UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

**ARTHUR MICHELLIM KIRASUKE**

# EFETIVIDADE DA INSTRUMENTAÇÃO SUPRA E SUBGENGIVAL ASSOCIADA À IRRIGAÇÃO COM NANOPRÓPOLIS VERDE NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS SOB TERAPIA COM ZOLEDRONATO

Araçatuba - SP
2026

**ARTHUR MICHELLIM KIRASUKE**

# EFETIVIDADE DA INSTRUMENTAÇÃO SUPRA E SUBGENGIVAL ASSOCIADA À IRRIGAÇÃO COM NANOPRÓPOLIS DE VERDE NO TRATAMENTO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS SOB TERAPIA COM ZOLEDRONATO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador(a): Prof. Dr. Edilson Ervolino

Araçatuba - SP
2026

Dedico este trabalho a todos que estiveram comigo neste ciclo tão importante, sempre me ajudando, diretamente e indiretamente, para que este sonho fosse concretizado...

# AGRADECIMENTOS

Inicialmente, à minha família: meu pai, Marcos; minha mãe, Alessandra e minha irmã, Giovanna. Por tornarem tudo isso possível; por sempre me apoiarem e me ajudarem em todas as ocasiões que eu precisei; por serem meu alicerce durante todos estes anos de graduação, mesmo estando a muitos quilômetros de distância.

À Ana Luiza, minha namorada, por ser a minha parceira do dia a dia, o meu alicerce e o meu porto seguro aqui em Araçatuba, sempre me apoiando, me ajudando e me orientando sempre.

A toda a banca, por ter aceitado o meu convite, mas em especial ao professor Edilson, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar iniciação científica durante todos estes anos, me permitindo, com isso, conhecer esta outra vertente da faculdade.

À família ZOL por todo o auxílio, por toda a ajuda, pela parceria e por todas as risadas em todos os experimentos, os quais sempre foram feitos de forma séria, mas, ao mesmo tempo, de forma descontraída.

À República Mamonas e a cada morador que eu convivi: por ser a minha casa em Araçatuba todos estes anos; por ser minha a família de outra cidade e por todos os momentos inesquecíveis vividos no dia a dia.

A todas as amizades que eu conheci durante todos estes anos da graduação: da sala, da carona e de outras turmas. Obrigado por todos estes anos, os quais tiveram momentos com muitas risadas, diversão e de descontração.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA – UNESP) por todas as experiências proporcionadas pela instituição durante todos estes anos de graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa (processo 120442/2023-0).

“Cada adversidade traz consigo a semente de um benefício equivalente”

Napoleon Hill, 1937

# RESUMO

Kirasuke, A. M. **Efetividade da instrumentação supra e subgengival associada à irrigação com nanoprópolis verde no tratamento da periodontite experimental em ratos sob terapia com zoledronato**. 2026.Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

O intuito deste estudo foi avaliar a efetividade e a segurança do uso local das nanopartículas lipídicas contendo própolis verde como uma terapia adjuvante à instrumentação supra e subgengival (ISSG) no tratamento da periodontite experimental (PE) em ratas ovariectomizadas tratadas com zoledronato. Vinte e quatro ratas Wistar (6 meses) foram utilizadas no estudo. Sessenta dias antes do início do experimento, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. No dia 0, foi instalada uma ligadura de algodão ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, para que a PE fosse induzida. Da primeira até a sexta semana, foi efetuada o tratamento com zoledronato (100µg/Kg), a cada quatro dias, por via intraperitonial. Após duas semanas, a ligadura foi removida e as ratas foram distribuídas, aleatoriamente, nos grupos: ZOL-NTL, ZOL-ISSG e ZOL-ISSG-PVnpl. No grupo ZOL-NTL não foi realizado nenhum tratamento local. No grupo ZOL-ISSG foram realizadas a ISSG e irrigação com solução salina fisiológica. No grupo ZOL-ISSG-PVnpl foram realizadas ISSG e irrigação com nanopartículas lipídicas com própolis verde. Foi realizada uma única sessão de ISSG e quatro sessões de irrigação com as soluções citadas, imediatamente após a ISSG e após 2, 4 e 6 dias deste procedimento. As ratas foram submetidas à eutanásia 28 dias após a remoção das ligaduras. As hemimandíbulas foram processadas para possibilitar que, na região do periodonto associado ao primeiro molar inferior, fossem realizadas: análise histológica do processo de reparação dos tecidos; análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo na região de furca (PTOF) e da porcentagem de tecido ósseo não vital na região de furca (PTONV); e análise imunohistoquímica para detecção de TNFα, IL-1β e TRAP. Nos grupos ZOL-NTL e ZOL-ISSG, a PE apresentou curso desfavorável. A perda óssea alveolar no grupo ZOL-RAR-PVnpl foi menor em relação aos demais. O grupo ZOL-ISSG-PVnpl apresentou maior volume ósseo e maior PTOF em relação aos demais. A PTONV e a imunomarcação para TNFα e IL-1β no grupo ZOL-ISSG-PVnpl foram

menores em relação aos demais grupos. A quantidade de células TRAP-positivas não apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais. Concluiu-se que a irrigação com nanopartículas com própolis verde se mostrou efetiva e segura como terapia adjuvante à ISSG no tratamento da PE em ratas ovariectomizadas tratadas com zoledronato.

**Palavras-chave:** Periodontite; Própole; Raspagem dentária; Nanopartículas.

# ABSTRACT

Kirasuke, A. M. **Effectiveness of supra and subgingival instrumentation associated with Irrigation with green propolis nanoparticles in the treatment of experimental periodontitis in rats under zoledronate therapy.** 2026. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2026.

The aim of this study was to evaluate the effectiveness and safety of the local use of lipid nanoparticles containing green propolis as an adjunctive therapy to supra- and subgingival instrumentation (SSI) in the treatment of experimental periodontitis (EP) in ovariectomized female rats treated with zoledronate. Twenty-four Wistar female rats (6 months old) were used in the study. Sixty days before the beginning of the experiment, the rats underwent bilateral ovariectomy. On day 0, a cotton ligature was placed around the lower left first molar to induce EP. From the first to the sixth week, treatment with zoledronate (100 μg/kg) was administered every four days via the intraperitoneal route. After two weeks, the ligature was removed, and the rats were randomly assigned to the following groups: ZOL-NTL, ZOL-SSI, and ZOL-SSI-GPnpl. No local treatment was performed in the ZOL-NTL group. In the ZOL-SSI group, SSI and irrigation with physiological saline solution were performed. In the ZOL-SSI-GPnpl group, SSI and irrigation with lipid nanoparticles containing green propolis were performed. A single session of SSI and four irrigation sessions with the aforementioned solutions were carried out immediately after SSI and at 2, 4, and 6 days following this procedure. The rats were euthanized 28 days after ligature removal. The hemimandibles were processed to enable the following analyses in the periodontal region associated with the lower first molar: histological analysis of the tissue repair process; histometric analysis of the percentage of bone tissue in the furcation region (PBTF) and the percentage of non-vital bone tissue in the furcation region (PNVBT); and immunohistochemical analysis for the detection of TNFα, IL-1β, and TRAP. In the ZOL-NTL and ZOL-SSI groups, EP showed an unfavorable course. Alveolar bone loss in the ZOL-RAR-GPnpl group was lower compared with the others. The ZOL-SSI-GPnpl group showed greater bone volume and higher PBTF compared with the other groups. PNVBT and immunolabeling for TNFα and IL-1β in the ZOL-SSI-GPnpl group were lower than in the other groups. The number of TRAP-positive cells did not show a statistically significant difference among the experimental groups. It was concluded

that irrigation with green propolis nanoparticles proved to be effective and safe as an adjunctive therapy to SSI in the treatment of EP in ovariectomized female rats treated with zoledronate.

**Keywords:** Periodontitis; Propolis; Dental scaling; Nanoparticles.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental e principais procedimentos operatórios 19
Figura 2 – Caracterização das nanopartículas de própolis verde 28
Figura 3 – Aspecto microtomográfico do periodonto de inserção relacionado com o primeiro molar inferior 29
Figura 4 – Tecido ósseo na região de furca do primeiro molar inferior 30
Figura 5 – Imunomarcação para TNFα e IL-1β da região de furca do primeiro molar inferior 32
Figura 6 – Imunomarcação para TRAP da região de furca do primeiro molar inferior 34

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros, escores e distribuição dos espécie de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos ZOL-NTL, ZOL-ISSG e ZOL-ISSG-PVnpl 35

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| ISSG | Instrumentação supra e subgengival |
| PE | Periodontite experimental |
| ONMM | Osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa |
| ZOL | Zoledronato |
| NTL | Nenhum tratamento local |
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| ATONV | Área Ocupada por Tecido Ósseo Não Vital |
| ATO | Área Ocupada por Tecido Ósseo |
| PTOV | Porcentagem de tecido ósseo na região de furca |
| PTONV | Porcentagem de tecido ósseo não vital na região de furca |
| JCE-COA | Distância da junção cemento-esmalte até a crista óssea alveolar |
| VOF-% | Volume ósseo na região de furca |
| Tb.N - mm² | Número de trabéculas no tecido ósseo da região de furca |
| Tb. Th-mm² | Espessura das trabéculas no tecido ósseo na região de furca |
| TNFα | Fator de necrose tumoral alfa |
| IL-1β | Interleucina 1 beta |
| TRAP | Fosfatase ácida resistente ao tartarato |

## SUMÁRIO


1 INTRODUÇÃO 13
2 OBJETIVO 15
3 MATERIAIS E MÉTODOS 15
3.1 PRÓPOLIS VERDE CARREADA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS 15
3.2 ANIMAIS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 16
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 17
3.4 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA 20
3.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS 21
3.6 PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO DAS AMOSTRAS 22
3.7 ANÁLISE DE DADOS 22
3.7.1 ANÁLISE DA CONDIÇÃO GERAL DE SAÚDE E EXAME CLÍNICO EXTRA E INTRABUCAL 22
3.7.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDO PERIODONTAIS 22
3.7.3 ANÁLISE HISTOMÉTRICA DA PTOF DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR 23
3.7.4 ANÁLISE HISTOMÉTRICA DA PTONV DA REGIÃO DE FURCA DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR 23
3.7.5 ANÁLISE DO PADRÃO DE IMUNO MARCAÇÃO PARA TNFα e IL-1β NA REGIÃO DE FURCA DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR 24
3.7.6 ANÁLISE DO PADRÃO DE IMUNOMARCAÇÃO PARA TRAP NA REGIÃO DE FURCA DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR 24
3.7.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 25
4 RESULTADOS 25

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS 25
LIPÍDICAS DE PRÓPOLIS VERDE 26
4.2 CONDIÇÕES GERAIS DE SAÚDE E EXAME INTRABUCAL 26
4.3 JCE, VOF, Tb.n e Tb.Th
4.4 ASPECTOS HISTOLÓGCIOS DOS TECIDOS PERIODONTAIS NOS 26
DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS 26
4.5 PTOF E PTONV
4.6 IMUNOMARCAÇÃO PARA TNFα e IL-1β NA REGIÃO DE FURCA DO 27
PRIMEIRO MOLAR INFERIOR
4.7 IMUNOMARCAÇÃO PARA TRAP NA REGIÃO DE FURCA DO 27
PRIMEIRO MOLAR INFERIOR
5 DISCUSSÃO 36
6 CONCLUSÃO 42
7 ANEXOS 47

# 1 INTRODUÇÃO

A osteonecrose dos maxilares associada à terapia medicamentosa (ONMM) se caracteriza com a presença de osso exposto, o qual não cicatriza, ou, também, com um osso que pode ser sondado por meio de uma fístula intra ou extraoral na região maxilofacial, a qual persiste por mais de oito semanas, em pacientes com tratamento prévio ou atual com medicamentos antirreabsortivos (Ruggiero SL et al., 2022). A sua etiopatogenia não é totalmente compreendida ainda. Entretanto, quando a ONMM é associada ao uso de medicamentos antirreabsortivos, como os bisfosfonatos, estudos sugerem o envolvimento da supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos, resultando em acúmulo de microdanos no tecido ósseo, a ação citotóxica sobre diferentes células, o efeito antiangiogênico, a disfunção da resposta imune-inflamatória local e o favorecimento a infecções (Kuroshima et al., 2019; Aghaloo et al., 2015; Ruggiero et al., 2014; Badel et al., 2013).

A presença da ONMM pode afetar consideravelmente a qualidade de vida do indivíduo e, se houver progressão da doença, pode haver inúmeras complicações. O seu tratamento ainda não possui um protocolo padrão que seja aceito universalmente, todavia, na maioria dos casos, a terapia escolhida pode ser cirúrgica e/ou medicamentosa. A terapia medicamentosa consiste, na maioria das vezes, no uso prolongado de agentes antimicrobianos, enquanto a terapia cirúrgica pode ir da conservadora à agressiva e é realizada desde a curetagem até a ressecção parcial dos maxilares (El-Rabbany et al., 2017; Hayashida et al., 2017; Khan et al., 2015).

A utilização de medicamentos antirreabsortivos, em especial nas doses oncológicas, se configura como o principal fator de risco sistêmico para a ONMM, o qual está, comumente, está associado a fatores de risco locais, como as exodontias. Ademais, estudos epidemiológicos apontam a doença periodontal (DP) como um segundo fator de risco local para a ONMM (Kuroshima et al., 2019; Mcgowan et al., 2018; Khan et al., 2017). Estudos confirmam a correlação entre a periodontite experimental e a ONMM (Araújo, 2017). Importante ressaltar o tratamento da periodontite no decorrer de um tratamento com drogas antirreabsortivas. O tratamento padrão para a periodontite é a instrumentação supra e subgengival (ISSG), responsável por remover os fatores retentivos de placa bacteriana e depósitos bacterianos (Kaldahl et al., 1993; Listgarten, 1975) e, de forma similar, estudos

experimentais em animais apontam que a ISSG é efetiva, também, no tratamento da PE (Fernandes et al., 2009). Há estudos os quais demonstraram a ocorrência de ONMM após o tratamento da periodontite com ISSG em pacientes sob tratamento com drogas antirreabsortivas (Diniz-Freitas et al., 2018; Braun & Iacono, 2006). Além disso, há estudos que reportaram que o tratamento da PE em ratos com a ISSG não alterou a perda óssea alveolar, entretanto, causou a exacerbação prolongada da resposta inflamatória local e, também, provocou o aumento da quantidade de tecido ósseo não vital no sítio tratado, o qual seria um quadro condizente com o estágio 0 da ONMM, possuindo as características histológicas da doença, mas sem as manifestações clínicas (Araújo, 2017). Sugerindo que seria ideal utilizar técnicas minimamente invasivas e capazes de assegurar efetividade e segurança ou utilizar terapias adjuvantes, principalmente aquelas capazes de exercer ação modulatória sobre o processo inflamatório local, ação antimicrobiana e efeito bioestimulatório sobre os tecidos periodontais.

Visto isso, a própolis tem sido utilizada como um tratamento adjunto ao tratamento mecânico convencional para a periodontite. Ela é um material resinoso, a qual é coletada a partir de abelhas de brotos e exsudatos das plantas, e misturada com pólen, cera e enzimas de abelhas. Sua composição varia, todavia, no geral, é composta por resina (50%), óleos aromáticos essenciais e cera (30%), secreção salivar de abelhas (10%), pólen (5%) e outras substâncias (5%) como bioflavonóides (Lustosa et al., 2008; Sonmez et al., 2005; Graikou et al., 2016). Ressalta-se que a composição da própolis varia de acordo com a origem fitogeográfica. No Brasil, em específico na região Sudeste, a própolis verde é coletada de Baccharis dracunculifolia.

O campo dos materiais nanoestruturados, o qual está em ascensão, pode incorporar novas características, como: melhor biodistribuição e maior atividade biológica a inúmeros compostos. Os biomateriais, como as nanopartículas, proporcionam propriedades físico-químicas únicas, em razão do seu pequeno tamanho, na qual se tem uma área de superfície grande em relação à massa, elevada reatividade e uma estrutura funcionalizante (Oliveira da Silva et al., 2023; Mercan et al., 2022; Boulaiz et al., 2011; Zhang et al., 2008). Os sistemas de nanocarreamento de princípios ativos, sendo do tipo microemulsão e nanoemulsão são estruturados por dois líquidos imiscíveis entre si, no qual com o auxílio de um ou mais tensoativos, um deles fica disperso no outro em formato de esferas em escala nanométrica (Mushtaq

et al., 2023; Chhabra et al., 2023; Nikolaev et al., 2023; Garavand et al., 2021; Porto et al., 2020; Choi & McClements, 2020; Gupta et al., 2016).

Sendo assim, o tratamento da PE ao longo, ou após, o uso de medicamentos antirreabsortivos, em especial aqueles que apresentam alta potência e são utilizados em dose oncológica se constitui como um grande desafio para a odontologia, uma vez que, além de a terapia não se mostrar tão efetiva nesta condição mais desafiadora, ainda pode não ser totalmente segura, pois pode aumentar o risco de ONMM. Com isso, a busca por protocolos efetivos e seguros ainda é uma necessidade para o tratamento da periodontite ao longo de um tratamento com medicamentos antirreabsortivos. A hipótese do estudo é que a ISSG associada com irrigações com nanopartículas lipídicas contendo própolis verde apresente efetividade e segurança no tratamento da PE em ratas ovariectomizadas tratadas com dose oncológica de zoledronato.

# 2 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar a efetividade e segurança do uso local de nanopartículas lipídicas contendo própolis verde como terapia adjuvante à ISSG no tratamento da PE em ratas ovariectomizadas tratadas com zoledronato.

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1 PRÓPOLIS VERDE CARREADA EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICA

A própolis utilizada neste estudo foi produzida por abelhas Apis melífera L. As telas propolisadoras foram utilizadas para realizar a obtenção das amostras, que, posteriormente, foram congeladas para facilitar a remoção da própolis. Para preparar o extrato, 30 g de própolis foram adicionadas a etanol 70%, completando o volume para 100 ml, ao abrigo de luz e sob agitação moderada. Depois de uma semana, o extrato foi filtrado e a concentração final foi calculada após a obtenção do peso seco da solução (mg/ml).

O extrato de própolis foi encapsulado em nanopartículas lipídicas. Para obter-se um alto teor de sólidos destes extratos, utilizou-se um sistema microemulsionado

do tipo óleo em água (O/A) composto por óleo, extrato de própolis (11% m/v), tensoativos (10-20%) e água. A fase aquosa, composta por água com ou sem tensoativo, foi vertida na fase oleosa, composta por óleo e o extrato de própolis verde com ou sem tensoativo, sob agitação magnética e o sistema foi mantido sob agitação por 8 horas.

A avaliação do tamanho e o índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas foi realizado, utilizando a técnica de espelhamento de luz dinâmico (Dynamic Light Scattering) no equipamento NanoSize ZS (Malvern). O potencial zeta foi avaliado por espelhamento de luz eletroforético, utilizando o mesmo equipamento. Todas as medidas foram feitas com amostras diluídas em solução de KCl 1mM.

A análise morfológica das nanopartículas lipídicas foi realizada, utilizando o microscópio eletrônico de transmissão da JEOL-JSM 6610. As amostras foram depositadas sobre uma fita de carbono fixada em porta-amostra. As amostras foram metalizadas com Au/Pd pelo processo de Sputtering, utilizando o metalizador BAL-TEC antes da análise.

Para a determinação da eficiência do encapsulamento, a dispersão de nanopartículas lipídicas foi centrifugada a 5000G em um sistema de ultrafiltração Microcon com membrana de filtração com corte de massa molar de 10.000 g/mol (Millipore). O filtrado foi quantificado por cromotografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a quantificação de artepilina C e bacarina. Para a determinação da eficácia de encapsulamento foi utilizada a equação: EE (%) = {[artepilina C ou bacarina] inicial - [artepilina C ou bacarina] filtrado) / [artepilina C ou bacarina] inicial} x 100.

## 3.2 ANIMAIS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Neste estudo, utilizou-se 24 ratas wistar com peso corporal médio de 300 g no início do período experimental. As ratas foram obtidas no biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” (FOA-UNESP) e, após isso, elas foram mantidas no biotério de experimentação do Departamento de Ciências Básicas (Disciplina de Histologia e Embriologia) da FOA-UNESP, sob as condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro; uma temperatura ambiente de 22 ± 2°C; um sistema de ventilação e exaustão, permitindo 20 trocas de ar por hora; uma umidade relativa do ar em torno de 55 ± 5%; e o

acondicionamento em gaiolas plásticas (com no máximo 4 animais por gaiola), onde elas tiveram o livre acesso à água e à alimentação. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, tal como evitar seu sofrimento. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA-UNESP. Este estudo seguiu um modelo randomizado, controlado e cego. No qual, cada animal foi identificado com uma sequência de 1 a 24, onde o software Minitab® 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA) foi empregado para que houvesse a geração de uma tabela contendo a distribuição randomizada dos animais numerados nos diferentes grupos experimentais.

## 3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As ratas foram submetidas a procedimentos: ovariectomia, instalação da ligadura, execução dos tratamentos locais e a eutanásia. Para isso, as ratas foram anestesiadas via injeção intramuscular de cloridrato de cetamina (80 mg/Kg; Cetamin®, Syntec) acrescida com cloridrato de xilazina (6 mg/Kg; Xilazin®, Syntec).

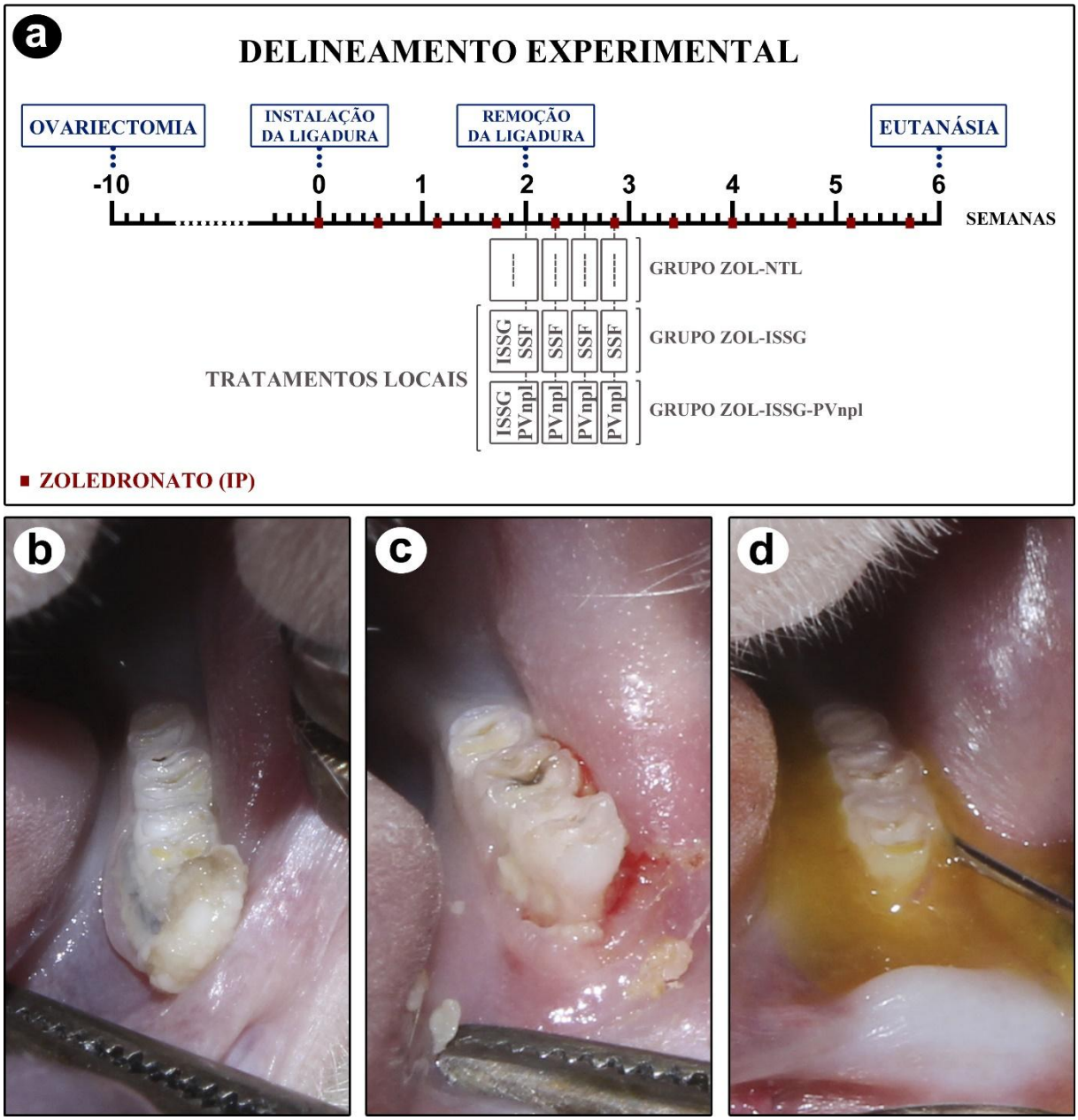
Sessenta dias antes do início do experimento, todas as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Na qual foi realizada tricotomia na porção abdominal bilateralmente e, após a assepsia com iodopovidona 10%, foram realizadas incisões bilaterais e a exposição das porções distas das tubas uterinas para a remoção dos ovários. Após isso, as tubas uterinas foram reposicionadas e as bordas do processo cirúrgico foram suturadas. E para comprovar a sua efetividade, após 9 semanas da ovariectomia, foi coletado um esfregaço vaginal de todas as ratas, entre 7 e 9 horas da manhã, por 7 dias, segundo a técnica de Long e Evans (1922) e analisado no microscópico óptico. Sua confirmação permitiu com que as ratas prosseguissem para as próximas etapas experimentais. Dessa forma, após isso, a partir do dia 0, sessenta dias após a ovariectomia, iniciou-se o protocolo medicamentoso, por seis semanas, com a administração com zoledronato (Sigma-Aldrich) via injeção intraperitonial de 100 µg/Kg, a qual foi diluída em 0,45 ml de solução de NaCl 0,9%, a cada quatro dias.

No dia 0 **(FIGURA 1)**, sessenta dias após a ovariectomia, com uma pinça modificada, foi instalada uma ligadura de algodão (fio de algodão #24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos e mantidos por nós cirúrgicos (JOHNSON, 1975) por 14 dias para que o acúmulo de biofilme pudesse causar a periodontite experimental. Após 14 dias, a ligadura de algodão foi removida e as ratas foram distribuídas nos seguintes grupos ZOL-NTL (n=8), onde não houve nenhum tratamento local, ZOL-ISSG (n=8), onde foi realizada a ISSG com irrigação de solução salina fisiológica, e ZOL-ISSG-PVnpl (n=8), onde foi feita a ISSG e irrigação com nanopartículas lipídicas contendo própolis verde **(FIGURA 1)**. A ISSG foi realizada logo após a remoção da ligadura **(FIGURA 1)** e foi feita com curetas manuais mini-five 1-2 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, USA) por meio de dez movimentos de tração disto-mesial, nas faces vestibular e lingual, e dez movimentos de tração cérvico-oclusais, nas áreas de furca e interproximais. Ressalta-se que foi feita uma única sessão de ISSG.

Logo após a ISSG, e, também, 2, 4 e 6 dias após a ISSG, foi feita a irrigação com solução salina fisiológica no grupo ZOL-ISSG e com a própolis verde carreada em nanopartículas no grupo ZOL-ISSG-PVnpl, sendo executada com uma seringa sem bisel contendo 1 ml da respectiva solução. A irrigação foi realizada com as soluções, com a ponta da agulha direcionada para a bolsa periodontal. E, após concluída a irrigação, as soluções permaneceram por 5 minutos no sítio com PE e, após este período, o excesso foi removido com um algodão estéril. Acrescenta-se que foram utilizadas medidas para evitar com que as ratas deglutissem as soluções, as quais consistiram em: barreira de algodão no fundo da cavidade bucal; e um posicionamento do animal na mesa operatória, com o intuito de impedir esta deglutição.

Após 28 dias, depois da remoção da ligadura, as ratas foram submetidas à eutanásia, por meio da perfusão transcardíaca **(FIGURA 1)** com 100 ml de solução de NaCl 0,9%, acrescida de 0,1% de heparina, seguida por 800 ml de solução fixadora e constituída de 4% de formaldeído (Sigma-Aldrich) em tampão fosfato-salino (PBS, 0,1 M, 4°C, pH 7,4). Posteriormente, as hemimandíbulas esquerdas foram dissecadas e submetidas à pós-fixação na mesma solução fixadora por um período de 48 horas.

**Figura 1 – Delineamento experimental e principais procedimentos operatórios**



Fonte: Autor, 2026

Legenda: (a) Linha do tempo mostrando os diferentes procedimentos experimentais executados em seus respectivos momentos nos grupos ZOL-NTL, ZOL-ISSG e ZOL-ISSG-PVnpl. (b) Aspecto clínico do primeiro molar inferior após a permanência da ligadura por duas semanas. (c) Aspecto clínico do primeiro molar inferior imediatamente após a remoção da ligadura. (d) Irrigação do primeiro molar inferior com nanopartículas lipídicas contendo própolis verde.

## 3.4 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA

Para isso, as hemimandíbulas foram submetidas aos procedimentos: lavagem em água por 12 horas, imersão em etanol 70º GL durante 2 horas e escaneamento, por meio de um microtomógrafo (SkyScan 1272, Bucker®), o qual estava acoplado a um computador (Dell®), Workstation de Controle. Posteriormente, utilizou-se os seguintes parâmetros de escaneamento: resolução de 8 µm, ângulo de rotação de 0.5º, corrente de feixe a 500 µA, filtro de alumínio de 0,5 mm com um tempo de exposição de 540 milissegundos. Após isso, as imagens foram reconstruídas por meio do programa N-RECON v.1.6.3.3 em cerca de 380 a 400 fatias, de acordo com os parâmetros adotados. Feito a reconstrução, as imagens foram processadas pelo programa DATAVIEWER v 1.4.3 para obter os cortes sagitais e, logo após, foram analisados pelo programa CT-NA v 1.10.11.0 para definir a área de interesse e analisar a região de furca do primeiro molar inferior. Para obter e visualizar as imagens tridimensionais das hemimandíbulas, foi utilizado o software CT-VOX v 2.0.0.0.

As análises das imagens que foram obtidas pela microtomografia computadorizada, após serem importadas para o programa DATA VIEWER, foram tomadas as medidas lineares nas três dimensões espaciais e, posteriormente, as imagens foram orientadas e salvas em fatias coronais (2000x1336). As medidas volumétricas foram feitas, após a seleção de uma região de interesse 3D com o programa CT-AN. Durante o desenho da região de interesse, o examinador procurou o corte, onde a cavidade pulpar, situada nas raízes mesial e distal do primeiro molar inferior direito, estivessem mais visíveis e amplas, determinando a região central da furca. Logo após à identificação das regiões, 25 cortes anteriores e 25 cortes posteriores foram selecionados à primeira imagem escolhida, totalizando, com isso, uma área com 50 cortes da região central da furca, para a análise quantitativa do

tecido ósseo. A região de interesse foi delimitada, circundando a região total da furca do primeiro molar inferior. Após da definição dos limites, estes foram ajustados, de acordo com a necessidade. Esta forma delineada foi adequadamente submetida à interpolação da área a ser medida e se obteve com isso o volume de interesse. Na imagem tridimensional, os índices foram calculados, por meio da região de interesse binarizada. Os parâmetros arquitetônicos foram os seguintes: volume ósseo na região de furca (VOF-%), espessura das trabéculas no tecido ósseo na região de furca (Tb. Th-mm²) e número de trabéculas no tecido ósseo da região de furca (Tb.N - mm²). Para a análise do nível da perda óssea alveolar, com o auxílio do programa DATA VIEWER, foram feitas quatro medidas lineares da junção cemento-esmalte até a crista óssea alveolar (JCE-COA) nas faces: vestibular, lingual, distal e região central de furca.

## 3.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS

Para este processamento, todas as amostras foram submetidas à lavagem em água, durante 12 horas, e, em seguida, foram imersas em uma solução desmineralizadora, a qual era constituída por 10% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Sigma-Aldrich) em PBS, por 60 dias. Posteriormente à desmineralização, as amostras foram submetidas à lavagem em água, desidratadas em etanol, diafanizadas no xilol, impregnadas e incluídas na parafina histológica e, por fim, foram seccionadas no micrótomo com 5 µm de espessura. A microtomia foi executada, de acordo com o plano de corte que progrediu de vestibular para lingual, em relação ao primeiro molar inferior esquerdo com PE. Os cortes seriados os quais corresponderam a região de furca foram coletados em lâminas de vidro silanizadas.

Para realizar a análise histopatológica dos tecidos periodontais do primeiro molar inferior com PE e a análise da porcentagem de tecido ósseo na região de furca (PTOF) e da porcentagem de tecido ósseo não vital na região de furca (PTONV), as secções histológicas foram submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (HE).

## 3.6 PROCESSAMENTO IMUNOISTOQUÍMICO DAS AMOSTRAS

Para realizar esta análise, as secções histológicas foram, então, submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta. Este processamento imunoistoquímico seguiu de acordo com o protocolo que foi descrito por Ervolino et al., (2019). Com isso, as secções histológicas foram divididas em três lotes, que foram incubados por 24 horas com os seguintes anticorpos primários: anti-TNFα do rato gerado em coelho (orb11495, 1:100; Biorbyt, Cambridge, Reino Unido); anti-IL-1β do rato gerado em coelho (orb382131, 1:100; Biorbyt) e; anti-TRAP do rato gerado em camundongo (sc376875, 1:200; Santa Cruz Biotechnology). Após isso, para amplificar o sinal, empregou-se anticorpo secundário biotinilado de camundongo/coelho gerado em cavalo (BA-1400, 1:100; Vector Laboratories, CA, USA), durante 2 horas, e estreptavidina conjugada com HRP (AS-5004, 1:100; Vector Laboratories), durante 2 horas. A revelação foi realizada, utilizando-se como cromógeno, o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) (SK-4100, ImmPACT DAB Substrate kit, peroxidase, Vector Laboratories), durante 1 minuto. Ademais, nas amostras as quais eram destinadas à detecção de TNFα e IL-1β não foi efetuada a contracoloração. Nas amostras destinadas à detecção de TRAP, a contracoloração foi realizada pela Hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos mesmos procedimentos, suprimindo-se o uso do anticorpo primário.

## 3.7 ANÁLISE DE DADOS

### 3.7.1 ANÁLISE DA CONDIÇÃO GERAL DE SAÚDE E EXAME CLÍNICO EXTRA E INTRABUCAL

Durante todo o período experimental, a condição geral de saúde dos animais foi observada. Além disso, foi efetuado o monitoramento do peso corporal, periodicamente. Após a eutanásia, o exame intrabucal foi realizado, o qual consistiu na inspeção visual da cavidade bucal, principalmente dos sítios que continham PE.

### 3.7.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS PERIODONTAIS

Foi realizada por meio de microscopia de luz, por um histologista certificado (E.E.) e cego aos tratamentos, realizando a avaliação de todos os tecidos periodontais associados ao primeiro molar inferior, utilizando os seguintes parâmetros: intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; padrão de

estruturação do tecido conjuntivo na região de furca e o padrão de estruturação tecido ósseo na região de furca. Ademais, os parâmetros empregados na análise histopatológica foram estabelecidos por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores (Garcia et al., 2015; Novaes et., 2022).

### 3.7.3 ANÁLISE HISTOMÉTRICA DA PTOF DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR

As imagens foram obtidas da região de furca do primeiro molar inferior das amostras as quais foram submetidas à coloração por HE, com um aumento de 25x, utilizando-se uma câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha), a qual estava acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador. Utilizaram-se três secções histológicas equidistantes para realizar a mensuração da Porcentagem de Tecido Ósseo na região de Furca (PTOF). Para realizar a determinação da PTOF, utilizou-se o programa de análise de imagens ImageJ® (versão 1.5i; National Institute of Health). No início, foi mensurada a Área Total da Furca (ATF) e, logo em seguida, a Área Ocupada por Tecido Ósseo (ATO), sendo ambas em mm². Posteriormente, foi-se calculada a PTOF. A ATF foi demarcada apicalmente, através de uma linha traçada do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A partir desta linha, seguiu-se todo o contorno da superfície externa do cemento, o qual estava situado entre as raízes. Para mensurar a ATO, utilizou-se o mesmo limite apical da ATF e, a partir deste, seguiu-se todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. A PTOF foi calculada, multiplicando-se a ATO por 100 e dividindo-se pela ATF (PTOF= (ATOx100) /ATF) (Garcia et al., 2015; Novaes et al., 2022). Ademais, a PTOF foi expressa como uma porcentagem média ± desvio padrão em cada grupo experimental.

### 3.7.4 ANÁLISE HISTOMÉTRICA DA PTNOV NA REGIÃO DE FURCA DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR

As imagens foram obtidas da região de furca do primeiro molar inferior das amostras que haviam sido submetidas à coloração por HE, tal como foi descrito anteriormente. Ademais, foram utilizadas três secções histológicas equidistantes para realizar a mensuração da Porcentagem de Tecido Ósseo Não Vital na região de Furca

(PTONV). Para realizar a determinação da PTNOV, utilizou-se o programa de análise de imagens ImageJ® (versão 1.5i; National Institute of Health). No início, mensurou-se a Área Ocupada por Tecido Ósseo (ATO) e, logo em seguida, a Área Ocupada por Tecido Ósseo Não Vital (ATONV), sendo ambas em mm². Posteriormente, calculou-se a PTONV. A ATO foi demarcada como descrito anteriormente. Dentro da ATO, foram demarcadas a (s) região (ões) onde o tecido ósseo não vital estava presente. O tecido ósseo não vital foi definido como as áreas em que se constava a presença de lacunas contíguas sem a presença de osteócitos e/ou contendo apenas remanescentes de tais células. A PTONV foi calculada, multiplicando-se a ATONV por 100 e dividindo-se por ATO (PTONV= (ATONVx100 / ATO (Sá, 2018). A PTONV foi expressa como porcentagem média ± desvio padrão em cada grupo experimental.

### 3.7.5 ANÁLISE DO PADRÃO DE IMUNOMARCAÇÃO PARA TNFα e IL-1β NA REGIÃO DE FURCA DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR

As imagens foram obtidas da região de furca do primeiro molar inferior das amostras que foram submetidas à detecção imunohistoquímica de TNFα e IL-1β, tal qual foi descrito anteriormente e com um aumento de 200x. Ademais, um quadrado cujos lados apresentavam 2000μm foi posicionado no centro do septo interradicular nas imagens obtidas. O limite coronário deste quadrado era a crista óssea alveolar, do qual se estendia apicalmente por uma distância de 2000μm. Além disso, com o auxílio do programa ImageJ® realizou-se a demarcação da imunomarcação, por meio do *Color Threshold*, onde se obteve a densidade da imunomarcação na área. A imunomarcação de TNFα e IL-1β foi expressa em uma porcentagem de densidade de imunorreatividade na área como média ± desvio padrão.

### 3.7.6 ANÁLISE DO PADRÃO DE IMUNOMARCAÇÃO PARA TRAP NA REGIÃO DE FURCA DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR

As imagens foram obtidas a partir da região de furca do primeiro molar inferior das amostras que foram submetidas à detecção imunohistoquímica de TRAP, como foi descrito anteriormente e com um aumento de 200x. Ademais, um quadrado cujos lados apresentavam 2000μm foi posicionado no centro do septo interradicular nas imagens as quais foram obtidas. O limite coronário deste quadrado era a crista óssea

alveolar, do qual se estendia apicalmente por uma distância de 2000µm. Para TRAP, efetuou-se a contagem de células multinucleadas imunomarcadas. A quantidade de células TRAP-positivas foi expressa como número de células por mm² ± desvio padrão em cada grupo experimental.

### 3.7.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo, foi-se considerado como o desfecho primário a PTONV. As análises microtomográficas, a análise histopatológica, a análise histométrica da PTOF e a imunomarcação para TNFα, IL-1β e TRAP foram consideradas como desfechos secundários.

Para as análises estatísticas, foi-se utilizado o software Bioestat 5.3 (https://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53; Instituto Mamiruá, AM, Brasil).

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a distribuição dos dados referentes à JCE-COA, VOF, Tb.N, Tb.Th, PTOF, PTONV e imunomarcação para TNFα e IL-1β e TRAP. Considerando que todas as variáveis avaliadas apresentaram distribuição normal, foi-se utilizado a Análise de Variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey. Para a análise histopatológica foram empregados os testes de Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls. O nível de significância utilizado em todos os testes estatísticos foi de 5% ($p<0.05$).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PRÓPOLIS VERDE

As nanopartículas, as quais continham própolis verde, apresentaram as seguintes características: 144,8 nm de diâmetro médio; -24,6 mV de potencial zeta; 0,28 de índice de polidispersão; 99,9% e 98,7% de eficácia de encapsulamento para artepilina C e bacarina **(FIGURA 2).**

## 4.2 CONDIÇÕES GERAIS DE SAÚDE E EXAME INTRABUCAL

A saúde geral dos animais que foram utilizados neste estudo se manteve estável durante todo o período experimental. Os animais toleraram bem todos os procedimentos experimentais: ovariectomia; tratamento com zoledronato; instalação da ligadura; ISSG e irrigação do sítio com PE com as soluções. Ressalta-se que não houve diferença intragrupo e intergrupos no peso médio dos animais ao longo do experimento.

## 4.3 JCE-COA, VOF, Tb.N e Tb.Th

O grupo ZOL-ISSG-PVnp apresentou uma menor JCE-COA e uma maior VOF em relação aos grupos ZOL-NTL e ZOL-ISSG, os quais não apresentaram diferença estatística entre si. Ademais, não houve uma diferença estatisticamente significante na Tb.N e Tb.Th na região de furca do primeiro molar inferior, quando os grupos ZOL-NTL, ZOL-ISSG e ZOL-ISSG-PVnpl foram comparados entre si **(FIGURA 3).**

## 4.4 ASPECTOS HISTOLÓGICOS DOS TECIDOS PERIODONTAIS NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os parâmetros, os escores e a distribuição dos espécimes de acordo com a análise histopatológica nos grupos ZOL-NTL, ZOL-ISSG e ZOL-ISSG-PVnpl estão apresentados na **TABELA 1**. Em suma, ao estabelecer-se uma comparação entre os grupos experimentais, constatou-se características histológicas mais favoráveis no sítio cuja PE foi tratada ISSG e PVnpl, quando comparado com os grupos ZOL-NTL e ZOL-ISSG, os quais apresentaram características histológicas similares entre si **(TABELA 1 e FIGURA 4)**.

## 4.5 PTOF E PTONV

A PTOF no grupo ZOL-NTL foi menor que nos demais grupos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significante na PTOF entre os grupos ZOL-ISSG e ZOL-ISSG-PVnpl.

O grupo ZOL-ISSG-PVnpl apresentou uma menor PTONV em relação aos demais grupos experimentais. A PTONV no grupo ZOL-ISSG foi maior que no grupo ZOL-NTL **(FIGURA 4)**.

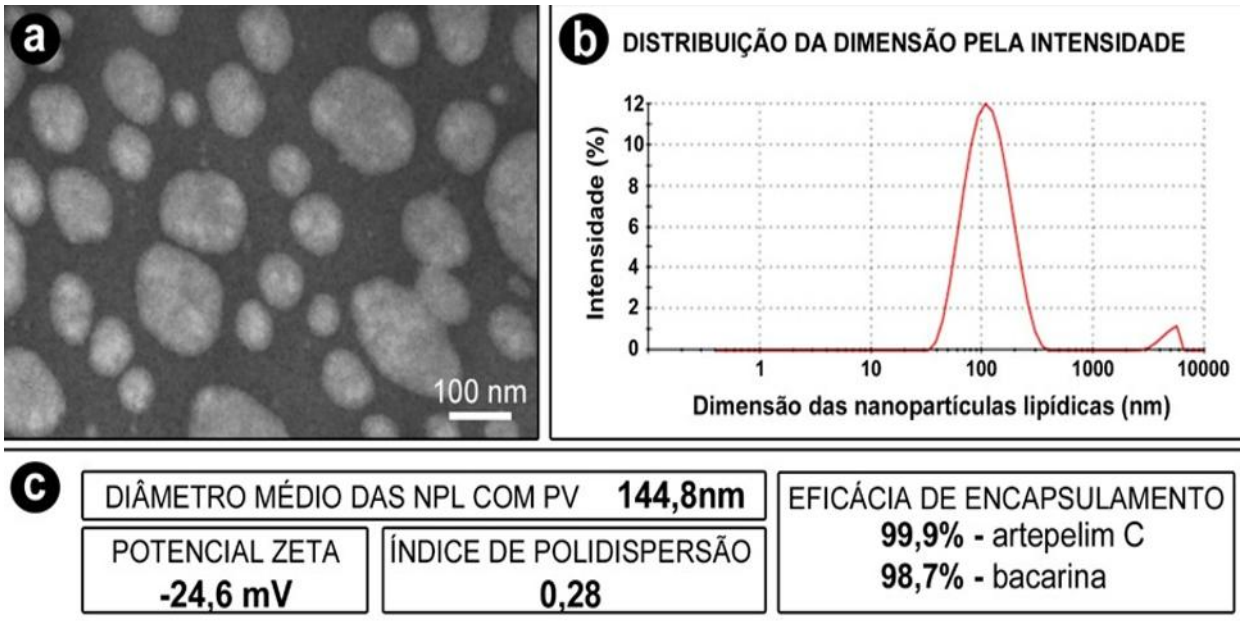
## 4.6 IMUNOMARCAÇÃO PARA TNFα e IL-1β NA REGIÃO DE FURCA DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR

A densidade de imunomarcação, tanto para TNFα quanto para IL-1β na região de furca do primeiro molar inferior, foi menor no grupo ZOL-ISSG-PVnpl, quando comparado com os demais grupos experimentais. Em ZOL-NTL a densidade de imunomarcação para TNFα e IL-1β na região de furca do primeiro molar inferior foi maior que no grupo ZOL-ISSG **(FIGURA 5)**.

## 4.7 IMUNOMARCAÇÃO PARA TRAP NA REGIÃO DE FURCA DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR

Não houve diferença estatisticamente significante na quantidade de células TRAP-positivas na região de furca do primeiro molar inferior quando os grupos ZOL-NTL, ZOL-ISSG e ZOL-ISSG-PVnpl foram comparados entre si **(FIGURA 6)**.

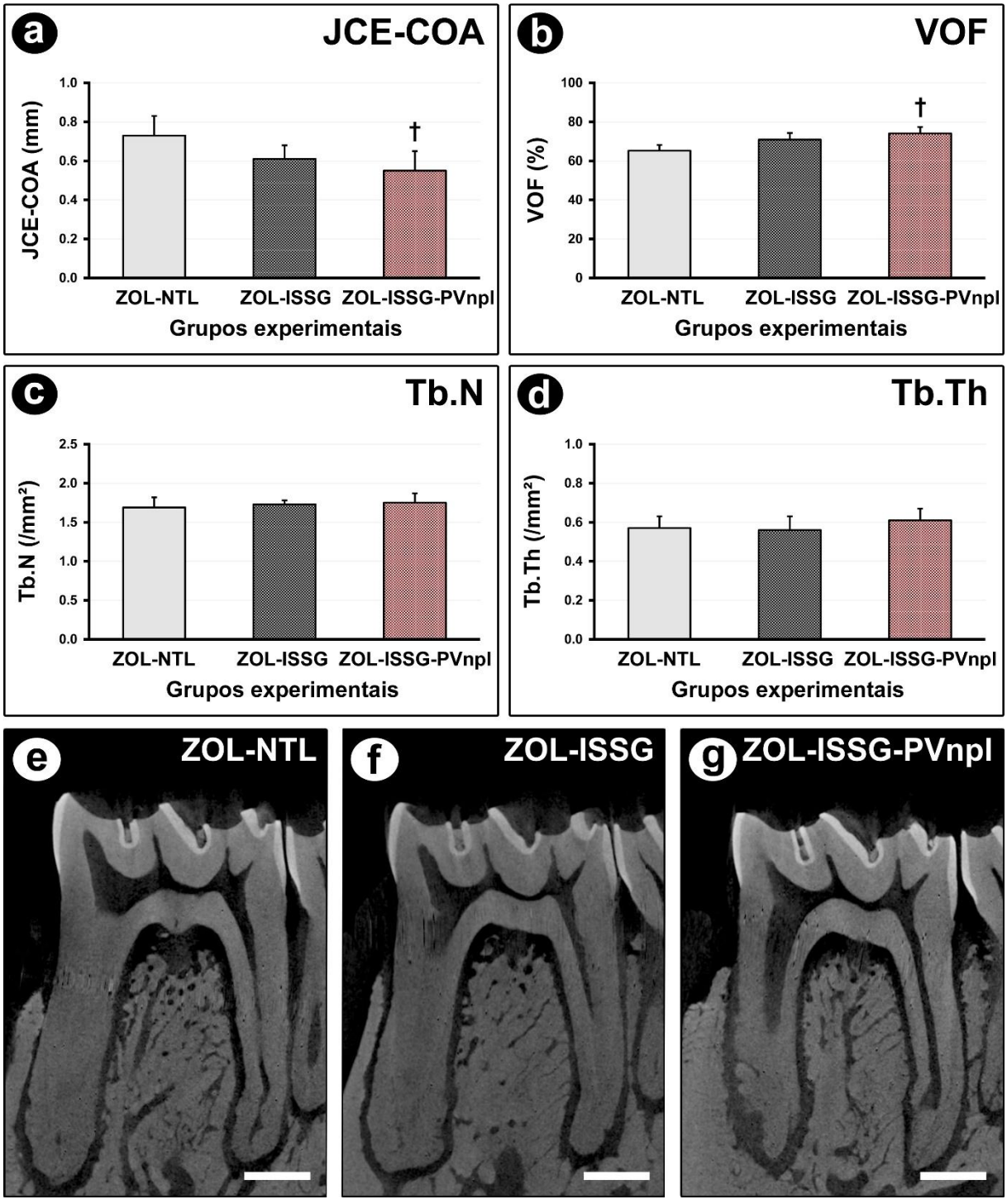
**Figura 2 – Caracterização das nanopartículas de própolis verde**




Fonte: Autor, 2026

Legenda: (a) Aparência das nanopartículas lipídicas sob um microscópio eletrônico de transmissão. (b) Gráfico mostrando a distribuição de tamanho das nanopartículas lipídicas (em nanômetros) após 90 dias de preparação. (c) Diâmetro médio das nanopartículas lipídicas, potencial zeta, índice de polidispersão e eficácias de encapsulação de artepelina C e bacarina.

**Figura 3 – Aspecto microtomográfico do periodonto de inserção relacionado com o primeiro molar inferior**

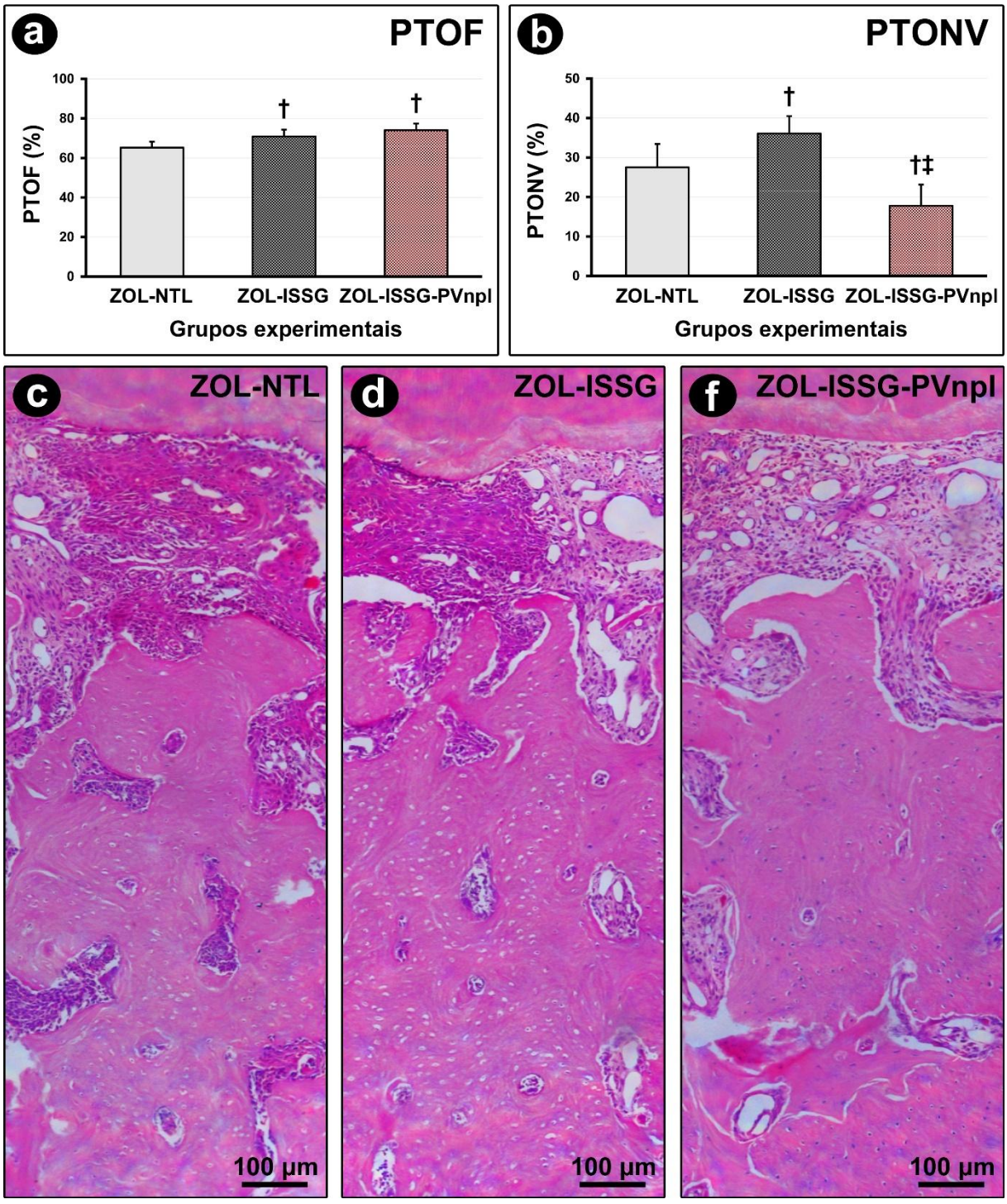



Fonte: Autor, 2026

Legenda: (a – d) Gráficos mostrando a média da distância linear da junção cemento-esmalte até a crista óssea alveolar (JCE-COA) (a), o volume ósseo na região de furca (VOF-%) (b), o número de trabéculas no tecido ósseo da região de furca (Tb.N) (d) e a espessura média das trabéculas no tecido ósseo na região de furca (Tb.Th). Teste estatístico de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. (e - g) Aspecto microtomográfico do

periodonto de inserção relacionado com o primeiro molar inferior nos grupos ZOL-NTL (e), ZOL-ISSG (f) e ZOL-ISSG-PVnpl (g). Símbolos: †, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo ZOL-NTL. Barras de escala: 1 mm.

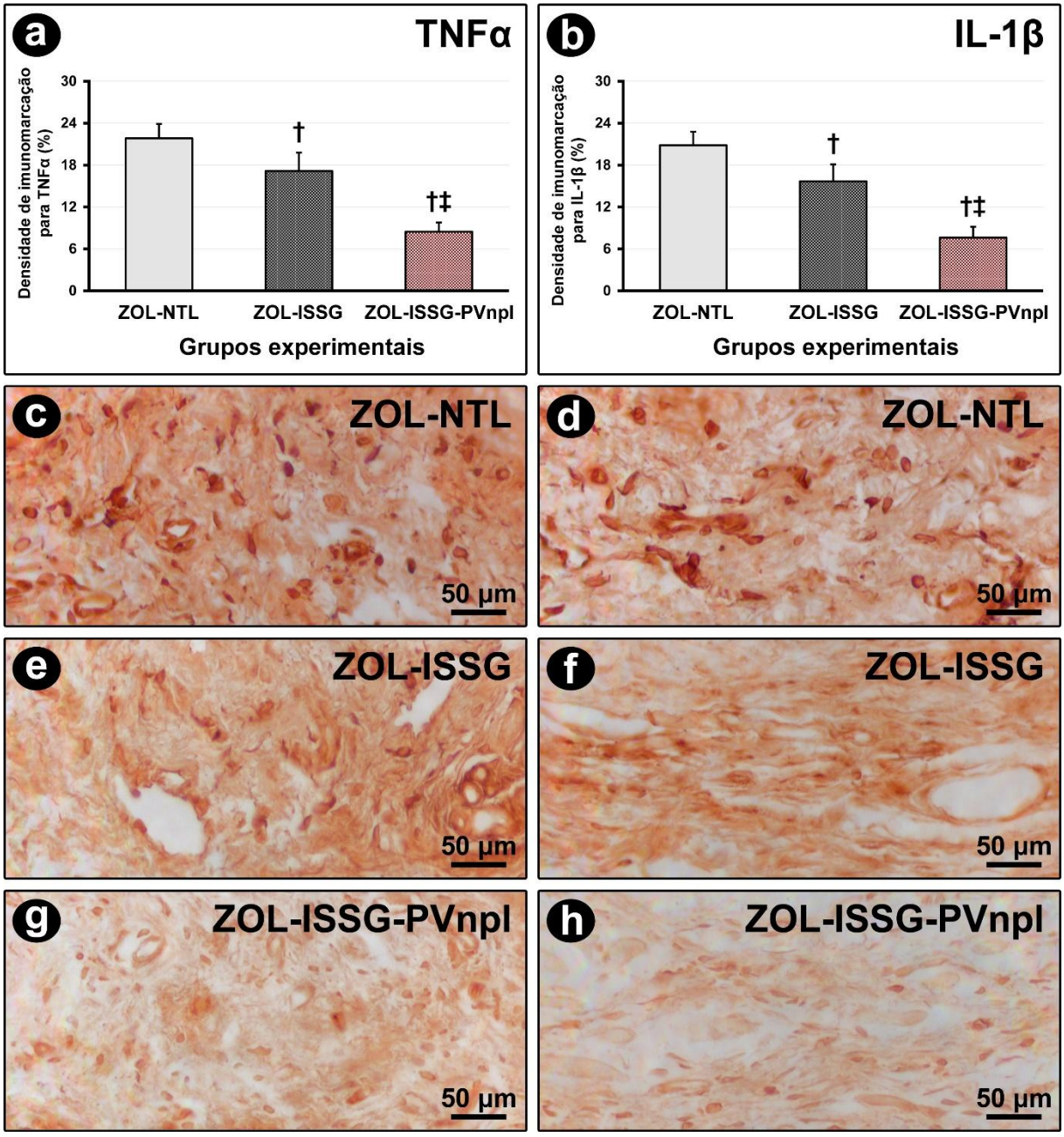
**Figura 4 – Tecido ósseo na região de furca do primeiro molar inferior**




Fonte: Autor, 2026

Legenda: (a) Gráfico mostrando a porcentagem de tecido ósseo (PTOF) e a porcentagem de tecido ósseo não vital (PTONV) na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. (b - d) Fotomicrografias evidenciando o aspecto histológico da região de furca do primeiro molar inferior nos grupos ZOL-NTL (b), ZOL-ISSG (c) e ZOL-ISSG-PVnpl (d). Símbolos: †, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo ZOL-NTL; ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo ZOL-ISSG. Coloração: HE. Aumento original: 100x. Barras de escala: 100 μm.

**Figura 5 – Imunomarcação para TNFα e IL-1β da região de furca do primeiro molar inferior**

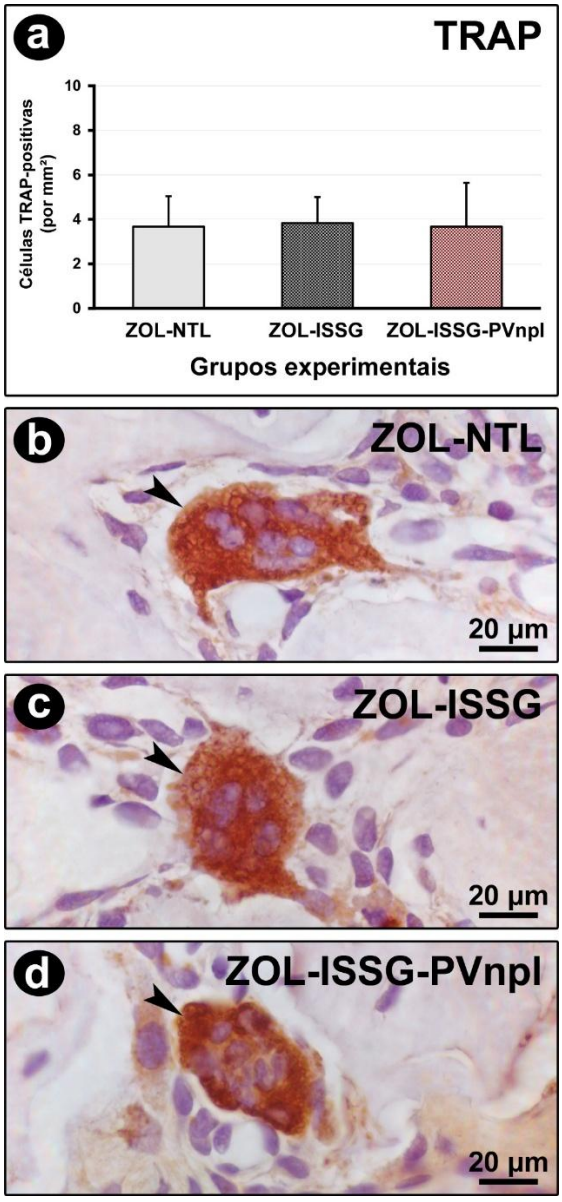



Fonte: Autor, 2026

Legenda: (a – b) Gráficos mostrando o padrão de imunomarcação para TNFα e IL-1β na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. (c - h) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação para TNFα (c, e, g) e IL-1β (d, f, h) na região de furca do primeiro molar inferior nos grupos ZOL-NTL (c, d), ZOL-ISSG (e, f) e ZOL-ISSG-PVnpl (g, h). Símbolos: †, diferença estatisticamente significante em relação ao

grupo ZOL-NTL; ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo ZOL-ISSG. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 μm.

**Figura 6 – Imunomarcação para TRAP da região de furca do primeiro molar inferior**




Fonte: Autor, 2026

Legenda: Legenda: (a) Gráfico mostrando a quantidade de células TRAP-positivas na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos experimentais. Teste estatístico de Shapiro-Wilk, Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. (b - d) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcação para TRAP na região de furca do primeiro molar inferior nos grupos ZOL-NTL (b), ZOL-ISSG (c) e ZOL-ISSG-PVnpl (d). Símbolos: setas, osteoclastos. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 µm.

**Tabela 1 – Parâmetros, escores e distribuição dos espécie de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos ZOL-NTL, ZOL-ISSG e ZOL-ISSG-PVnpl.**

| ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA | | | |
|---|---|---|---|
| **PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES** | **NÚMERO DE ESPÉCIMES** | | |
| | **GRUPOS EXPERIMENTAIS** | | |
| | **ZOL-NTL** | **ZOL-ISSG** | **ZOL-ISSG-PVnpl** |
| **INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL** | | | |
| **1.** ausência de inflamação | - | - | 3 |
| **2.** inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias) | - | - | 5 |
| **3.** inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias) | 3 | 5 | - |
| **4.** inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias) | 5 | 3 | - |
| **MEDIANA** | **4** | **3** | **2†‡** |
| **EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO** | | | |
| **1)** ausência de inflamação | - | - | 3 |
| **2)** estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca | - | - | 5 |
| **3)** estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca | 3 | 3 | - |
| **4)** estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca | 5 | 5 | - |
| **MEDIANA** | **4** | **4** | **2†‡** |
| **PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA** | | | |
| **1)** moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso) | - | - | 2 |
| **2)** moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas | - | - | 5 |
| **3)** pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas | 2 | 2 | 1 |
| **4)** desestruturação tecidual severa com áreas de necrose | 6 | 6 | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **MEDIANA** | **4** | **4** | **2†‡** |
| **PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA** | | | |
| **1)** trabéculas ósseas compostas por tecido ósseo vital e com áreas de neoformação óssea; | - | - | - |
| **2)** trabéculas ósseas compostas, predominantemente, por tecido ósseo vital, com poucas áreas constituídas por tecido ósseo não vital; | - | - | 8 |
| **3)** trabéculas ósseas compostas por quantidades equivalentes de tecido ósseo vital e tecido ósseo não vital; | 3 | 2 | - |
| **4)** trabéculas ósseas compostas, predominantemente, por tecido ósseo não vital, com poucas áreas constituídas por tecido ósseo vital; | 5 | 6 | - |
| **MEDIANA** | **4** | **4** | **2†‡** |

Fonte: Autor, 2026

Legenda: Legenda: Símbolos: †, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo ZOL-NTL; ‡, diferença estatisticamente significante em relação ao grupo ZOL-ISSG.

# 5 DISCUSSÃO

Os medicamentos antirreabsortivos, como os bisfosfonatos, apresentam grande efetividade no tratamento várias osteopatias. Todavia, eles podem promover um grave efeito adverso, a ONMM (Ruggiero et al., 2022). Ademais, além do seu uso, para que a ONMM seja causada, normalmente, há presença de outros fatores de risco. O primeiro fator de risco local consiste em procedimentos odontológicos invasivos, como exodontias. E, o segundo fator de risco local consiste na presença de um processo inflamatório-infeccioso associado ao dente, como, por exemplo, a periodontite (Kuroshima et al., 2019; Mcgowan et al., 2018; Khan et al., 2017). O tratamento padrão da periodontite consiste na ISSG, a qual demonstra elevada efetividade na maioria dos pacientes (Kaldahl et al., 1993; Listgarten, 1975; Fernandes et al., 2009). Entretanto, há situações nas quais a periodontite é agravada por fatores relacionados ao paciente. Nestas situações, a resposta do tratamento à ISSG pode ser afetada, em razão da severidade do quadro, mas, também, pode ser afetada pelo comprometimento da resposta dos tecidos periodontais ao tratamento. Nos pacientes que estão sob o tratamento com zoledronato, principalmente, nas doses oncológicas, estas duas situações citadas anteriormente, estão presentes (Diniz-Freitas et al.,

2018; Braun & Iacono, 2006). Nesta condição, a utilização de terapias adjuvantes à ISSG pode contribuir para que o tratamento alcance a efetividade e segurança almejada, visto que o fator de risco local está presente. Com isso, o intuito deste estudo foi avaliar a efetividade e a segurança do uso local de nanopartículas lipídicas contendo própolis verde como terapia adjuvante à ISSG no tratamento da PE em ratas sob terapia com alta dose de zoledronato.

Os modelos experimentais, tanto da PE quanto da ONMM, têm ajudado muito a elucidar a etiopatogenia destas condições e são de grande importância para a proposição e avaliação de formas mais efetivas do tratamento de ambas as doenças (Araújo, 2017). Ademais, neste estudo foi empregado um modelo experimental, no qual as ratas adultas foram ovariectomizadas e submetidas ao tratamento com o zoledronato em sua dose oncológica. A escolha por ratas ovariectomizadas se aplica ao fato de que a ONMM acomete as mulheres com uma frequência maior. A utilização do zoledronato e na sua dose oncológica foi feita devido ao fato deste medicamento e, também, desta dosagem estarem relacionados com a maioria dos casos de ONMM. O fator de risco local escolhido foi a periodontite induzida por ligadura, na qual segue um curso semelhante ao observado na periodontite que ocorre nos humanos. E o uso das nanopartículas lipídicas contendo própolis verde se baseou em um estudo anterior, o qual foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, que mostrou a grande efetividade deste medicamento como uma terapia adjuvante à ISSG em ratas ovariectomizadas.

A variável primária deste estudo foi a PTONV. Justifica-se o apontamento desta variável em função da necrose óssea ser a marca registrada da ONMM. A maioria dos estudos relacionados à proposição e avaliação do tratamento da PE empregam, como variável primária, aquelas que são capazes de refletir a quantidade de tecido ósseo alveolar que é perdida ou preservada em razão dos tratamentos propostos. Neste estudo, mesmo que tenhamos feito a avaliação de variáveis capazes de refletirem a respectiva condição, como avaliação microtomográfica do nível de perda óssea alveolar, do volume ósseo na região de furca e análise histométrica da PTOF, estas se constituíram em desfechos secundários, tendo em vista que a utilização do zoledronato promove uma inibição da ação dos osteoclastos presentes e, dependendo da dose empregada, também causa uma redução na quantidade destas células. Com isso, a perda óssea alveolar pode ser menor, ou a sua preservação pode ser maior, e

tais características não significam o sucesso do tratamento, visto que a viabilidade do tecido pode estar comprometida. Ademais, ao estabelecer-se uma comparação entre a quantidade de células TRAP-positivas neste estudo atual com a quantidade destas células em outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa que utilizou este mesmo modelo experimental, e também período, mas sem o tratamento com o zoledronato, o número destas células é menor. Além disso, a análise histopatológica demonstrou que estas células se mostraram-se maiores que o habitual, arredondadas, hipernucleadas e distantes da matriz óssea, ou seja, demonstraram características de osteoclastos com atividade comprometida e que estão sob a ação de um medicamento antirreabsortivo. Estes achados, por si só, justificam a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ZOL-NTL e ZOL-ISSG, no que se refere ao nível da perda óssea alveolar, volume ósseo, número e espessura de trabéculas ósseas e PTOF. No grupo ZOL-ISSG-PVnpl, acreditamos que, como o dano tecidual foi menor em razão do tratamento com nanopartículas lipídicas contendo própolis verde, o resultado disso foi um nível de perda óssea alveolar menor, um maior volume ósseo e maior PTOF.

Nos grupos ZOL-NTL e ZOL-ISSG, a PTONV foi elevada no sítio com PE. Ademais, constatou-se nestes grupos uma resposta inflamatória local mais intensa e um elevado padrão de imunomarcação para as principais citocinas que possuem atividade pró-inflamatória, TNFα e IL-1β, nos tecidos periodontais. Acreditamos que há uma correlação entre a intensidade do processo inflamatório e a morte dos osteócitos, no osso alveolar. A progressão da inflamação no osso alveolar pode ocasionar a morte dos osteócitos, sendo, predominantemente, por meio do apoptose ou necroptose. Ressalta-se que, como a reabsorção óssea está inibida devido ao uso do zoledronato, o sistema que causaria a eliminação dos remanescentes destas células, e que depende do acesso o qual é permitido pela atividade reabsortiva dos osteoclastos, não é capaz de exercer sua respectiva função. A morte dos osteócitos, no interior da matriz óssea, gera padrões moleculares associados a danos (DAMPs), nos quais destaca-se no osso alveolar necrótico, SAP-130. Estes DAMPs acessam a superfície da matriz óssea, por meio do sistema de lacunas e canalículos, e, posteriormente, ativam os receptores de reconhecimento de padrões (PRPs), que estão situados, predominantemente, nos osteoclastos, incluindo, aqueles que estão com a atividade comprometida devido ao uso do zoledronato e células com capacidade fagocitária. Dentre os PRPs, destaca-se o Mincle no tecido ósseo alveolar.

A interação DAMPs-PRPs amplifica, substancialmente, a resposta inflamatória local, o que causaria mais morte dos osteócitos, aumentando com isso a necrose óssea e criando um ciclo autoalimentado (Aguirre et al., 2021).

No respectivo estudo, não se constatou a manifestação clínica da ONMM em nenhum grupo experimental. Visto isso, acreditamos que a manifestação clínica da ONMM esteja relacionada com a quantidade de tecido ósseo não vital presente, dessa forma, ao ultrapassar-se um determinado limiar, a manifestação clínica ocorre. Importante considerar que, se o tempo da permanência da ligadura fosse maior, este limiar poderia ter sido alcançado, como visto em estudos anteriores, todavia, como este estudo visa mais a prevenção, ao invés da ocorrência da ONMM, e não o seu tratamento, acreditamos que o tempo de permanência, o qual foi utilizado, tenha sido o ideal para este estudo. Ressalta-se que todos os procedimentos odontológicos invasivos são capazes de causar a inflamação no respectivo sítio e, consequentemente, seriam capazes de elevar o risco da manifestação clínica da ONMM, o que foi constatado em estudos anteriores, nos quais as ratas senescentes tratadas com dosagem oncológica de zoledronato e, cujos primeiros molares inferiores com PE foram submetidos à exodontia, constatou-se a manifestação clínica da ONMM, provavelmente em razão de uma exacerbação da resposta inflamatória provocada pelo procedimento operatório.

Com isso, seguindo esta linha de raciocínio, no qual a inflamação causa a morte de osteócitos e, como consequência, esta morte acarreta uma inflamação secundária, o rompimento deste ciclo, onde, provavelmente, a inflamação exerça uma função essencial, causaria efeitos positivos à nível local. No grupo ZOL-ISSG-PVnpl, a quantidade de tecido ósseo não vital foi menor que nos demais grupos experimentais. Ademais, neste mesmo grupo, constatou-se um quadro inflamatório mais discreto, tal como, uma menor imunomarcação para TNFα e IL-1β. Atribuímos estes resultados aos efeitos das nanopartículas lipídicas contendo própolis verde. Estudos mostram que a própolis verde apresenta efeito anti-inflamatório potente, o qual é atribuído principalmente à elevada quantidade de flavonóides, em especial ao flavonol galangina (Lustosa et al., 2008; Sonmez et al., 2005; Graikou et al., 2016). Dessa forma, acreditamos que a ação anti-inflamatória da própolis verde tenha sido, pelo menos em parte, uma grande responsável pela ruptura do ciclo da inflamação, causando, com isso, menos morte de osteócitos e, devido a isso, causou também

menos inflamação, o que justifica a redução da quantidade de tecido ósseo não vital neste grupo experimental.

Além disso, ressalta-se a atividade antimicrobiana da própolis, ou seja, a capacidade de reduzir a carga bacteriana, incluindo os microrganismos periodontopatogênicos, possuindo, então, a capacidade de reduzir a inflamação local. Os seus efeitos antimicrobianos são atribuídos, principalmente, à flavona pinocembrina, ao flavonol galangina e ao éster feniletil do ácido cafeico, os quais atuam na via inibição da RNA-polimerase bacteriana. Ademais, os flavonoides, o ácido cafeico, o ácido benzóico e o ácido cinâmico também exercem o efeito antimicrobiano, via desencadeamento de danos estruturais e funcionais à membrana ou parede celular dos microrganismos (Salatino, 2022; Santos et al., 2022; Hossain et al., 2022; Zulhendri et al., 2021; Oryan et al., 2018; Pasupuleti, 2017; Sforcin, 2016). Com isso, ao menos parte da redução da inflamação local observada no grupo ZOL-RAR-PVnpl, deve-se ao efeito antimicrobiano da própolis verde.

A própolis verde exerce um efeito antimicrobiano sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Entretanto, alguns estudos sugerem que as bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular, quimicamente, mais completa e com um teor lipídico mais elevado que as bactérias Gram-positivas, de forma que seria capaz de exercer uma função protetiva mais elevada nestas bactérias, em relação à ação da própolis (Vargas et al., 2004). Neste estudo, a própolis foi carreada em um sistema composto por nanopartículas lipídicas e este respectivo tratamento foi efetuado no grupo ZOL-ISSG-PVnpl. Neste caso, acreditamos que estas nanopartículas lipídicas vencem, facilmente, o mecanismo de defesa, o qual é baseado em lipídeos destas bactérias. Com isso, a própolis verde exerceria sua função antimicrobiana com a máxima potência, também nestas bactérias.

Uma outra potente ação da própolis verde é a sua capacidade antioxidante, que é atribuída, na maioria dos casos, ao seu elevado teor de flavonoides e compostos fenólicos. Estudos demonstram uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio durante a progressão da periodontite (Shang et al., 2023) e, também, nas lesões osteonecróticas (Taniguchi et al., 2020; Bagan et al., 2014) e uma incapacidade dos sistemas antioxidantes de retornarem ao equilíbrio redox, causando, consequentemente, danos oxidativos locais. Dessa forma, as nanopartículas lipídicas contendo própolis verde seriam capazes de reduzir o estresse oxidativo local e,

também, o dano oxidativo, contribuindo, dessa forma, para que aquele respectivo sítio possa se restabelecer, ou, ao menos, se aproximar da homeostase.

Por fim, outro aspecto relacionado à própolis verde e que, também, acreditamos que tenha contribuído para os resultados positivos que foram observados no grupo ZOL-ISSG-PVnpl foi a ação bioestimulatória da PVnpl sobre os tecidos periodontais (Seth et al., 2022; Luque-Bracho et al., 2023). A ISSG, embora seja um procedimento minimamente invasivo, após a sua realização, os tecidos periodontais passam, necessariamente, pelas fases, que são comuns, do processo de reparação tecidual: inflamatória, proliferativa e de remodelação. A intensidade e a persistência da fase inflamatória podem comprometer todo o processo de reparação tecidual. Acreditamos que tenha ocorrido isso no grupo ZOL-ISSG. Além disso, com o controle da inflamação, e já na fase proliferativa do processo de reparação tecidual, uma ação bioestimulatória sobre algumas linhagens de células, seria capaz de levar os tecidos periodontais a uma condição de saúde, ou, pelo menos, o mais próximo dela, o que acreditamos que tenha ocorrido no grupo ZOL-ISSG-PVnpl.

A ONMM é uma condição, cujo tratamento se constitui como um grande desafio para a odontologia. Estratégias capazes de impedir que esta condição se estabeleça são as ideais. Além do fator de risco sistêmico, que seria a utilização do medicamento com ação antirreabsortiva, normalmente, é necessário um fator de risco local. Dentre os fatores de risco locais, está a presença da periodontite. Então, antes de se iniciar um tratamento com drogas antirreabsortivas, é recomendado que haja saúde bucal plena. Todavia, caso a periodontite se instale ao longo de um tratamento com esse tipo de medicamento, a mesma deve ser tratada, por se configurar como um fator de risco para ONMM. O tratamento convencional feito por ISSG deve ser efetuado com o menor comprometimento tecidual, para que não seja um fator iatrogênico. Ademais, o uso de terapias adjuvantes nesta situação é algo que ajuda a atingir uma condição periodontal satisfatória. O emprego das nanopartículas lipídicas de própolis verde se constituiu em uma terapia adjuvante que melhorou a condição inflamatória local e, consequentemente, limitou as consequências negativas da inflamação sobre o tecido ósseo alveolar, o que a coloca como uma excelente estratégia de tratamento adjuvante. Entretanto, deve ser levado em consideração que nossos achados, embora mostrem resultados promissores, não devem ser extrapolados para seres humanos, no entanto, são capazes de nortear futuros estudos clínicos controlados e

randomizados para se estabelecer terapias efetivas e seguras para o manejo da periodontite durante, e após, um tratamento com drogas antirreabsortivas, inclusive visando evitar a ocorrência da ONMM.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que a irrigação com as nanopartículas lipídicas contendo própolis verde se mostrou efetiva e segura como uma terapia adjuvante à ISSG no tratamento da PE em ratas ovariectomizadas tratadas com dosagem oncológica de zoledronato.

## REFERÊNCIAS

AGUIRRE, J. I.; CASTILLO, E. J.; KIMMEL, D. B. Biologic and pathologic aspects of osteocytes in the setting of medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *Bone*, v. 153, p. 116168, 2021.

ALI, K. M. et al. Effect of local propolis irrigation in experimental periodontitis in rats on inflammatory markers (IL-1β and TNF-α) and oxidative stress. *Indian Journal of Dental Research*, v. 31, n. 6, p. 893-898, 2020.

AMADEI, S. U. et al. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. *Brazilian Oral Research*, v. 25, n. 6, p. 538-543, 2011.

ANBINDER, A. L. et al. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Brazilian Dental Journal*, v. 17, n. 3, p. 201-207, 2006.

ANDRADE, D. P. et al. Subgingival irrigation with a solution of 20% propolis extract as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a preliminary study. *Journal of the International Academy of Periodontology*, v. 19, n. 4, p. 145-151, 2017.

ASSUNÇÃO, M. et al. Clinical efficacy of subgingivally delivered propolis as an adjuvant to nonsurgical periodontal treatment of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Phytotherapy Research*, v. 35, n. 10, p. 5584-5595, 2021.

BAGAN, J. et al. Oxidative stress in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 43, n. 5, p. 371-377, 2014.

BERNARDO, D. V. et al. Effects of the pulsed electromagnetic fields on experimental periodontitis and estrogen deficiency. *Bioelectromagnetics*, v. 43, n. 7, p. 426-437, 2022.

BOULAIZ, H. et al. Nanomedicine: application areas and development prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 5, p. 3303-3321, 2011.

CATON, J. G. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions: introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 89, Suppl. 1, p. S1-S8, 2018.

CHHABRA, J. et al. Potential of nanoemulsions for accelerated wound healing: innovative strategies. *International Journal of Surgery*, v. 109, n. 8, p. 2365-2377, 2023.

CHOI, S. J.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic nutraceuticals. *Food Science and Biotechnology*, v. 29, n. 2, p. 149-168, 2020.

CIESIELSKA, A. et al. Changes in the oral cavity in menopausal women: a narrative review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 1, p. 253, 2021.

COUTINHO, A. Honeybee propolis extract in periodontal treatment: a clinical and microbiological study. *Indian Journal of Dental Research*, v. 23, n. 2, p. 294, 2012.

DUARTE, P. M. et al. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss. *Journal of Periodontal Research*, v. 39, n. 2, p. 107-110, 2004.

EGHBALI ZARCH, R. et al. Effect of propolis extract on clinical parameters. *Journal of Advanced Periodontology & Implant Dentistry*, v. 13, n. 2, p. 84-89, 2021.

FANG, H. et al. Comparison of full-mouth disinfection and quadrant-wise scaling. *Journal of Periodontal Research*, v. 51, n. 4, p. 417-430, 2016.

FERES, M. et al. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis. *Journal of the International Academy of Periodontology*, v. 7, n. 3, p. 90-96, 2005.

FERNANDES, L. A. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 36, n. 3, p. 219-228, 2009.

FIGUEIREDO, L. C. et al. Propolis and other natural products against periodontal microorganisms. *Microorganisms*, v. 10, n. 11, p. 2172, 2022.

FREIRE, J. O. A. Efeito do tratamento local com nanoemulsão de própolis verde no sítio de extração dental de ratas. 2022. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

FREIRES, I. A. et al. The alveolar bone protective effects of natural products. *Archives of Oral Biology*, v. 87, p. 196-203, 2018.

GARAVAND, F. et al. Encapsulation of phenolic compounds. *Food Chemistry*, v. 364, p. 130376, 2021.

GARCIA, V. G. et al. Evaluation of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy. *Supportive Care in Cancer*, v. 23, n. 7, p. 2007-2017, 2015.

GEBARAA, E. C. et al. Propolis extract as an adjuvant to periodontal treatment. *Oral Health & Preventive Dentistry*, v. 1, n. 1, p. 29-35, 2003.

GENCO, R. J.; GROSSI, S. G. Is estrogen deficiency a risk factor for periodontal disease? *Compendium of Continuing Education in Dentistry Supplement*, n. 22, p. S23-S29, 1998.

GIAMMARINARO, E. et al. Propolis as an adjuvant to non-surgical periodontal treatment. *Minerva Stomatologica*, v. 67, n. 5, p. 183-188, 2018.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

HERRERA, D. et al. Treatment of stage IV periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 49, Suppl. 24, p. 4-71, 2022.

HOSSAIN, S. et al. Drug-herb interactions between propolis and pharmaceutical drugs. *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 876183, 2022.

JOHNSON, J. H. Effects of local irritation on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, v. 10, n. 6, p. 332-345, 1975.

KALDAHL, W. B.; KALKWARF, K. L.; PATIL, K. D. A review of longitudinal studies. *Journal of Periodontology*, v. 64, n. 4, p. 243-253, 1993.

KASSEBAUM, N. J. et al. Global burden of oral conditions. *Journal of Dental Research*, v. 96, n. 4, p. 380-387, 2017.

KINANE, D. F. et al. Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, p. 17038, 2017.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationship in gingiva. *Journal of Periodontology*, v. 46, n. 11, p. 677-680, 1975.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The estrous cycle in the rat. Berkeley: University of California Press, 1922.

LÓPEZ-VALVERDE, N. et al. Effectiveness of propolis in the treatment of periodontal disease: updated systematic review with meta-analysis. *Antioxidants*, v. 10, n. 2, p. 269, 2021.

LUQUE-BRACHO, A. et al. The benefits of propolis in periodontal therapy: a scoping review of preclinical and clinical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 303, p. 115926, 2023.

MERCAN, D. A. et al. Nanoparticles for antimicrobial agents delivery: an up-to-date review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 22, p. 13862, 2022.

MIYATAKA, H. et al. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 20, n. 5, p. 496-501, 1997.

MUSHTAQ, A. et al. Recent insights into nanoemulsions: their preparation, properties and applications. *Food Chemistry X*, v. 18, p. 100684, 2023.

NAKAO, R. et al. Effect of topical administration of propolis in chronic periodontitis. *Odontology*, v. 108, n. 4, p. 704-714, 2020.

NASCIMENTO, G. G. et al. Does osteoporosis influence the development and progression of periodontitis? *Osteoporosis International*, v. 30, p. 315-329, 2019.

NIKOLAEV, B. et al. Nano- and microemulsions in biomedicine: from theory to practice. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 7, p. 1989, 2023.

NOVAES, V. C. N. et al. Influence of antineoplastic agents on experimental periodontitis. *Supportive Care in Cancer*, v. 30, n. 3, p. 1967-1980, 2022.

OLIVEIRA DA SILVA, L. et al. Nanotechnology formulations designed with herbal extracts. *Chemistry & Biodiversity*, v. 20, n. 8, p. e202201241, 2023.

ORYAN, A. et al. Potential role of propolis in wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 98, p. 469-483, 2018.

PARK, K. Y. et al. Association of periodontitis with menopause and hormone therapy. *Journal of Periodontal & Implant Science*, v. 53, n. 3, p. 184-193, 2023.

PASUPULETI, V. R. et al. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1259510, 2017.

PORTO, A. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Nanoemulsions formulated for topical use. *Revista Fitos*, v. 14, n. 4, p. 513-527, 2020.

REINHARDT, R. A. et al. Influence of estrogen and osteoporosis on periodontitis. *Journal of Periodontology*, v. 70, n. 8, p. 823-828, 1999.

SALATINO, A. Perspectives for uses of propolis in therapy against infectious diseases. *Molecules*, v. 27, n. 14, p. 4594, 2022.

SANGHANI, N. N. et al. Propolis as an adjuvant in chronic periodontitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 8, n. 9, p. ZC41-ZC44, 2014.

SANTOS, F. F. et al. Anti-inflammatory activities of Brazilian propolis. *Journal of Food Biochemistry*, v. 46, n. 10, p. e14350, 2022.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy Research*, v. 30, n. 6, p. 894-905, 2016.

SHANG, J. et al. Role of oxidative stress in periodontitis and systemic diseases. *Frontiers in Physiology*, v. 14, p. 1210449, 2023.

SMILEY, C. J. et al. Nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *Journal of the American Dental Association*, v. 146, n. 7, p. 508-524.e5, 2015.

STÄHLI, A. et al. In vitro activity of propolis on oral microorganisms. *Antibiotics*, v. 10, n. 9, p. 1045, 2021.

TOKER, H. et al. Effects of propolis on alveolar bone loss. *Journal of Periodontology*, v. 79, n. 6, p. 1089-1094, 2008.

VADILLO-RODRÍGUEZ, V. et al. Interaction of propolis extracts with bacterial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 200, p. 111571, 2021.

VARGAS, V. A. et al. Lipase-producing microorganisms from a Kenyan alkaline soda lake. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 2, p. 81-86, 2004.

XU, X. C. et al. Effects of oestrogen deficiency on alveolar bone. *Molecular Medicine Reports*, v. 12, n. 3, p. 3494-3502, 2015.

ZHANG, L. et al. Nanoparticles in medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 83, n. 5, p. 761-769, 2008.

ZULHENDRI, F. et al. Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis. *Foods*, v. 10, n. 6, p. 1360, 2021.

# ANEXOS

# 1 ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FOA/UNESP)

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

**CAMPUS ARAÇATUBA**
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais**
**CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação da efetividade da raspagem e alisamento radicular associado à irrigação com nanopartículas de própolis no tratamento da periodontite experimental em ratos sob terapia com altas doses de zoledronato"**, Processo FOA nº 0593-2020, sob responsabilidade de Edilson Ervolino apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de Novembro de 2021.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 22 de Junho de 2023.
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 22 de Julho de 2023.

## CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the effectiveness of scaling and root planing associated with irrigation with propolis nanoparticles in the treatment of experimental periodontitis in rats under therapy with high doses of zoledronate"**, Protocol FOA nº 0593-2020, under the supervision of Edilson Ervolino presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 26, 2021.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** June 22, 2023.
**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** July 22, 2023.

**Prof. Associado João Carlos Callera**
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais**
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br