (F=Focal e D=Difuso).

- **Restos Epiteliais de Malassez:** Fator com P: presença ou A: ausência de restos epiteliais de Malassez.

- **Reabsorção Dentária:** Fator com P: presença ou A: ausência de reabsorção dentária.

- **Perda Óssea:** Fator com 3 níveis: POM (Perda Óssea na Mesial), POF (Perda Óssea na Furca), POD (Perda Óssea na Distal). Com subníveis (C= 1/3 Cervical, M=1/3 Médio, A=1/3 Apical, T=Perda Total).

- **Sequestro Ósseo:** Fator com P: presença ou A: ausência de sequestro ósseo.

- **Osteoclastos:** Fator com P: presença ou A: ausência de osteoclastos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A literatura demonstra variabilidade nos períodos de indução da doença periodontal pela técnica da ligadura (JONHSON,1975; FERNANDES et al.,2007; TOKER et al., 2008; RODINE, 2005).

Nessa pesquisa foi realizado um estudo piloto da indução da doença periodontal analisando 15 e 30 dias, sugerindo que no período de 15 dias histologicamente encontraríamos perdas ósseas moderadas, com infiltrado inflamatório leve a moderado e ausência de sequestros ósseos. Estes resultados foram corroborados por Rodini (2005) ao caracterizar microscopicamente a doença periodontal inflamatória induzida por ligadura nos períodos de 1, 3, 7,14, 28, 42 e 56 dias, sendo que no período de 14 dias apresentou as características histopatológicas do tecido periodontal com presença de extensas áreas de reabsorções ósseas, sequestro ósseo, biofilme, perda óssea na região de furca, migração apical do epitélio juncional com intensa exocitose, vasos sanguíneos congestos e discretos infiltrados inflamatórios predominantemente agudos (predominando polimorfonucleares neutrófilos), distribuídos em áreas focais, características de doença periodontal instalada.

A maioria dos trabalhos aborda as propriedades biológicas antimicrobianas do extrato etanólico da própolis em diversas concentrações (GEBARA et al.,2002; GONSALEZ, 2006; ISHIDA, 2006; KONISHI, 2004; LONGHINI, 2007; PARK et al., 1998; VARGAS, 2004). Nessa pesquisa nos propomos a analisar a atividade anti-inflamatória das suspensões aquosa de própolis nas concentrações de 0,1%, 1,0% e 10 %, tendo como agente solubilizante o Polissorbato 80 (Tween 80) em virtude da sua propriedade farmacotécnica (tensoativo) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977) e por não interferir nas propriedades antimicrobianas da própolis (KONISHI et al., 2004).

Ressalta-se que essa pesquisa é inédita por adotar metodologia diferenciada dos trabalhos anteriormente citados, pela utilização da própolis como irrigação local, pelo veículo utilizado (Tween 80) e forma de avaliação dos resultados, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos com os achados da literatura.

Toker (2008) utilizou em sua metodologia o tratamento com própolis administrando-a sistemicamente e ao mesmo tempo em que ocorria a indução da doença periodontal por um período de 11 dias. Diversamente adotamos a administração local da própolis apenas depois de finalizado o período de indução da doença de 15 dias. Portanto, Toker (2008) avaliou o uso da própolis para prevenção da perda óssea e em nossa pesquisa foi adotado “*in usage test*” ou seja, na maneira que é adotado *in vivo* em pacientes (ISO/Technical Report 7405, 1984).

Em virtude da grande quantidade de variáveis analisadas, os resultados serão apresentados em conjunto para todos os grupos experimentais (exceto grupo VI) onde será dada ênfase às principais características estatisticamente significativas. Por uma questão de ordem será apresentado inicialmente os resultados em relação à perda óssea, visto que o mesmo é importante para uma melhor compreensão posterior sobre o infiltrado inflamatório. Depois serão apresentadas as outras variáveis mais significativas: fibras gengivais, vasos sanguíneos, reabsorção dentária, tecidos epiteliais e outras variáveis que isoladamente não apresentaram significado estatístico relevante: Restos epiteliais de Malassez, infiltrado inflamatório no ligamento periodontal, sequestro ósseo e osteoclastos. Em seguida será feito a descrição histológica do padrão de normalidade apresentado pelo grupo VI.

4.1 Comparação entre os grupos experimentais

4.1.1 Perda Óssea

Não houve diferença estatística significativa para as diferentes substâncias testadas nos níveis de perda óssea nas regiões mesial e distal. Na região de furca, detectou-se diferença significativa entre as substâncias testadas apenas no período de 30 dias, conforme p-valor na tabela 1.

Para os períodos de 15 e 30 dias na região mesial e distal predominou perda óssea no nível do terço médio enquanto no período de 15 dias para a região de furca ocorreu maior número de casos com perdas no nível do terço cervical, sem diferença estatística significativa (figura 19).

GRUPOS		I		II		III		IV		V		VII		Total	P-valor 15 Dias (A1)	P-valor 30 Dias (B1)	
VARIÁVEIS		SAP 0,1% A1	SAP 0,1% B1	SAP 1% A1	SAP 1% B1	SAP 10% A1	SAP 10% B1	T80 5% A1	T80 5% B1	C+ A1	C+ B1	Clorex 2% A1	Clorex 2% B1				
PERDA ÓSSEA	POM	C	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.5458	0.0542
		M	5	7	5	6	6	7	4	3	3	3	3	5	57		
		A	2	0	1	1	0	0	2	3	2	3	3	1	18		
		T	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1		
	POF	SP	4	5	2	3	0	2	0	1	1	2	0	0	20	0.1584	0.0175*
		C	3	0	2	1	4	2	4	0	2	0	3	4	25		
		M	0	1	0	2	2	2	2	0	2	2	2	2	17		
		A	0	1	2	0	1	0	1	3	0	3	2	1	14		
		T	0	0	1	1	0	1	0	3	2	0	0	0	8		
	POD	C	2	0	1	1	1	2	0	1	0	1	1	0	10	0.7382	0.0508
		M	4	7	3	5	5	4	7	1	5	5	4	6	56		
		A	1	0	2	0	1	0	0	3	1	1	2	1	12		
T		0	0	1	1	0	1	0	2	1	0	0	0	6			

P-Valor: Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c. *Os valores em negrito indicam diferença estatística significativa em nível de 5%. SAP: Suspensão aquosa de própolis. T80: Tween 80. C+: Grupo controle positivo. Clorex: Grupo Clorexidina. SP: sem perda óssea. C: Perda óssea no nível do 1/3 cervical. M: Perda óssea no nível do 1/3 médio. A: Perda óssea no nível do 1/3 apical. T: Perda óssea total.

Tabela 1 - Cruzamento entre perda óssea com os Subgrupos.

O gráfico 1 apresenta as quantidades de dentes sem perda óssea (SP) ou com perda óssea no nível do $\frac{1}{3}$ cervical (C) na região da furca dos subgrupos sacrificados em 30 dias, onde se pode verificar que o subgrupo I (SAP 0,1% B1) apresentou 5 dentes sem perda óssea, enquanto os outros grupos tiveram menos dentes sem perda óssea e/ou perda óssea no $\frac{1}{3}$ cervical.

O gráfico 2 mostra a quantidade de dentes com perda óssea nos níveis do $\frac{1}{3}$ médio, $\frac{1}{3}$ apical e perda total na região de furca dos subgrupos sacrificados em 30 dias, onde, o subgrupo I (SAP 0,1% B1) foi o que apresentou menor quantidade de casos (um dente com perda no $\frac{1}{3}$ médio e um dente com perda no $\frac{1}{3}$ apical) enquanto os outros subgrupos apresentaram maior quantidade de dentes com perdas ósseas e/ou com perdas mais severas (figura 20).

Ainda pelo gráfico 2 pode ser verificado que o subgrupo IV (T80 5% B1) e o subgrupo V (C+ B1) apresentam os maiores índices de dentes com perdas no $\frac{1}{3}$ apical e total. Toker (2008) utilizou a própolis sistemicamente para avaliar a prevenção da perda óssea e não observou diferença estatística entre as duas concentrações testadas, no entanto os grupos que receberam própolis desenvolveram menores perdas ósseas que o grupo que não recebeu própolis.

Nesta pesquisa sugere-se pela análise dos resultados obtidos que a utilização local da própolis no tratamento da doença periodontal pode ter influenciado na estabilização do processo de perda óssea, visto que o uso do produto iniciou-se após o período de indução, quando a doença já estava instalada e a perda óssea já tinha ocorrido, enquanto o veículo (Tween 80) sozinho não obteve o mesmo resultado. Não se pode afirmar que houve ganho de tecido ósseo nos grupos tratados com própolis, porque no grupo V (controle positivo), que não recebeu tratamento, a análise histológica ocorreu em 15 e 30 dias após o final do período de indução e assim não há parâmetro de comparação.

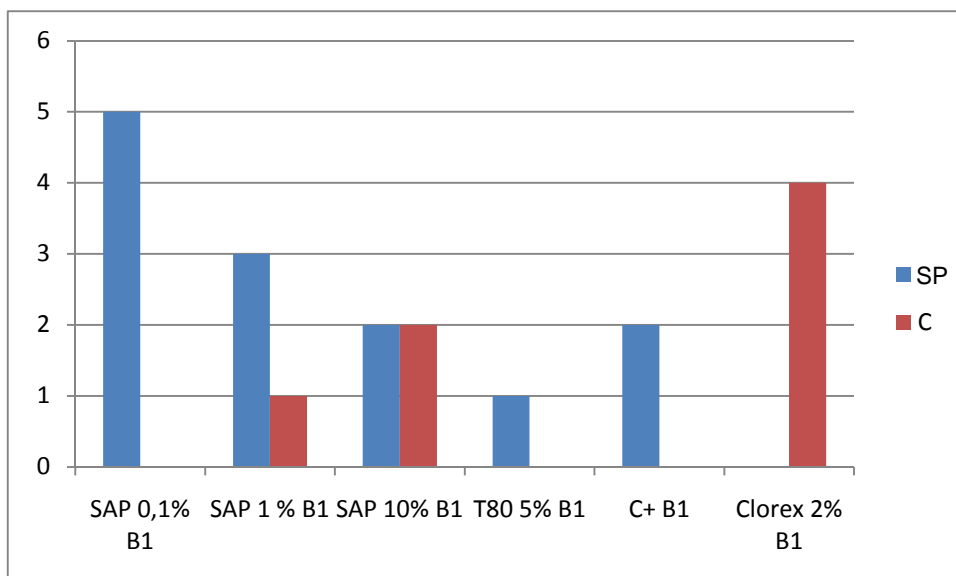


Gráfico 1 – Dentes sem perda óssea (SP) ou perda óssea no nível do $\frac{1}{3}$ cervical (C) na região da furca nos subgrupos com sacrifício em 30 dias.

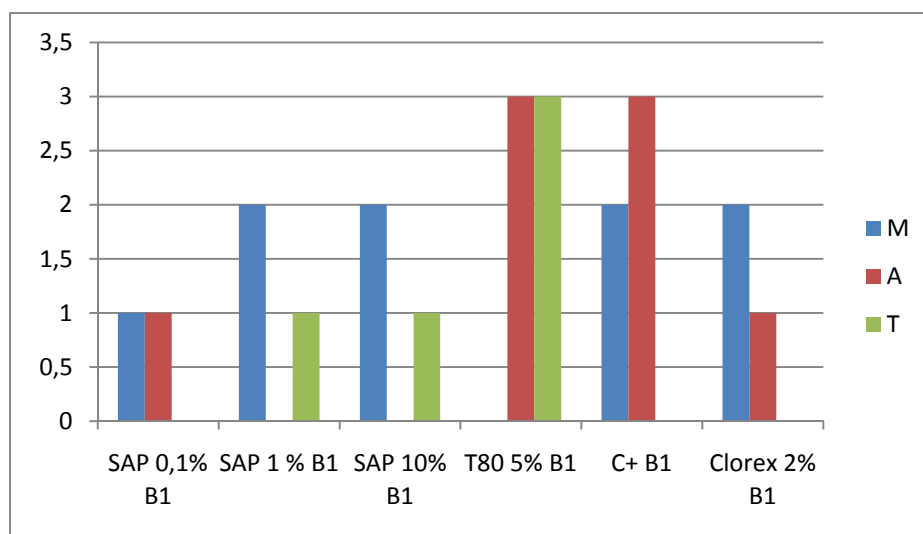


Gráfico 2 – Dentes com perda óssea no $\frac{1}{3}$ médio (M), Perda no nível do $\frac{1}{3}$ apical (A) e perda óssea total (T) na região da furca nos subgrupos com sacrifício em 30 dias.



Figura 19 – Perda óssea mesial (M) e distal (D) classificadas ao nível do terço médio e perda óssea no terço cervical da região da furca (F) em um dente do grupo I de 15 dias (H.E. 40x).



Figura 20 - Dente tratado com Tween 80 a 5%, do período de 30 dias apresentando perda óssea nas regiões mesial (M), distal (D) e furca (F) ao nível do $\frac{1}{3}$ apical, presença de sequestro ósseo (S) na região da furca e na distal, reabsorção dentária (RD) extensa na raiz mesial (H.E. 40x).

4.1.2 Infiltrado Inflamatório

Na região mesial (IIM.INT.) não foi registrado infiltrado inflamatório com grau intenso e em relação à qualidade (IIM.QUAL.) não foram encontradas células polimorfonucleares.

Na região de furca não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação à intensidade do infiltrado inflamatório ocorrendo maior número de casos de infiltrado inflamatório moderados (figura 13B e 13B1). Da mesma forma, a região distal também não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos nos períodos de 15 e 30 dias em relação à intensidade do infiltrado inflamatório, sendo do tipo moderado o mais frequente (figura 13C).

Na região mesial e no período de sacrifício de 15 dias, pelo gráfico 3 verifica-se maior quantidade de dentes com infiltrado inflamatório leve nos subgrupos tratados com própolis (SAP 0,1% A1, SAP 1% A1 e SAP 10% A1) (figura 13A e 13A1). No subgrupo tratado com Tween 80, pode-se verificar na tabela 2 que os casos com inflamação se concentraram no período de 30 dias. A clorexidina a 2 % em 15 dias na região mesial apresentou menor incidência de casos com infiltrado inflamatório leve quando comparado com a própolis e maior número de casos com infiltrado inflamatório moderado.

No período de sacrifício de 30 dias na mesial, pelo gráfico 4, verifica-se maior quantidade de casos sem inflamação para o grupo da clorexidina e também uma quantidade menor de casos com infiltrado inflamatório moderado e leve. Ao comparar os resultados para clorexidina nos períodos de 15 e de 30 dias verificou-se que em longo prazo há uma redução do processo inflamatório.

GRUPOS		I		II		III		IV		V		VII		Total	P-valor 15 Dias (A1)	P-valor 30 Dias (B1)	
VARIÁVEIS		SAP 0,1% A1	SAP 0,1% B1	SAP 1% A1	SAP 1% B1	SAP 10% A1	SAP 10% B1	T80 5% A1	T80 5% B1	C+ A1	C+ B1	Clorex 2% A1	Clorex 2% B1				
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	IIM. INT.	0	1	1	0	0	1	1	7	0	3	3	1	3	21	0.0002*	0.0316*
		1	5	3	6	1	5	1	0	4	3	4	3	2	37		
		2	1	3	0	6	0	4	0	3	0	0	3	1	21		
	IIM. QUAL.	0	1	1	0	0	1	1	7	0	3	3	1	3	21	0.0002*	0.0800
		C	6	6	6	7	5	6	0	7	2	4	4	3	56		
		M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	3		
	IIM. DISTR.	0	1	1	0	0	1	1	7	0	3	3	1	3	21	0.0023*	0.0342*
		D	6	3	4	3	3	6	0	6	2	4	4	2	43		
		F	0	3	2	4	2	0	0	1	1	0	2	1	16		
	IIF. INT.	0	2	0	2	0	2	1	0	0	1	0	1	1	10	0.5582	0.2100
		1	0	1	0	0	2	2	3	0	1	0	2	2	13		
		2	1	1	1	1	3	1	2	3	1	4	3	2	23		
		3	0	0	2	3	0	1	2	3	3	1	1	0	16		
	IIF. QUAL.	0	2	0	2	0	2	1	0	0	1	0	1	1	10	0.1418	0.0185*
		A	0	0	1	1	1	0	1	1	1	3	1	0	10		
		C	0	2	0	0	4	3	2	0	2	1	0	3	17		
		M	1	0	2	3	0	1	4	5	2	1	5	1	25		
	IIF. DISTR.	0	2	0	2	0	2	1	0	0	1	0	1	1	10	0.5362	0.6961
		D	1	0	1	3	4	2	5	3	4	1	3	2	29		
		F	0	2	2	1	1	2	2	3	1	4	3	2	23		
	IID. INT.	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0.1193	0.0739
		1	1	2	0	3	1	1	3	0	4	4	0	2	21		
		2	6	4	5	4	5	6	3	7	2	1	6	4	53		
		3	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	6		
IID. QUAL.	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0.0189*	0.1357	
	A	3	1	3	0	2	0	0	0	1	3	5	3	21			
	C	2	4	0	5	3	6	0	5	0	1	0	2	28			
IID. DISTR.	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0.0235*	0.0873	
	D	2	5	5	3	4	4	6	6	2	5	6	7	55			
	F	5	2	1	4	3	3	3	0	1	5	0	1	0			25

P-Valor: Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c. *Os valores em negrito indicam diferença estatística significativa em nível de 5%. SAP: Suspensão aquosa de própolis. T80: Tween 80. C+: Grupo controle positivo. Clorex: Grupo Clorexidina. Infiltrado inflamatório - intensidade (0: ausente, 1: leve e 2: moderado). Qualidade (0: ausente, C: crônico e M: misto). Distribuição (0: Ausente, D: difuso e F: focal)

Tabela 2 - Cruzamento entre Infiltrado Inflamatório com Subgrupos.

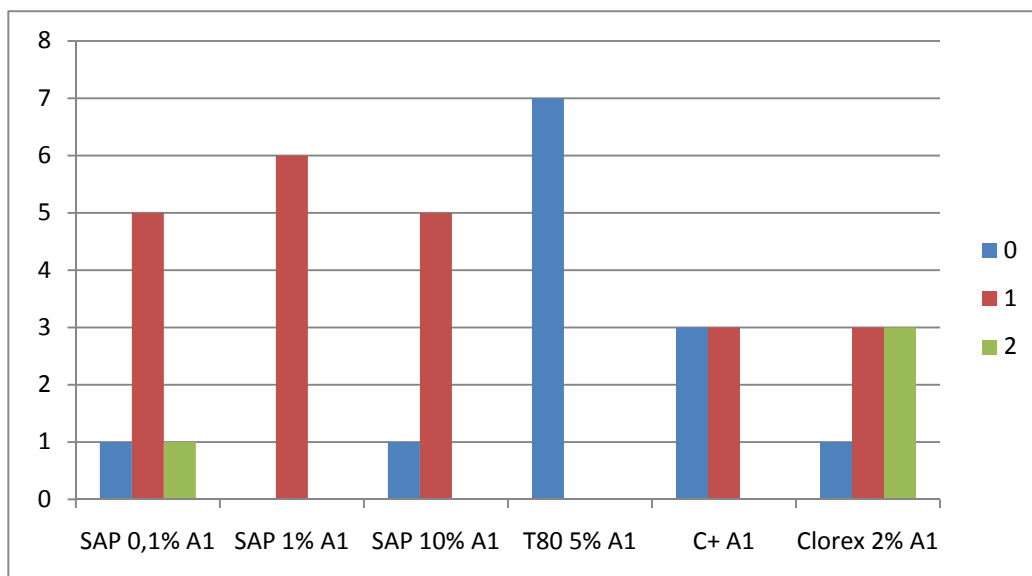


Gráfico 3 – Incidência de Infiltrado inflamatório ausente (0), leve (1) ou moderado (2) na região mesial nos subgrupos sacrificados em 15 dias.

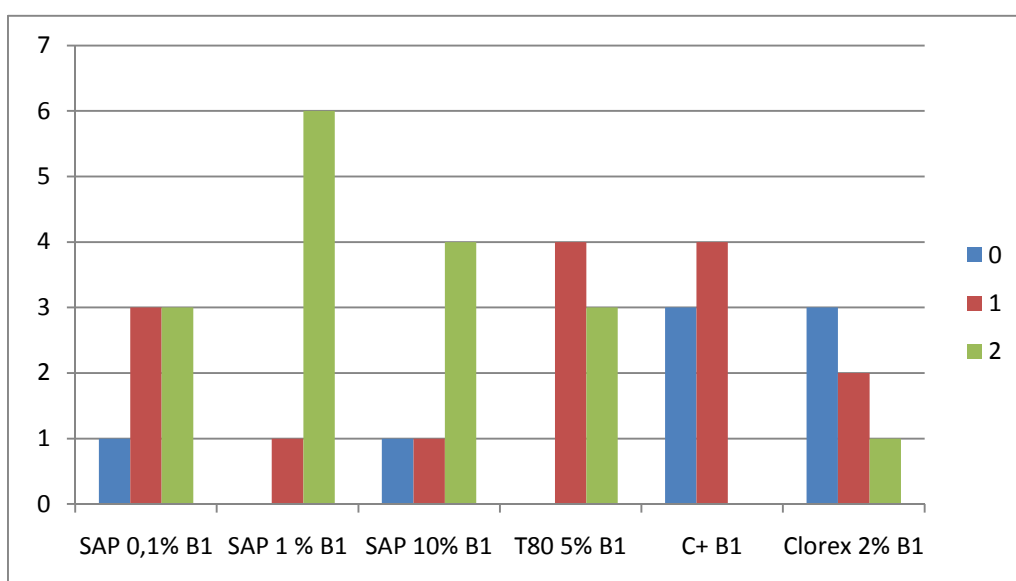


Gráfico 4 – Incidência de Infiltrado inflamatório ausente (0), leve (1) ou moderado (2) na região mesial nos subgrupos sacrificados em 30 dias.

O mesmo raciocínio pode ser adotado para o subgrupo V (C+) onde se verificou comparativamente entre 15 e 30 dias que houve pouca alteração entre os períodos, ocorrendo apenas 1 caso a mais de infiltrado inflamatório leve para o período de 30 dias (comparar gráfico 3 e 4).

Para o subgrupo tratado com Tween 80 (T80 5%) pode ser observado uma piora do quadro quando comparado os resultado de 15 e 30 dias, revelando que o veículo da própolis sozinho não contribui como agente anti-inflamatório (comparar gráfico 3 e 4).

Em 30 dias, ainda pelo gráfico 4 observou-se que houve um aumento do processo inflamatório nos dentes tratados com própolis quando comparado com os resultados de 15 dias.

Em relação à qualidade do infiltrado inflamatório na região mesial o teste exato de Fisher revelou diferenças entre os subgrupos apenas no período de 15 dias onde pode ser observado pela tabela 2 que houve um predomínio de células mononucleares com maior incidência para os grupos testados com própolis (gráfico 5) (figura 13A). O melhor resultado aparente do subgrupo IV deve ser visto com muito cuidado pelo que já foi mostrado anteriormente em relação à intensidade do infiltrado inflamatório que se concentrou no período de 30 dias.

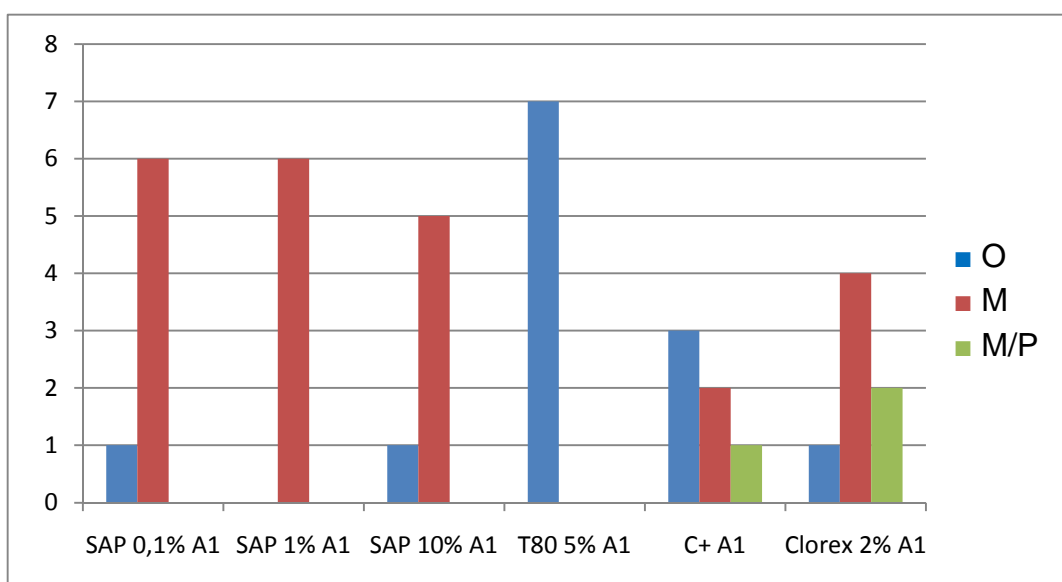


Gráfico 5 – Incidência do tipo celular entre os subgrupos sacrificados em 15 dias na região mesial: ausencia de céls. Inflamatórias (O), células mononucleares (M) e células mononucleares e polimorfonucleares (M/P).

Quanto à distribuição das células inflamatórias no tecido na região mesial embora existam diferenças estatisticamente significantes, deve-se ressaltar que tanto no período de 15 como no período de 30 dias, as células se encontram distribuídas predominantemente de forma difusa.

Assim, na região mesial quando analisado o infiltrado inflamatório os melhores resultados foram para todas as suspensões de própolis testadas no período de 15 dias, demonstrando infiltrado inflamatório leve e com células mononucleares, enquanto que a clorexidina a 2% obteve os melhores resultados em 30 dias, sugerindo a propriedade da substantividade da clorexidina (LINDHE et al., 2005). Possivelmente a ação anti-inflamatória da clorexidina foi alcançada de forma indireta em consequência de sua atividade antimicrobiana.

Analisando a região da furca, apenas o fator IIF. QUAL (qualidade) indicou uma diferença significativa de proporções entre os subgrupos para o período de 30 dias, ou seja, existe uma relação entre os tratamentos com a qualidade dos infiltrados inflamatórios. No entanto, na região de furca a presença de infiltrado inflamatório está relacionada com a presença de perda óssea nessa região. Assim, como relatado anteriormente sobre a perda óssea nessa região verifica-se que a diferença estatística significativa ocorreu no período de 30 dias também e que o subgrupo tratado com própolis a 0,1% apresentou menores perdas ósseas (figura 19). Assim o tipo celular encontrado nessa região revelou células mononucleares para o mesmo subgrupo com apenas dois dentes com inflamação enquanto os outros subgrupos apresentam um maior número de casos com inflamação e/ou células polimorfonucleares (gráfico 6).

O subgrupo IV (T80 5% B1) quando analisado quanto à perda óssea (gráfico 2), foi o subgrupo que apresentou as maiores perdas ósseas em 30 dias na região da furca, quando verificado o tipo celular no mesmo período observamos um equilíbrio na quantidade de

células polimorfonucleares e mononucleares (gráfico 6). De forma semelhante, o subgrupo V (C+ B1), o qual também apresentou perdas ósseas grandes na furca no período de 30 dias, aqui se verifica maior índice de células polimorfonucleares.

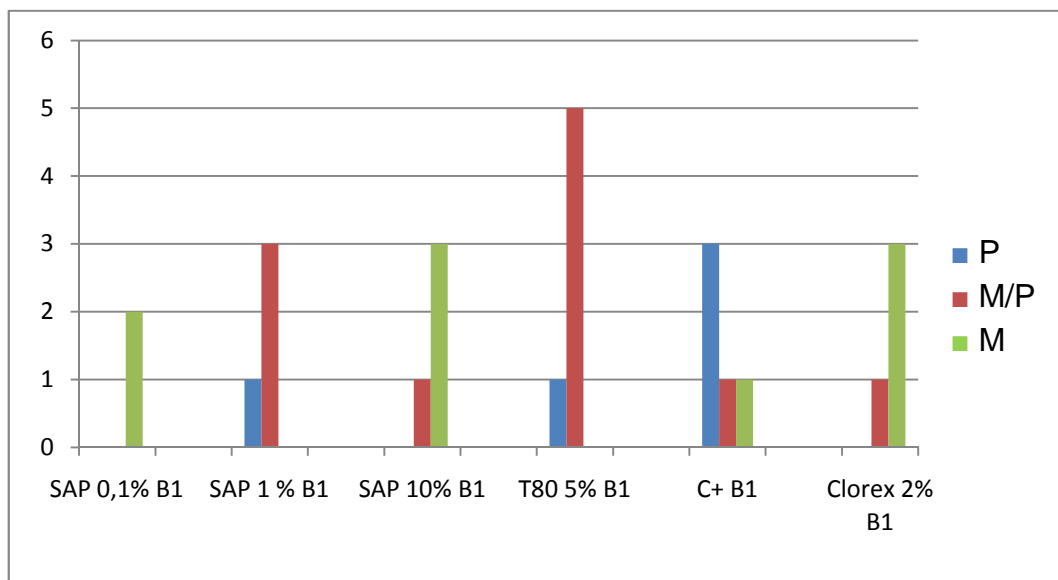


Gráfico 6 – Distribuição dos tipos celulares do infiltrado inflamatório nos subgrupos sacrificados em 30 dias na região da furca: polimorfonucleares (P), mono e polimorfonucleares (M/P) e mononucleares (M).

Na região distal, os fatores que indicam diferença estatística significativa em 15 dias são a qualidade do infiltrado inflamatório e sua distribuição. Não houve diferença significativa quando analisado o período de 30 dias.

Visualizando o gráfico 7 observa-se que apenas os subgrupos testados com própolis (SAP 0,1% A1 e SAP 10% A1) apresentaram células mononucleares, de forma semelhante ao que aconteceu na região mesial no mesmo período de 15 dias e na região de furca no período de 30 dias e, quando comparadas às quantidades de células polimorfonucleares, os mesmos subgrupos apresentaram maior uniformidade de distribuição das mesmas em comparação aos grupos IV (T80 5% A1) e V (C+ A1), onde ocorreu o equilíbrio entre células mononucleares e polimorfonucleares. No subgrupo da clorexidina (Clorex 2% A1) verifica-se maior número de células polimorfonucleares em comparação com outros subgrupos.

Comparando o subgrupo I (SAP 0,1% A1) e o subgrupo VII (Clorex 2% A1) em relação à distribuição das células inflamatórias na região distal, o subgrupo I apresentou distribuição focal (figura 21) enquanto o subgrupo VII apresentou distribuição difusa (tabela 2).

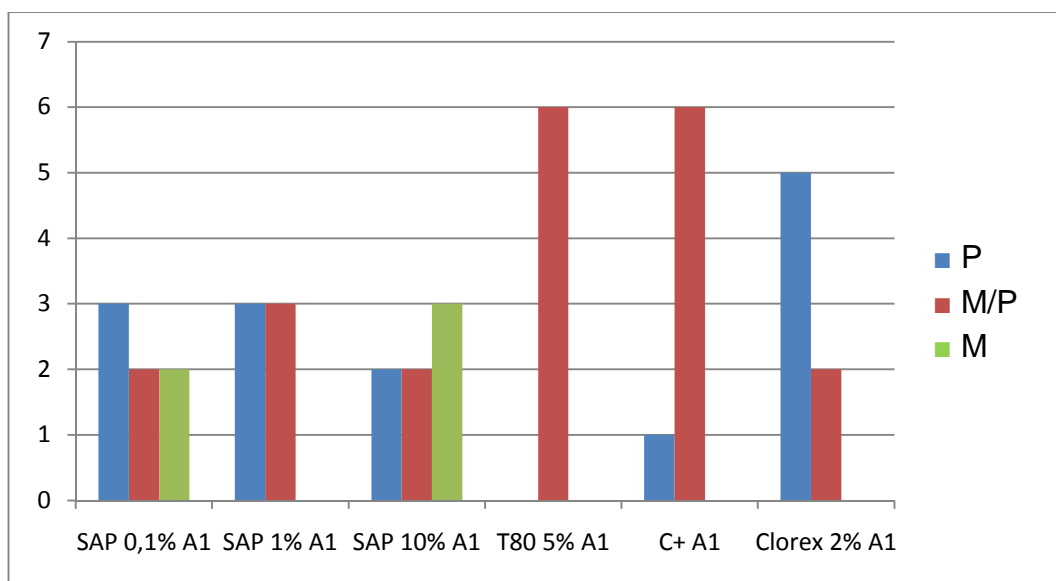


Gráfico 7 – Distribuição dos tipos celulares do infiltrado inflamatório nos subgrupos sacrificados em 15 dias na região distal: polimorfonucleares (P), mono e polimorfonucleares (M/P) e mononucleares (M).

4.1.3 Fibras gengivais

A região da furca foi a única que não apresentou diferença estatística significativa entre os tratamentos em nenhum dos tempos observados (15 e 30 dias). As diversas dosagens das substâncias subgengivais não estão associadas aos diferentes tipos de fibras encontradas, sendo que, de forma geral, houve um predomínio das fibras moderadas, o que é justificado pela presença do processo inflamatório nessa região (figura 21).

No período de 15 dias as diferenças estatísticas significativas só foram verificadas para a região distal (FGD). Para o período de 30 dias, as diferenças foram na mesial (FGM) e na distal (FGD), conforme tabela 3.

Quando analisamos anteriormente o infiltrado inflamatório na região mesial no período de 30 dias foi constatado melhores resultados com a clorexidina (Clorex 2% B1), no entanto o número de casos com fibras densas é inferior ao número de casos observados no mesmo período para os subgrupos tratados com própolis, o que sugere que a presença da própolis pode propiciar em longo prazo maior indução de formação de fibras densas. Esse pensamento pode ser reforçado quando verificamos que no grupo IV (Tween 80 a 5%) apenas 1 dente apresentou fibras densas contra 6 moderadas (tabela 3), e dessa forma, nos grupos tratados com própolis, o veículo (Tween 80) pode ter contribuído para baixar a incidência de fibras densas nos subgrupos tratados com própolis. Ainda no período de 30 dias, o grupo controle positivo, embora sem tratamento, também teve suas fibras na mesial verificadas como densas (mesmo não ocorrendo alteração no quadro inflamatório significativa entre 15 e 30 dias, ver tabela 2) e isso não pode ser explicado com base nas nossas observações.

Na região mesial predominaram fibras densas para todos os subgrupos, havendo maior incidência para os grupos tratados com as suspensões de própolis testadas em comparação ao grupo tratado com clorexidina a 2% no período de 30 dias.

Quanto à região distal (FGD), as associações significativas entre as diferentes dosagens e os níveis de fibra nos dois períodos observados é apresentado no gráfico 9.

Em relação aos subgrupos tratados com clorexidina (clorex 2%) em 15 e em 30 dias as fibras gengivais encontradas foram predominantemente moderadas o que é perfeitamente aceitável levando-se em conta que o infiltrado inflamatório nesse subgrupo apresentou células polimorfonucleares na maioria dos casos do período de 15 dias.

GRUPOS			I		II		III		IV		V		VII		Total	P-valor 15 Dias (A1)	P-valor 30 Dias (B1)
VARIÁVEIS			SAP 0,1% A1	SAP 0,1% B1	SAP 1% A1	SAP 1% B1	SAP 10% A1	SAP 10% B1	T80 5% A1	T80 5% B1	C+ A1	C+ B1	Clorex 2% A1	Clorex 2% B1			
FIBRAS	FGM	D	7	6	3	6	5	5	5	1	4	7	2	4	55	0.0757	0.0095*
		M	0	1	3	1	1	2	2	6	2	0	5	3			
	FGF	D	1	0	2	1	1	2	0	0	0	3	1	1	12	0.2019	0.3057
		E	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3		
		M	2	2	2	3	6	3	5	6	6	2	6	4	47		
	FGD	D	7	4	2	3	4	5	2	2	1	6	1	0	37	0.0072*	0.0038*
		E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1		
		M	0	3	5	4	3	2	5	5	6	0	5	7	45		

P-Valor: Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c. *Os valores em negrito indicam diferença estatística significativa em nível de 5%. SAP: Suspensão aquosa de própolis. T80: Tween 80. C+: Grupo controle positivo. Clorex: Grupo Clorexidina. D: Fibras densas. M: Fibras moderadas. E: Fibras esparsas.

Tabela 3 – Cruzamento entre Fibras com subgrupos.

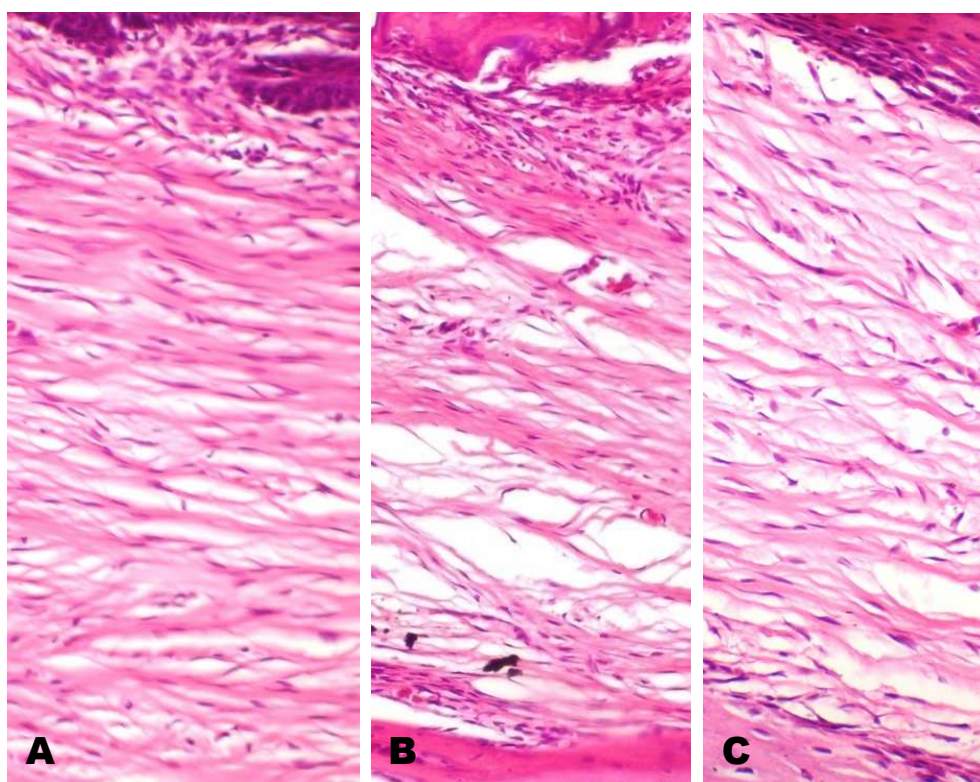


Figura 21 – Fibras moderadas na região de furca. Exemplo no grupo I (A), grupo V (B) e grupo VII (C) (H.E. 200x).

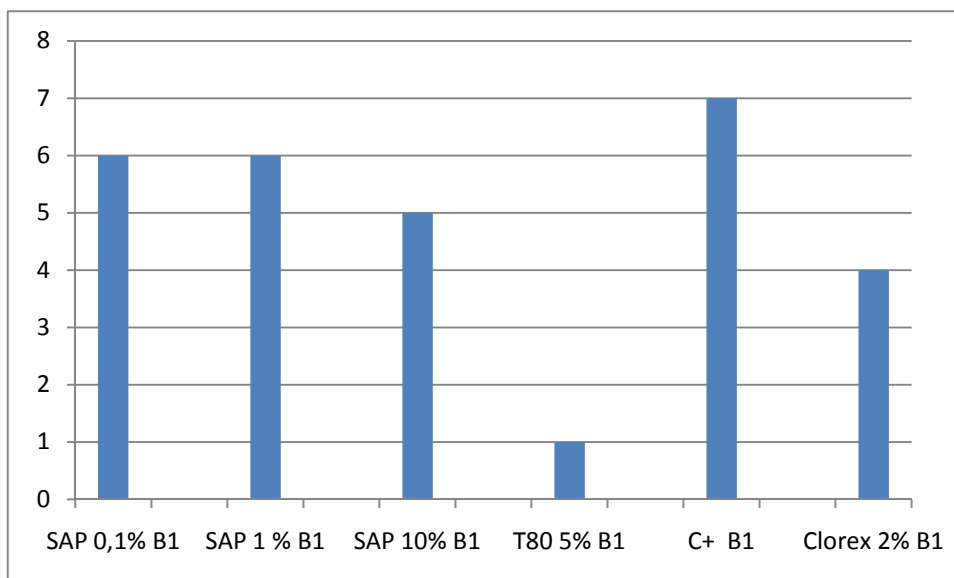


Gráfico 8 – Incidência de fibras gengivais Densas na mesial nos subgrupos sacrificados em 30 dias.

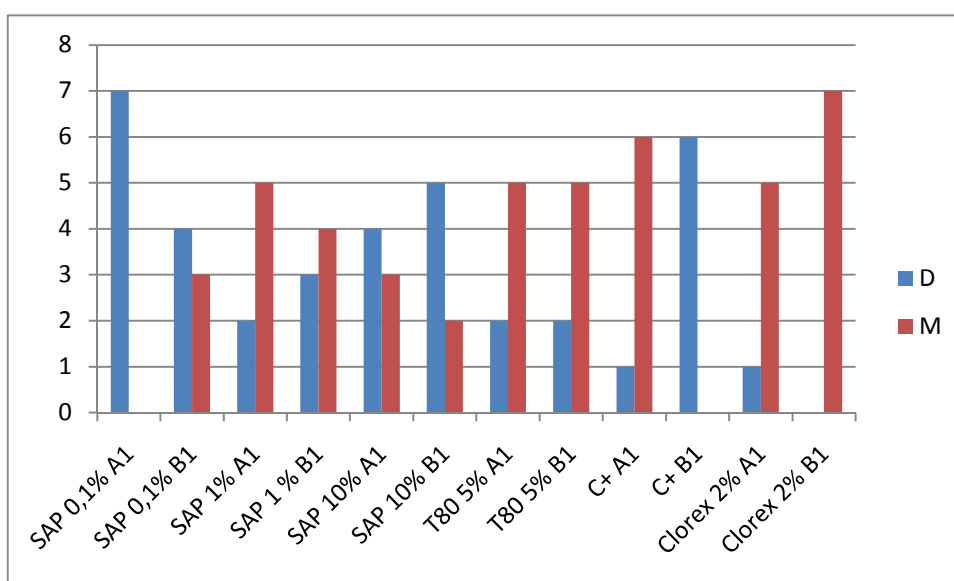


Gráfico 9 – Incidência de fibras densas (D) ou moderadas (M) por subgrupo (região distal)

No grupo controle positivo (C+) o infiltrado inflamatório em 15 dias apresentava um equilíbrio de células mononucleares e polimorfonucleares, assim a evolução de 15 para 30 dias no gráfico 9 é plausível, considerando que em um período de tempo mais curto apresentou mais fibras moderadas e com a estabilização do processo inflamatório periodontal ocorreu a evolução para fibras densas em 30 dias.

Considerando da mesma forma o estado inflamatório do grupo tratado com Tween 80 em 15 dias (descrito anteriormente), em relação as fibras não houve alteração entre 15 e 30 dias predominando fibras moderadas nos dois períodos.

Na região distal foram observadas as diferenças mais significativas, o grupo tratado com clorexidina a 2% apresentou predominantemente fibras moderadas nos dois períodos de tempo, enquanto as suspensões de própolis a 0,1% e 10% apresentaram fibras predominantemente densas.

Concordando com estes resultados, Silva et al. (2000) avaliaram o efeito da ação de extratos etanólicos na lâmina própria da mucosa bucal de ratos e sugeriram que a própolis não provocou reação inflamatória e induziu a formação epitelial, bem como a neoformação vascular e atividade fibroblástica do tecido conjuntivo subjacente.

Correlacionando os resultados alcançados pelas suspensões testadas de própolis na mesial e na distal no período de 30 dias em comparação com os resultados da clorexidina a 2% sugere-se que em longo prazo a irrigação das bolsas periodontais com as suspensões de própolis pode contribuir para uma ação fibroblástica maior, favorecendo a formação de fibras densas.

4.1.4 Vasos Sanguíneos

No tecido conjuntivo subepitelial a proliferação vascular foi avaliada sendo que na região mesial e no período de 15 dias o subgrupo I (SAP 0,1% A1) apresentou a menor incidência de proliferação de vasos sanguíneos entre os subgrupos testados com própolis, o que condiz com os resultados apresentados na tabela 3 onde a incidência de fibras gengivais são predominantemente densas para o mesmo subgrupo embora não tenha ocorrido diferença estatística para a variável fibras gengivais nesse período. Esses resultados são compatíveis também com o que pode ser observado para a qualidade do infiltrado inflamatório onde

encontramos células mononucleares. Entretanto nos subgrupos II (SAP 1% A1) e III (SAP 10% A1) a proliferação vascular foi observada de forma mais acentuada.

No período de 15 dias e na região distal, todos os subgrupos apresentaram a proliferação de vasos sanguíneos com exceção do subgrupo I (SAP 0,1% A1) e esse resultado é condizente com o tipo de fibra gengival densa apresentado no gráfico 9, para o mesmo período. Houve um predomínio de vasos sem congestão nos grupos testados com própolis, em comparação ao grupo testado com clorexidina onde predominou a presença de vasos congestos (gráfico 10).

Na região de furca e independente do período de tempo os vasos estavam congestos sem diferenças estatísticas entre os grupos. Nenhuma das regiões (Mesial, Furca e Distal) revelou trombose nos vasos.

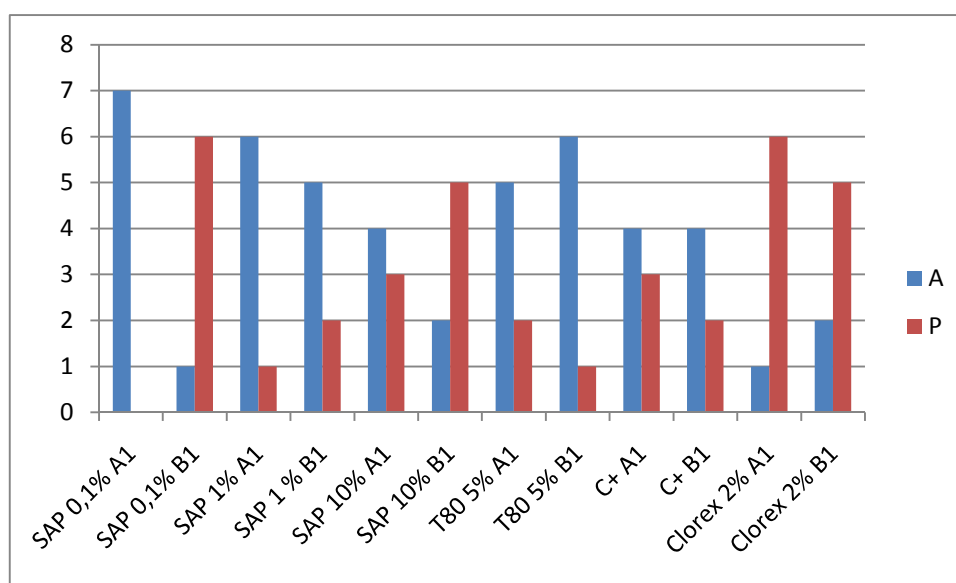


Gráfico 10 - Presença (P) ou Ausência (A) de vasos sanguíneos congestos nos subgrupos na distal.

4.1.5 Reabsorções Dentárias

Na tabela 4, verifica-se em 30 dias maior incidência de reabsorções dentárias nos subgrupos IV (T80 a 5% B1), V (C+ B1) e VII (Clorex 2% B1) enquanto que os subgrupos

tratados com própolis (SAP 0,1% B1, SAP 1% B1 e SAP 10% B1) tiveram menor incidência que os grupos anteriormente citados. Entre as concentrações de própolis testadas, o subgrupo I (SAP 0,1% B1) apresentou a menor frequência de reabsorção dentária (gráfico 11).

GRUPOS		I		II		III		IV		V		VII		Total	P-valor 15 Dias (A1)	P-valor 30 Dias (B1)
VARIÁVEIS		SAP 0,1% A1	SAP 0,1% B1	SAP 1% A1	SAP 1% B1	SAP 10% A1	SAP 10% B1	T80 5% A1	T80 5% B1	C+ A1	C+ B1	Clorex 2% A1	Clorex 2% B1			
RD	A	3	6	1	4	2	4	0	1	4	2	2	1	30	0.2906	0.0445*
	P	4	1	6	3	5	3	7	6	3	5	5	6			

P-Valor: Teste Exato de Fisher Generalizado para tabelas r x c. *O valor em negrito indica diferença estatística. RD: Reabsorções dentárias. SAP: Suspensão aquosa de própolis. T80: Tween 80. C+: Grupo controle positivo. Clorex: Grupo Clorexidina. A: Ausente. P: Presente.

Tabela 4 - Cruzamento entre Reabsorção Dentária com os Subgrupos.

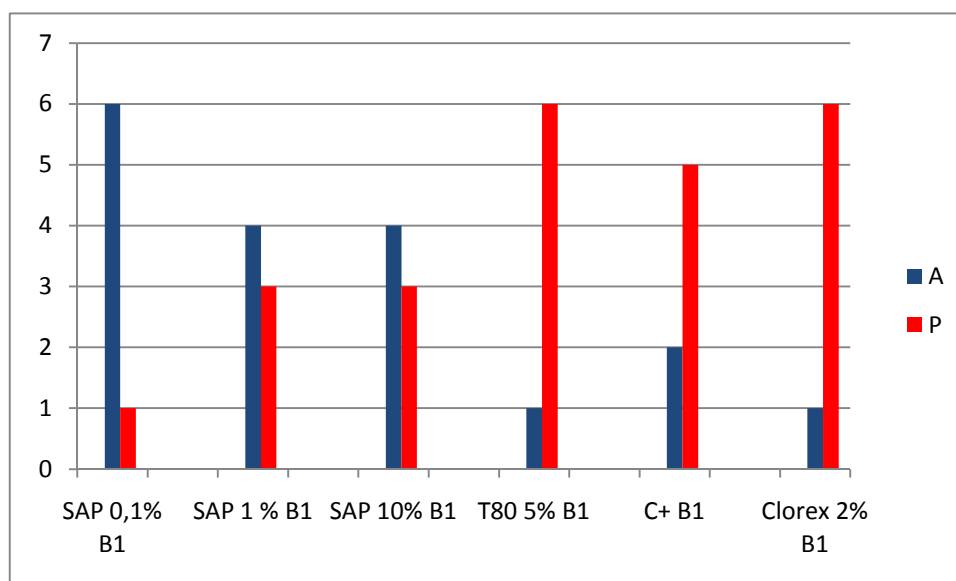


Gráfico 11 – Presença (P) ou ausência (A) de Reabsorções Dentárias nos subgrupos com sacrifício em 30 dias.

4.1.6 Outras observações

O teste exato de Fisher não revelou diferença estatística significativa para a presença ou ausência de Restos Epiteliais de Malassez, Sequestro ósseo e Osteoclastos, assim como

também para o infiltrado inflamatório no ligamento periodontal, quando comparado às substâncias testadas.

Em relação aos tecidos epiteliais a principal alteração observada foi a presença de exocitose e principalmente no tecido epitelial juncional. Na região de furca o epitélio de bolsa (EBF) quando presente se mostrou com exocitose.

Também deve ser observado que a face mesial do 1º molar inferior nos ratos é uma face livre e portanto mais fácil de autolimpeza. Assim sendo, na região mesial encontrou-se menos exocitose que na região distal. A região distal por sua vez apresenta naturalmente maior acúmulo de biofilme e portanto maior exocitose que a região mesial, assim como também maior infiltrado inflamatório que a região mesial após a indução da doença periodontal.

Este fato correlaciona-se com os resultados da presença ou ausência do biofilme. No grupo VI, sem indução da doença, observou-se histologicamente ausência de biofilme. Nos grupos induzidos a doença e tratados observou-se que em 15 dias o menor índice de biofilme foi a suspensão de própolis a 0,1% entretanto em 30 dias foi a clorexidina a 2%. Analisando os dois períodos de tempo a suspensão de própolis a 0,1% apresentou os menores índices de biofilme (Apêndice C).

4.2 Grupo VI (controle negativo)

Para o grupo VI optou-se em fazer apenas uma descrição das características histológicas do padrão de normalidade dos tecidos periodontais do rato, visto que são poucas as informações encontradas na literatura.

Não foi observado perda óssea significativa na região furca e o nível ósseo apresentou-se entre o terço cervical e médio com tendência para o terço médio na região mesial e tendência para o terço cervical na região distal (tabela 5).

Na região mesial predominou ausência de infiltrado inflamatório (figura 23) enquanto na região distal 50,0% dos casos apresentaram infiltrado inflamatório moderado (figura 24) e 29,8% infiltrado inflamatório leve (tabela 6), com igual distribuição de células mononucleares e polimorfonucleares e distribuição focal.

Os tecidos epiteliais gengival, sulcular e juncional da região distal apresentavam exocitose. Na região mesial, apenas o epitélio juncional apresentou-se com exocitose.

No tecido conjuntivo subepitelial predominantemente encontrou-se fibras gengivais densas na região mesial e na região distal fibras gengivais densas e vasos congestos (figura 24). Na região de furca, um único caso avaliado apresentava fibras moderadas (tabela 7).

Sequestro ósseo e osteoclastos não foram observado em 100% dos dentes. Em 96,4% não encontramos Restos epiteliais de Malassez e, em 97,6% não foi encontrado reabsorções dentárias.

Em relação à descrição histológica do grupo VI, descrição com características semelhante foi realizada por Rodini (2005).

Comparando os resultados dos grupos experimentais com o grupo VI (controle negativo) verificou-se que mesmo com a indução da doença periodontal, o período de 15 dias de indução não foi suficiente para promover destruição óssea estatisticamente significativa na região mesial onde continuou predominando o nível ósseo na região do $\frac{1}{3}$ médio. Contudo, na região distal, a perda óssea foi mais significativa e o nível ósseo deslocou-se da região do $\frac{1}{3}$ cervical para a região do $\frac{1}{3}$ médio e sem diferença estatística significativa entre os grupos.

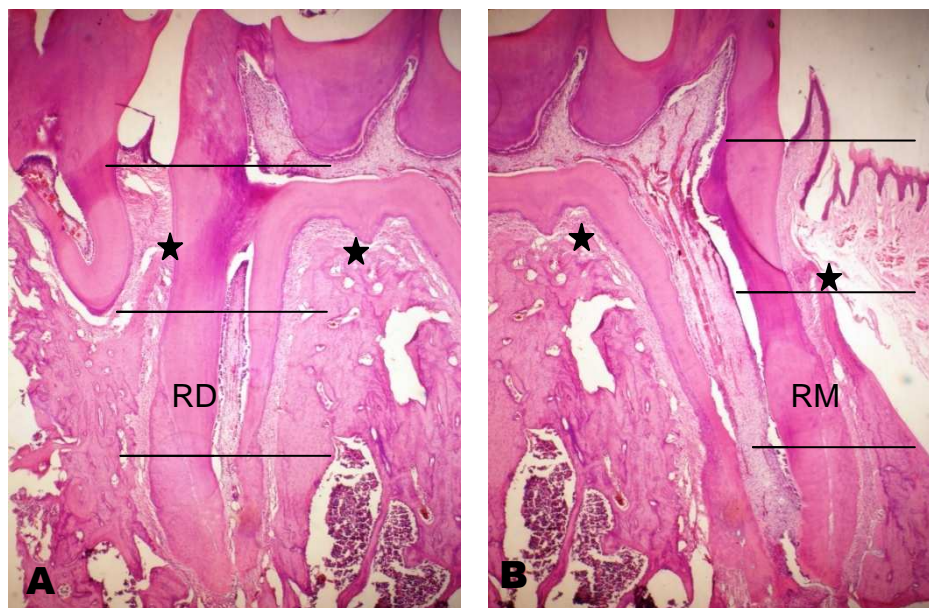


Figura 22 – Exemplo de dente do grupo VI mostrando nível ósseo na mesial e distal no terço cervical. A. Raiz distal (RD). B. Raiz mesial (RM). ★ nível ósseo. (H.E. 40x).

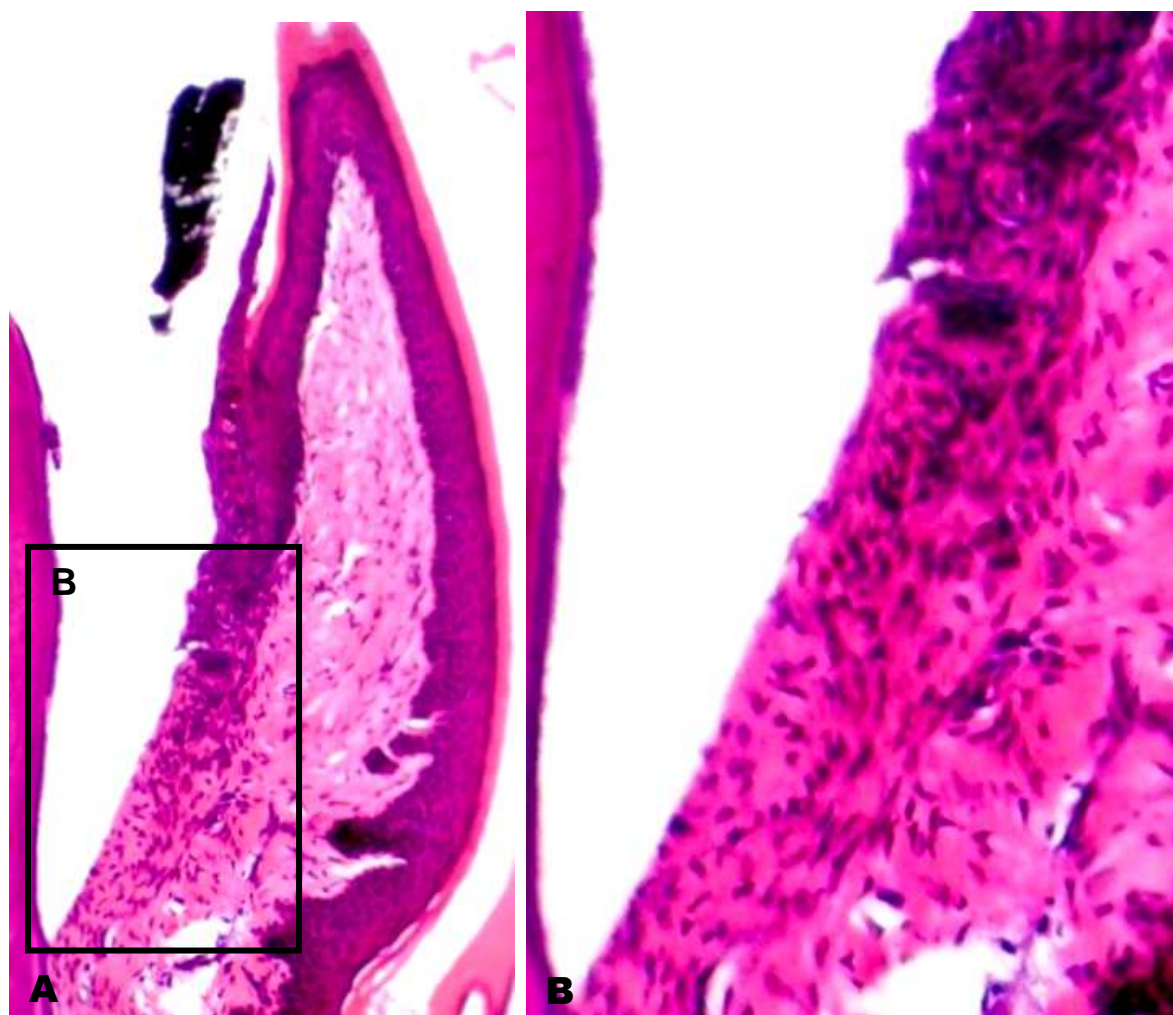


Figura 23 - A. Mesial (H.E. 200x). B. Região do retângulo aumentada sem exocitose, fibras gengivais densas e ausência de infiltrado inflamatório (H.E. 400x).

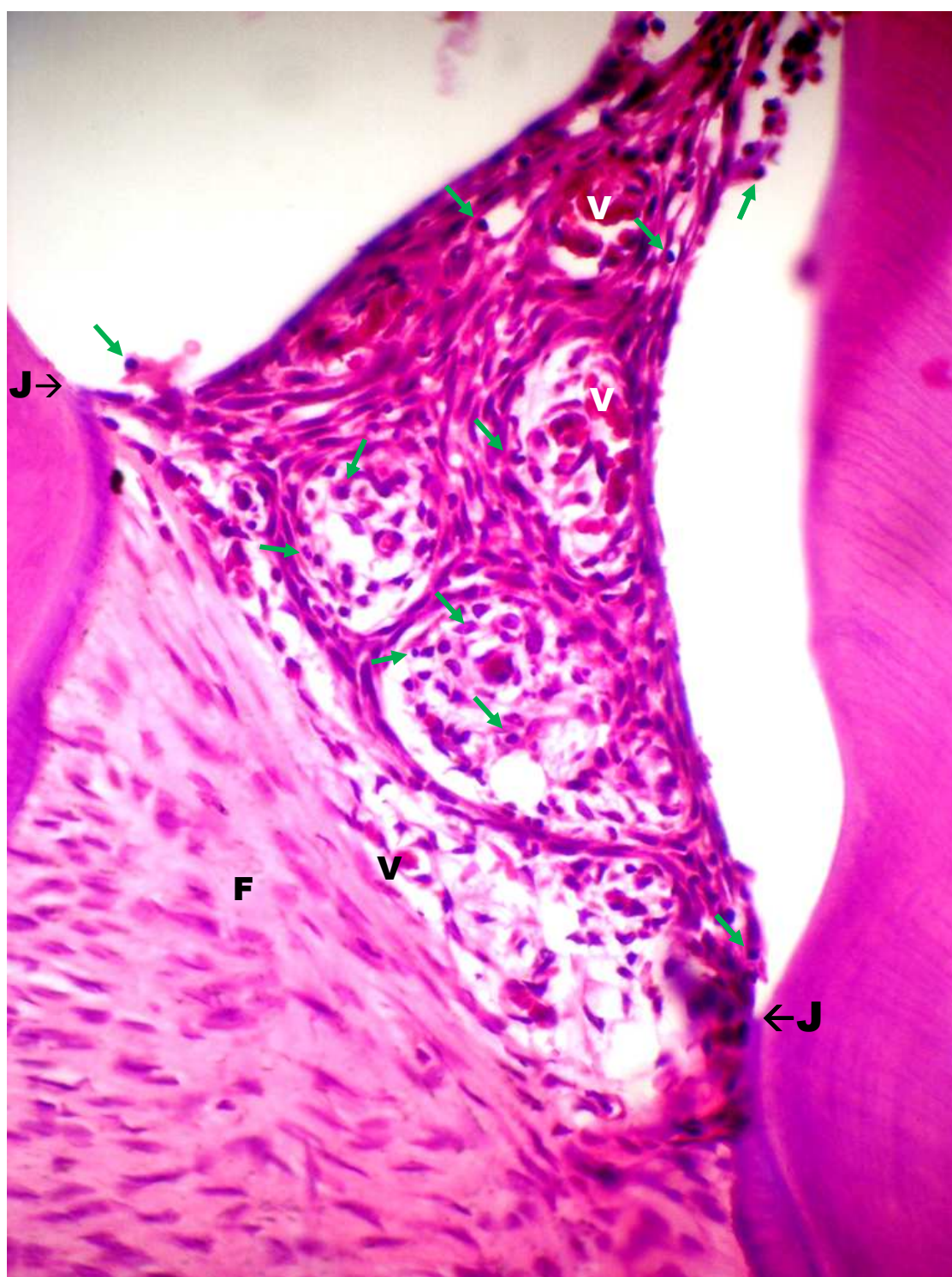


Figura 24 - Distal de dente do grupo VI mostrando epitélios com exocitose, fibras gengivais densas (F), vasos sanguíneos congestionados (V) e infiltrado inflamatório moderado com células mononucleares e polimorfonucleares (setas). Junção cimento-esmalte (J) (H.E. 400x).

	Sem perda óssea	Osso no 1/3 cervical	Osso no 1/3 médio	Osso no 1/3 apical	Perda óssea total	Total
Mesial	-	22 (26,2%)	53 (63,1%)	-	-	84 (100%)
Furca	83 (98,8%)	1 (1,2%)	-	-	-	84 (100%)
Distal	-	56 (66,7%)	25 (29,8%)	1 (1,2%)	2 (2,4%)	84 (100%)
TOTAL	83	79	78	1	11	252

Tabela 5 - Frequência de perda óssea no grupo VI.

	Sem infiltrado	Infiltrado Inflamatório Leve	Infiltrado Inflamatório Moderado	Infiltrado Inflamatório Intenso	Não avaliado	Total
Mesial	63 (75%)	16 (19%)	3 (3,6%)	-	2 (2,4%)	84 (100%)
Furca	1 (1,2%)	-	-	-	83 (98,8%)	84 (100%)
Distal	16 (19%)	25 (29,8%)	42 (50%)	1 (1,2%)	-	84 (100%)
Total	80	41	45	1	85	252

Tabela 6 - Frequência da intensidade do infiltrado inflamatório no grupo VI.

	Fibras Densas	Fibras Moderadas	Não avaliadas	Total
Mesial	56 (66,7%)	26 (31%)	2 (2,4%)	84 (100%)
Furca	-	1 (1,2%)	83 (98,8%)	84 (100%)
Distal	60 (71,4%)	24 (28,6%)	-	84 (100%)
Total	116	51	85	252

Tabela 7 - Frequência de tipo de fibras gengivais no grupo VI.

CONCLUSÕES

- 1.** Analisando comparativamente os resultados pode-se sugerir que a suspensão de própolis para tratamento da doença periodontal inflamatória induzida demonstrou-se eficiente, principalmente se considerarmos a resposta inflamatória em curto prazo (15 dias), associada a presença de fibras gengivais densas, vasos sanguíneos sem congestão, ausência de reabsorções dentárias e perdas ósseas.
- 2.** Entre as concentrações testadas, a suspensão aquosa de própolis a 0,1% apresentou melhor resultado e pode ser uma alternativa futura de tratamento da doença periodontal necessitando de estudos futuros para demonstrar a viabilidade biológica de sua utilização como coadjuvante na terapêutica periodontal.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, S.M., et al. Composição química de *Baccharis drancunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 909-915, 2005.

ALMEIDA, R.V.D., et al. Efeito clínico de solução anti-séptica à base de própolis em crianças cárie ativas. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, v.6, n.1, p. 87-92, 2006.

ANDREA, M. V.; COSTA, C. N.; CLARTON, L. Própolis na cura e prevenção de doenças? pode ser uma boa alternativa! **Bahia agrícola**, Manhauçu, v. 7, n. 1, p. 19-21, set. 2005.

ASSIS, M. Los productos de colmena. **Centro de Informacion e Documentacion Agropecuário**, Havana, p.68, 1988.

BANSKOTA, A.H.; TEZUCA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytoterapy Research**, v.15, n.7, p.561-571, 2001.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. On the chemical composition of some propolis fractions with antiviral action. **Acta Microbiologica Bulgarica**, v. 23, p.52-57, 1998.

BANKOVA, V., et al. Determination of fenolic from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v.607, p.150-153, 1992.

BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N.L. A study of flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**, v.46, p.471-474, 1983.

BORRELLI, F et al. Phytochemical compounds involved in the inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia** v.73, p.53-63, 2002.

BRUSCHI, M.L.; PANZERI, H.; LARA, E.H.G. Progressos recentes na pesquisa da utilização de própolis em periodontia. **Revista ABO Nacional**, São Paulo, v.13, n.2, p. 86-91, 2005.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.347-363, 1998.

CARGNELUTTI, T. **Estudo comparativo da influência da terapia fotodinâmica antimicrobiana e remoção mecânica de biofilme no processo inflamatório periodontal induzido em Hamsters**. 2007. 54p. Dissertação (Mestrado profissional em Lasers em odontologia), Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, São Paulo, 2007.

CARRANZA, F.A.; NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.H. **Periodontia clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CAVAGNI, J et al. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Brazilian Oral Research**. v.19, n.4, 2005.

CONAPIS. Própolis poderoso antibiótico natural têm vários efeitos terapêuticos. Disponível em: <<http://www.conapis.com.br>>. Acesso em: 25 de out. 2008.

DAUGSCH, A. et al. Própolis Vermelha e sua origem botânica, Disponível em: <www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo/htm>. Acesso em: 25 de out. 2008.

DOKU, H.C.; SHKLAR, G.; BUGBEE, B. The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, St. Louis : Mosby-Year Book, v.22, n.5, p.569-77, 1966.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Quimioterápicos**. 3. ed. São Paulo: Organização Andrei Editora, 1977, p.668-669.

FERNANDES, M.I. et al. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Brazilian Oral Research**, v.21, n.3, 2007.

GALVÃO, M.P.A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v.17, n.1, pp. 56-62, 2003.

FIHEN, N.E.; KLAUSEN, B.; EVANS, R.T. Periodontal bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous *Streptococcus sanguis*. **Journal of Periodontal Research**, v.27, n.6, p.609-14, 1992.

GARCIA, C.L., GARGUERA, E.G. Efectos del propolan en el tratamiento de aftas bucales. **Revista Cubana de Medicina Militar**, v. 22, n. 1, p.42-45, 1993.

GEBARA, E.C.E.; LIMA, L.A.; MAYER, M.P.A.. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria Brazilian. **Journal of microbiology**, n.33, p.365-369, 2002.

GEBARA, E.C.E. Propolis extract as adjuvant to periodontal treatment. In: CONGRESSO DO INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS, São Paulo, 2001.

GHISALBERTI, S.L. Própolis: a review. **Bee World**. v.60, p. 59-84, 1979.

GOMES, R. T. et al. Antimicrobial activity of a própolis adhesive formulation on different oral pathogens. **Brazilian Journal Of Oral Sciences**, v.6, n.22, p.1387-1391, 2007.

GONÇALVES, P.F. et al. Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis - a study in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n.1, 2003.

GONSALES, G.Z. , et al. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.12, n.2, p.276-284, 2006.

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

GYÖRFI, A. et al. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. **Journal of Clinical Periodontology** v.21, n.9, p.601-5, 1994.

IKENO, K.; IKENO, P.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Research**, v. 25, p. 347-351, 1991.

IRVING, J.T.; SOCRANSKY, S.S.; TANNER, A.C.R. Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with Gram-negative organisms. **Journal of Periodontal Research**, v.13, n.4, p.326-332, 1978.

ISHIDA, V.F.C. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos etanólicos de Propólis frente a culturas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius*.** 2006. 103p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological evaluation of dental materials. Genève, 1984. 54p. (Technical Report 7405).

JOHNSON, I.H. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. **Journal of Periodontal Research**, v.10, n. 6, p.332-45, 1975.

KONISHI, S. Et al. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem doce, 2004**. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/75/artigo.html>>. Acesso em: 25 de dez. 2009.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationships in the gingival of rat and man. **Journal of Periodontology**. v.46, n.11, p.677-80, 1975

LONGHINI, R. , et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.388-395, 2007.

MAGRO FILHO, O.; PERRI DE CARVALHO, A.C. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. **Journal of Nihon University School of Dentistry**, v. 32, p.4-13, 1990.

MANARA, L.R.B.; ANCONI, S.I. Utilização da própolis em odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v.7, n.3/4, p.15-20, 1999.

MARCUCCI, M.C., et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p.105-112, 2001.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. v.26, p.83-99, 1995.

MARKHAM, R.K. , et al. HPLC and CG-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**. v.42, n.1, p.205-211, 1996.

MARTINEZ SILVEIRA, G. , et al. Efectos curativos de una solución hidroalcohólica del propóleo cubano al 1,5% en la terapéutica periodontal. **Revista Cubana de Estomatología**, v.29, n.1, p.14-19, 1992.

MARTINEZ SILVEIRA, G. , et al. Estudio preliminar sobre los efectos del propolán en el tratamiento de la gingivitis crónica y de las úlceras bucales. **Revista Cubana de Estomatología**, v.25, n.3, p.33-44, 1988.

NIKOLAEV, A.B. Defending the bee town. In: A remarkable hive product: propolis. **Apimondia**, Bucaresta, p.10, 1978.

OTA, C. et al. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**. v. 44, p.375-378, 2001.

PARK, Y.K., et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Cur. Microbiol.**, v.34, p.24-28, 1998.

PARK, Y.K. , et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y.K. , et al. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.38, p.1253-1259, 1995.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CONTADO, J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.40, p.97-106, 1997.

PROKOPOVICH, N.N. propolis a new anaesthetic. **Vrach Delo**, v. 10, p.1077-1080, 1957.

RAMOS A.F.N.; MIRANDA J.L. propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.13, n.4, p.697-710, 2007.

RATEITSCHAK, K.H.; EDITH, M.; WOLF, H.F. **Periodontia**. 3. ed. Rev. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ROBINSON, M.; HART, D.; PIGOTT, G. H. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. **Lab. Anim.** v.25, n.3, p.247-53, 1991.

RODINI, C.O. **Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9.** 2005.149p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – patologia bucal), Faculdade de Odontologia de Baurú, Universidade de São Paulo, Baurú, 2005.

SBCAL. **Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório.** (Legislação). Disponível em: < <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=legislação>>. Acesso em: 20 de abr. 2009.

SCHMITD, L.B. **Avaliação radiográfica da reabsorção óssea periodontal por meio de valor de pixel e comparação com análise histopatológica.** 2005. 98p. Dissertação (Mestrado em odontologia – estomatologia), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

SILVA, E.B. et al. Efeito da ação da própolis na lâmina própria da mucosa bucal de ratos: estudo. **ROBRAC.** v. 9, n. 28, p.4-8, 2000.

SPERANÇA, P.A. et al. Verificação da atividade antimicrobiana de soluções a base de própolis, sobre microbióta oriunda de bolsas periodontais – estudo *in vitro*. **Periodontia.** Rio de Janeiro, v.17, n.4, p. 54-59, 2007.

TOKER, H., et al. A morphometric and histopatologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology.** v.79, n.6, p. 1089-1094, 2008.

VARGAS, A.C., et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato alcoólico de própolis, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

WOLLENWEBER, E., BUCHMANN, S.L. Feral honeybees in the Sonoram Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.), **Z. Naturforsch.** v.52C, n.7-8, p.530-535, 1997.

YAGHOUBI, S.M.J. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition, **DARU**, v.15, n.1, 2006.

APENDICE A – Fluxograma das atividades e etapas experimentais

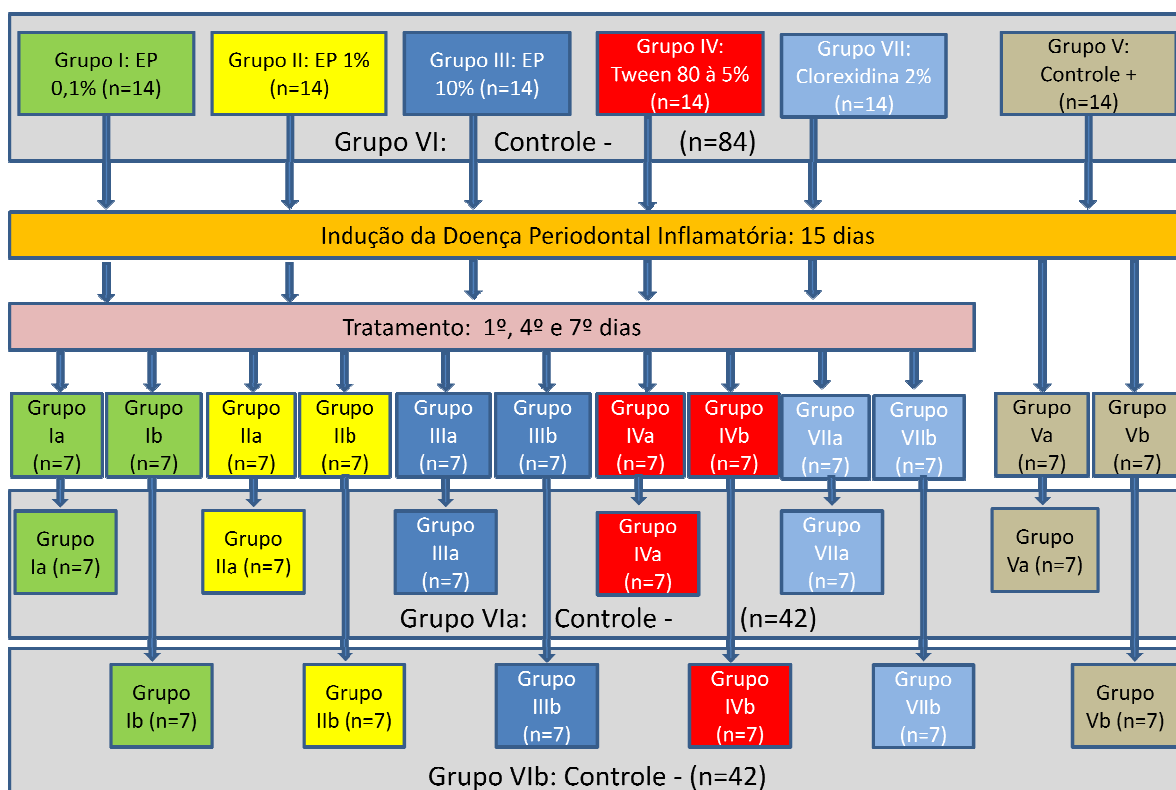


Figura 25 – Fluxograma das atividades e etapas experimentais.

APENDICE B – Clivagem das peças

Durante a descalcificação das peças com a utilização da Solução de Morse (50% de solução de citrato de sódio à 20% e 50% de ácido fórmico a 100%), por volta do 3º e 4º dia as peças foram testadas para verificar o quanto já haviam sido descalcificadas, através da introdução de uma agulha, onde a mesma deveria atravessar o tecido ósseo sem resistência. Quando as peças atingiram um bom estado de desmineralização, o que ocorria por volta do 4º dia, as mesmas poderiam ser clivadas.

A clivagem das peças consistiu em 4 cortes sequenciais para cada peça como descrito a seguir:

1. Um corte na distal do 1º molar, ao centro do 2º molar no sentido vestibulo-lingual (figuras 26A e 26B);
2. Um corte na vestibular no sentido mesio-distal, que serve para eliminação de todo o tecido gengival da vestibular (figura 26C e 26D);
3. Um corte na mesial do 1º molar no sentido vestibulo-lingual (figura 26E e 26F);
4. Um corte na transversal do longo eixo do dente, na base da peça, no sentido mesio-distal eliminando metade do dente incisivo (figura 26E e 26F).

Após a clivagem as peças foram marcadas com tinta nanquim em sua porção lingual e recolocadas em cassetes previamente identificados e retornaram para a solução de Morse para aguardar o final da descalcificação.

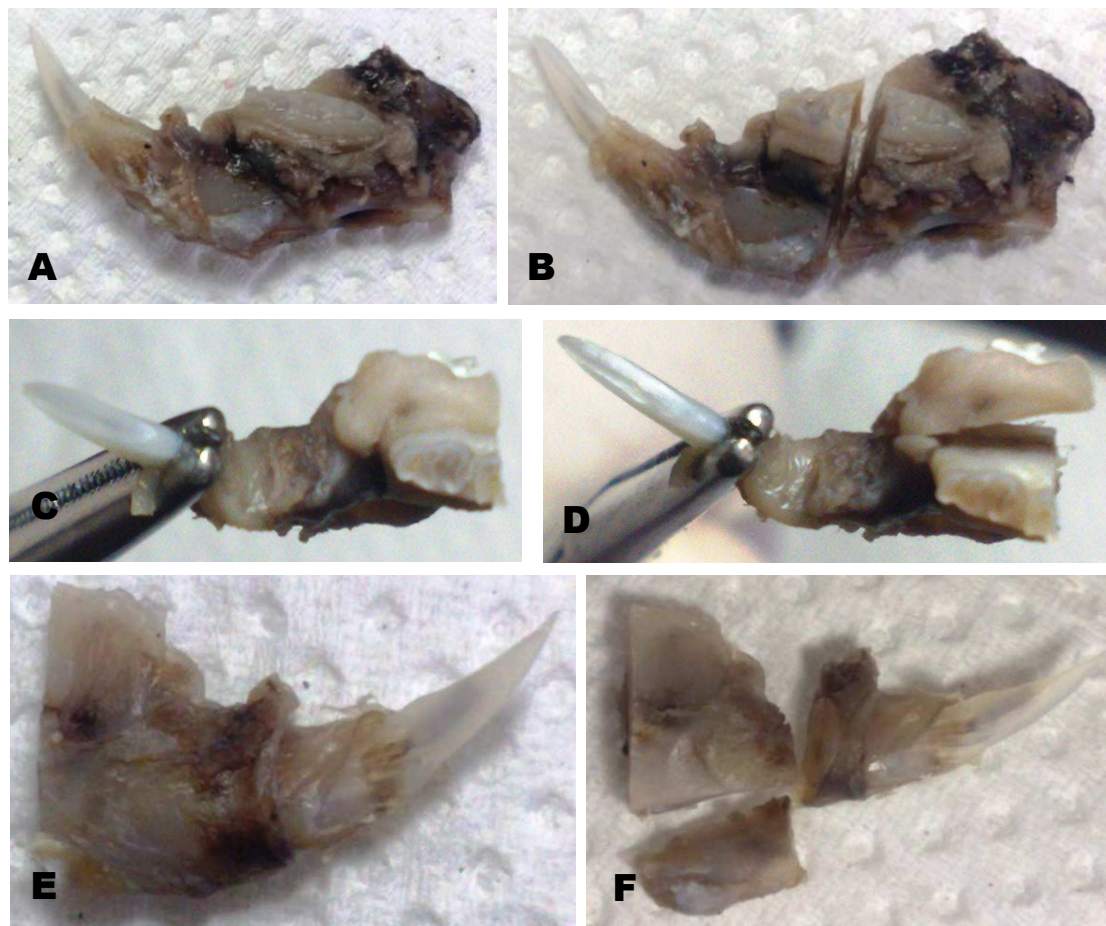


Figura 26 – Clivagem: (A) Antes do 1º corte, (B) após 1º corte e fragmento distal a ser eliminado, (C) antes do 2º corte, (D) após 2º corte e fragmento vestibular a ser eliminado, (E) antes do 3º e 4º corte e (F) após 3º e 4º corte e fragmentos mesial e apical a serem eliminados.

APÊNDICE C – Biofilme

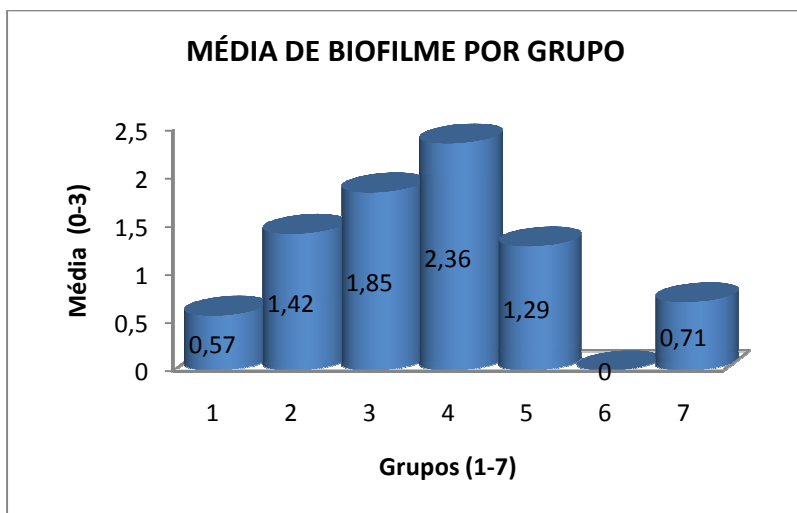


Gráfico 12 – Média do Biofilme por grupo experimental.

Analisando o gráfico 12 por grupos experimentais, verifica-se que não existe a presença de Biofilme no grupo VI (grupo controle negativo), o grupo com menor média de Biofilme é o grupo I (SAP a 0,1%) e o grupo com maior média de biofilme é o grupo IV (Tween 80 a 5%).

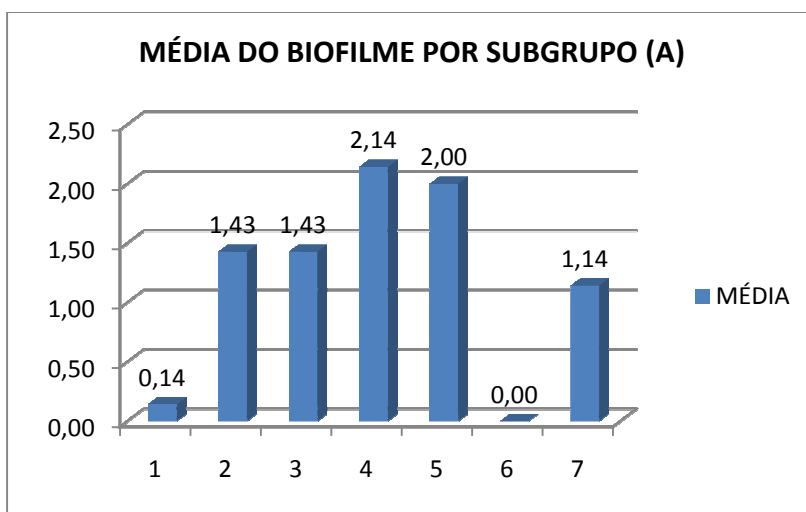


Gráfico 13 – Média do Biofilme do por subgrupo no período de 15 dias.

Analisando a presença de Biofilme no período de 15 dias dos tratamentos, verifica-se também que não existe a presença de Biofilme no grupo VI (grupo controle negativo), o grupo com menor média de Biofilme é o grupo I (SAP a 0,1%) e o grupo com maior média de biofilme é o grupo IV (Tween 80 a 5%).

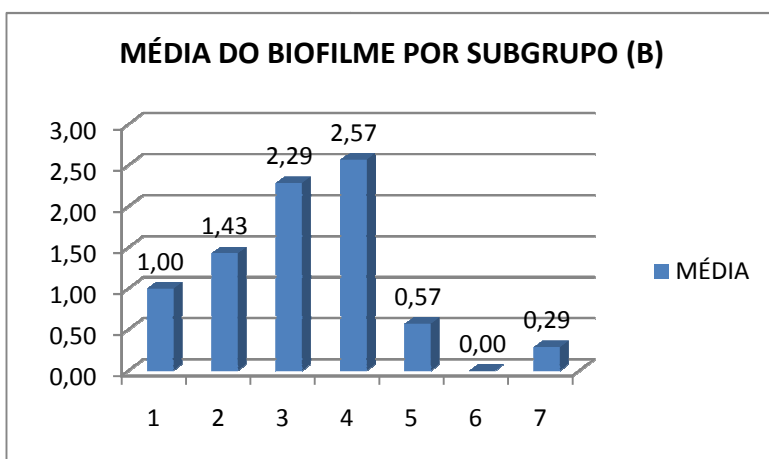


Gráfico 14 - Média do Biofilme por subgrupo no período de 30 dias.

Analisando a presença de Biofilme no período de 30 dias dos tratamentos, verifica-se também que não existe a presença de Biofilme no grupo VI (grupo controle negativo), o grupo com menor média de Biofilme é o grupo VII (Clorexidina a 2%) e o grupo com maior média de biofilme é o grupo IV (Tween 80 a 5%).

Continuação da tabela 8:

INFILTRADO INFLAMATÓRIO									LIGAMENTO PERIODONTAL (INFILTRADO INFLAM.)			RESTOS EPIT. DE MALASSEZ	REABSORÇÃO DENTÁRIA	PERDA ÓSEA			SEQUESTRO ÓSSEO	OSTEOCLÁSTOS
Mesial			Furca			Distal								Mesial	Furca	Distal		
INT.	QUAL.	DISTR.	INT.	QUAL.	DISTR.	INT.	QUAL.	DISTR.	INT.	QUAL.	DISTR.							
INTENSIDADE: 0=AUSENTE 1=LEVE 2=MODERADO 3=INTENSO			QUALIDADE: A=AGUDO C=CRÔNICO M=MISTO			DISTRIBUIÇÃO: F=FOCAL D=DIFUSO			SCORES = DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO			P=PRESENTE A=AUSENTE		C=1/3 CERVICAL M=1/3 MÉDIO A=1/3 APICAL T=PERDA TOTAL SP=SEM PERDA			P=PRESENTE A=AUSENTE	

INT.= Intensidade, QUAL.=Qualidade e DISTR.=Distribuição

Tabela 9 – Tabela utilizada no exame histopatológico (2ª parte).

APENDICE E – Comitê de Ética em Pesquisa Animal

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
	COMPROVANTE DE PROTOCOLIZAÇÃO
Comprovante: Abertura de Processo	Emissão: 10/09/2009
Número do Processo : 23105.021549/2009	
Data de Abertura : 10/09/2009	Hora : 30/12/1899 10:27:32
Documento Origem :	
Procedência : 1.00.15.00.00.00.00.00 - Comitê de Ética em Pesquisa	
Interessado : 2080172 - SAMUEL LUNGAREZE	
Tipo de Documento: Ofício	
Assunto : 1.0.0.00.00.0 :- Administração Geral	
Resumo Assunto : Solicitação de cadastro no Comitê de Ética e Pesquisa em Animais	


Assinatura

10º 109 109

12:20:

Figura 27 – Protocolo de inscrição no Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da UFAM.