



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MÔNICA DO AMARAL SILVA

ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM GENGIVITE
APÓS USO DE DENTIFRÍCIO 1% À BASE DE PRÓPOLIS VERMELHA
BRASILEIRA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

FORTALEZA

2019

MÔNICA DO AMARAL SILVA

ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM GENGVITE
APÓS USO DE DENTIFRÍCIO 1% À BASE DE PRÓPOLIS VERMELHA
BRASILEIRA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração em Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Orientador: Prof. Dr. Gandhi Radis
Baptista

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S581 Silva, Mônica do Amaral.

Análise de biomarcadores salivares em pacientes com gengivite após uso de dentifrício 1% a base de própolis vermelha brasileira: um ensaio clínico randomizado / Mônica do Amaral Silva. – 2019.

79 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Gandhi Radis Baptista .

1. Biofilme dentário. 2. Biomarcadores. 3. Saliva. 4. Própolis. I. Título.

CDD 615

MÔNICA DO AMARAL SILVA

ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM GENGIVITE
APÓS USO DE DENTIFRÍCIO A BASE DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA:
UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração em Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Aprovada em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gandhi Radis Baptista (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. João Hildo de Carvalho Furtado Júnior
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Carlos Clessius Ferreira Xavier
Faculdade São Leopoldo Mandic

Prof. Dr. Guilherme Antônio Lopes de Oliveira
Cristo Faculdade do Piauí- CHRISFAPI

Profa. Dra. Daniela Moura Parente
UNIFSA Centro universitário santo agostinho

À minha família, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por estar vivendo esse momento e alcançando essa graça. Durante esses quatro anos, foram muitas as dificuldades e é com muita convicção que digo que é Ele quem me sustenta e fortalece, para seguir.

A minha filhota, amor maior da minha vida, minha linda mocinha Júlia, que me dá força e alegria todos os dias, que me estimula a vencer, que me faz querer ser melhor. A ela agradeço a felicidade que me proporciona, vendo seu crescimento no caminho do bem, e com ela me desculpo pela vezes que tive que deixá-la, por conta desde trabalho e de outros. Te amo!

A minha família, meu porto seguro! A ela dedico este trabalho e todas as glórias da minha vida. Meu pai, meu colega, amigo, inspiração. Minha mãe, maior incentivadora, de visão ampla e que me faz saber que eu sou capaz do que eu quiser! Meu irmão, que sempre foi meu amigo e companheiro, hoje agradeço por além de ser memória viva em minha história, ser exemplo de homem pra minha filha. Estendo os agradecimentos à “tia Ruth”, que tanto cuidado tem com minha filhota. Mateus e Miguel... obrigada por existirem. Sei que essa conquista é de grande orgulho para vocês e eu estou feliz em proporcionar isso.

A UFC e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todos os recursos humanos e materiais que me foram disponibilizados durante meu doutoramento.

Ao professor Dr. Gandhi, que confiou em mim para desenvolver esta pesquisa, meus sinceros agradecimentos pela orientação, pela disponibilidade, pelo coleguismo, e por todas as oportunidades que me foram concedidas durante esses anos. Obrigada por ter me ajudado e ter me indicado o melhor caminho.

Aos laboratórios, muito obrigada pela ajuda na realização dos experimentos.

Um agradecimento mais que especial a Lídia Valadas, que me ensinou todas as metodologias necessárias para o desenvolvimento desse trabalho e por toda ajuda que me deu sempre que precisei. Você é responsável direta por essa conquista!

Aos colegas de trabalho, gratidão imensa pelo apoio para que esse ciclo se concluísse. Colegas do HUT, HEMOPI, Laboratório, especialmente à Chrisfapi, que me fez ter mais vontade e coragem para chegar ao fim.

A banca examinadora, pelo aceite ao convite e pelas valiosas contribuições, engradecendo o conteúdo desta pesquisa.

Aos amigos. Muito obrigada pela amizade, carinho, apoio, confiança, cumplicidade, pelos encontros e risadas. Quem sou eu sem vocês?

Agradeço também aos pacientes que participaram como voluntários para o estudo.

Muita coisa aconteceu nesse período. Agradeço por cada momento vivido, alegrias e tristezas, conquistas e derrotas.

Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

Introdução: O uso de produtos naturais pelo ser humano como alternativa terapêutica remonta a idade antiga e os mesmos são essenciais na produção de novos fármacos, fato que tem levado os pesquisadores a buscar alternativas com substâncias com atividade biológica, destacando-se assim a própolis vermelha brasileira (PVB). Estudos também comprovam o efeito terapêutico do extrato de própolis vermelha brasileira sobre inibição microbiana de agentes cariogênicos, além de apresentar-se como uma opção clínica de baixa toxicidade. A presença de aparelhos fixos na cavidade oral pode alterar moderadamente a natureza do biofilme dentário. Alguns marcadores salivares e parâmetros clínicos podem sofrer alterações devido ao tratamento ortodôntico e gengivite. **Objetivo:** Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar, longitudinalmente, o perfil dos biomarcadores salivares proteína total, amilase e IL-10, pH e fluxo salivar, e índice de placa após uso de um dentífrício a base de própolis vermelha em pacientes sob tratamento ortodôntico. Além disso, avaliar a percepção dos participantes quanto às sensações e possíveis efeitos adversos após o uso de dentífrício a base de própolis vermelha brasileira (PVB). **Material e métodos:** Trata-se de um estudo longitudinal, randomizado, duplo-cego, controlado. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa sob parecer 2.551.395 e os participantes selecionados na cidade de Aracati-CE. Para preparação do dentífrício de própolis vermelha, foi incorporada a concentração de 1%. Um total de 76 participantes foram randomizados em dois grupos: Grupo I - Dentífrício manipulado com própolis vermelha + 1500ppm de Flúor (n = 38), Grupo II- Dentífrício fluoretado a 1500ppm (n = 38). Amostras de saliva de todos os participantes foram coletadas antes e após 4 semanas do tratamento. Em seguida, foram mantidas, transportadas, centrifugadas e armazenadas adequadamente até análise. A concentração de proteínas totais salivares das alíquotas de saliva foi determinada pelo método BCA, utilizando como padrão uma curva de albumina sérica bovina (BSA), também foi avaliada a atividade da amilase e IL-10 utilizando-se kits comerciais. A percepção dos pacientes quando o uso do dentífrício de própolis foi avaliada por meio de um questionário. **Resultados:** O tratamento com os diferentes dentífrícios não alterou as proteínas totais salivares antes e após o tratamento (G1: $p=0,0746$; G2: $p=0,2144$) e o pH se manteve semelhante. A atividade da amilase também não mostrou variação no G1 ($p=0,1877$)

e G2 ($p=0,4674$). A IL-10 teve redução significativa, G1 ($p<0,0001$) e G2 ($p=0,03$). O fluxo salivar do grupo tratado com dentifrício de própolis vermelha brasileira não mostrou variação estatisticamente significativa ($p= 0,172$), assim como no grupo tratado com dentifrício fluoretado comercial ($p=0,329$). Quanto à percepção e aceitação da formulação com própolis, a mesma não causou efeitos adversos e teve uma boa aceitação pelos usuários. Conclusão: Nesse estudo, após 4 semanas de uso pelos participantes, não houve diferenças entre os marcadores de proteína total, pH e amilase, quando comparado o grupo do dentifrício de própolis com o grupo do dentifrício de flúor. A dosagem de IL-10 e o índice de placa foram reduzidos no grupo do dentifrício de própolis após o período de uso. Quanto à percepção o dentifrício de própolis vermelha brasileira foi bem aceito pelos pacientes.

Palavras-chave: Biofilme dentário. Biomarcadores. Saliva. Própolis.

ABSTRACT

Introduction: The use of natural products by the human being as a therapeutic alternative goes back to the ancient age and these products are essential in the production of new drugs, a fact that has led the researchers to seek alternatives with substances with biological activity, thus highlighting the Brazilian red propolis (BRP). Studies also prove the therapeutic effect of the BRP extract on microbial inhibition of cariogenic agents, besides presenting as a clinical option of low toxicity. The presence of fixed appliances in the oral cavity may cause changes on the dental biofilm. Some salivary markers and clinical parameters may undergo changes due to orthodontic treatment and gingivitis. **Objective:** The objective of this study was to longitudinally evaluate the salivary biomarkers profile, total protein, amylase and IL-10, pH and salivary flow, and plaque index after use of a BRP dentifrice in patients under orthodontic treatment. In addition, to evaluate the perception of the participants regarding the sensations and possible adverse effects after the use of BRP dentifrice. **Material and methods:** This is a longitudinal, randomized, double-blind, controlled study. The research was approved by the Research Ethics Committee under number 2.551.395 and the participants selected in the city of Aracati-CE. For preparation of the red propolis dentifrice, a concentration of 1% was incorporated. A total of 76 participants were randomized into two groups: Group I - Red Propolis Dentifrice + 1500ppm Fluoride (n = 38), Group II - 1500ppm Fluoride Dentifrice (n = 38). Saliva samples from all participants were collected before and after 4 weeks of treatment. They were then properly maintained, transported, centrifuged and stored until analysis. The salivary total protein concentration of saliva aliquots was determined by the BCA method, using as standard a bovine serum albumin (BSA) curve, the activity of amylase and IL-10 was also evaluated using commercial kits. Patients' perceptions of propolis dentifrice use were assessed using a questionnaire. **Results:** Treatment with different dentifrices did not change total salivary proteins before and after treatment (G1: $p = 0.0746$; G2: $p = 0.2144$) and the pH remained similar. The activity of amylase also showed no variation in G1 ($p = 0.1877$) and G2 ($p = 0.4674$). IL-10 had a significant reduction, G1 ($p < 0.0001$) and G2 ($p = 0.03$). The salivary flow of the group treated with BRP dentifrice did not show statistically significant variation ($p = 0.172$), as well as in the group treated with commercial fluoridated dentifrice ($p = 0,329$). About the perception and acceptance of the

formulation with propolis, it did not cause adverse effects and had a good acceptance by the users. Conclusion: In this study, after 4 weeks of use by the participants, there were no differences between the total protein, pH and amylase markers when compared to the propolis dentifrice group with the fluoride dentifrice group. The IL-10 dosage and plaque index were reduced in the propolis dentifrice group after the period of use. Regarding perception, the BRP dentifrice was well accepted by the patients.

Keywords: Dental plaque. Saliva. Propolis. Biomarker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenvolvimento da cárie dentária e fatores de risco.....	18
Figura 2 - Própolis vermelha.....	25
Figura 3 - Análise do extrato de própolis vermelha através de HPLC.....	40
Gráfico 1 - Concentração de proteínas totais nos grupos estudados nos diferentes tempos.....	46
Gráfico 2 - Atividade da amilase nos grupos estudados nos diferentes tempos.....	47
Gráfico 3 - Dosagem da IL-10 nos grupos estudados nos diferentes tempos.....	47
Gráfico 4 - Índice de placa visível (IPV) antes e após o uso do dentifrício de própolis vermelha brasileira.....	48
Gráfico 5 - Índice de placa visível (IPV) antes e após o uso do dentifrício comum...	49
Gráfico 6 - Percepção e aceitação dos pacientes do grupo tratado com dentifrício de própolis vermelha brasileira.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medição do fluxo salivar no grupo tratado com dentifricio PVB e comum nos diferentes tempos.....	48
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ADA	American Dental Association
AFT	Acompanhamento Farmacoterapêutico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCA	Método do ácido bicinconínico
BRP	Brazilian Red Propolis
BSA	Albumina sérica bovina
CHX	Digluconato de clorexidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IG	Indicação Geográfica
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IPV	Índice de placa visível
L	Litro
min	Minuto
mL/min	Microlitros por minuto
nm	Nanômetro
pg/mL	Picograma por mililitro
PVB	Própolis Vermelha Brasileira
SG	Sangramento gengival
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral
ug/mL	Microgramas por mililitro
U/L	Unidades por litro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
1.1	Microbiota bucal	16
1.2	Processo de desmineralização e cárie	18
1.3	Doenças gengivais	19
1.4	Flúor e dentifrícios.....	21
1.5	Produtos Naturais e Odontologia.....	22
1.6	Própolis	23
1.7	Própolis e Odontologia	26
1.8	Acúmulo de biofilme e aparelhos.....	28
1.9	Antimicrobianos em Ortodontia	30
1.10	Saliva como meio de diagnóstico	32
1.11	Alterações salivares e aparelhos ortodônticos	34
1.12	Amilase	35
1.13	Interleucina 10 (IL-10).....	36
2.	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo Geral	38
2.2	Específicos.....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Tipo de estudo, aspectos éticos e população.....	39
3.2	Extrato de própolis vermelha brasileira e preparação dos dentifrícios...39	
3.3	Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos	40
3.4	Examinadores	40
3.5	Critérios de inclusão	41
3.6	Critérios de exclusão.....	41
3.7	Exame intra-oral de triagem.....	41
3.8	Anamnese.....	42
3.9	Restrições e proibições: antes e durante o estudo	42
3.10	Critérios para descontinuação	42
3.10.1	<i>À critério do voluntário</i>	<i>42</i>
3.10.2	<i>À critério do investigador</i>	<i>42</i>
3.11	Fase clínica	43
3.11.1	<i>Coleta de saliva.....</i>	<i>44</i>
3.11.2	<i>Dosagem de proteínas totais salivares pelo método do ácido bicinconínico (BCA).....</i>	<i>44</i>

3.11.3 Medida da amilase	44
3.11.4 Dosagem da IL-10	44
3.11.5 Determinação do fluxo salivar e potencial hidrogeniônico (pH)	45
3.12 Avaliação da aceitação do dentifício pelos pacientes	45
3.13 Método Estatístico	45
4. RESULTADOS	46
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO I.....	65
ANEXO II.....	67
ANEXO III- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	68
ANEXO IV	71
ANEXO V	72
APÊNDICE I.....	75
EXAME DENTÁRIO	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microbiota bucal

A cavidade oral é formada por microambientes variados, como as superfícies dos diferentes tipos de epitélio que revestem as mucosas e as superfícies duras dos dentes. Além disso, o ambiente oral pode ser colonizado por diversos tipos de microrganismos, incluindo vírus, fungos, arqueas e protozoários, sendo as bactérias o grupo predominante. Existe o registro de mais de 700 espécies de bactérias que habitam a boca, onde a maioria estão relacionadas com a formação do biofilme dental. Dessa forma, a microbiota bucal é tida como uma das floras microbianas mais complexas do corpo humano. (HE; SHI, 2009)

Microrganismos nas superfícies dos dentes tendem a formar biofilmes com comunidades multiespécies que são frequentemente incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Por contraste, as superfícies epiteliais mais transitórias exigem uma estratégia de colonização especializada e, embora organismos formem biofilmes nessas superfícies, é necessário menos tempo para a maturação do que com superfícies dentárias. Além disso, as bactérias penetram e crescem dentro dos tecidos epiteliais e até intracelularmente. (LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018)

Diversos são os microrganismos existentes na cavidade bucal humana. As bactérias possuem características que permitem sua colonização nas superfícies dentárias como também no tecido gengival, na mucosa jugal, na língua e na saliva. Estima-se que cerca de quatrocentas a quinhentas espécies diferentes colonizem os tecidos bucais, entretanto, apenas 5% dessas são consideradas patogênicas. (HE; SHI, 2009)

O processo de formação do biofilme acontece da seguinte maneira: a saliva forma uma película adquirida composta de proteínas e glicoproteínas que servem de suporte para a adesão das bactérias primárias sobre os dentes ou os tecidos periodontais. Em seguida, essas bactérias se multiplicam e formam microcolônias. Ocorre então uma sucessão microbiana e coagregação por bactérias secundárias, que possuem mecanismos de se aderirem aos primeiros colonizadores, trazendo vantagens competitivas e metabólicas. As bactérias presentes no biofilme interagem entre si e possuem capacidades que não têm quando estão isoladas, tornando-se mais resistentes a ataques externos. (HE; SHI, 2009)

Como em outras partes do corpo, a microbiota oral tem uma relação simbiótica com o hospedeiro. A microbiota oral residente atua como uma barreira para os organismos exógenos, mas, além disso, alguns membros da microbiota (por exemplo, alguns estreptococos) desempenham um papel imunomodulador e regulam negativamente as respostas potencialmente indesejáveis pró inflamatórias a organismos indígenas benéficos. (MARSH, 2018) Entretanto, a perturbação desse equilíbrio ecológico causa inevitavelmente doenças orais, como cárie dentária, doenças periodontais, pericoronarite e osteomielite óssea craniofacial. A microbiota oral também está correlacionada com muitas doenças sistêmicas, incluindo câncer, diabetes mellitus, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e parto prematuro. (XIN; JUNZHI; XUEDONG, 2015)

Se removido regularmente, o biofilme dentário compreende principalmente estreptococos orais que são considerados como microflora residente. Mas se não for perturbado, um biofilme complexo contendo até 100 espécies bacterianas em um local se acumulará e poderá eventualmente causar o desenvolvimento de doenças. (LARSEN; FIEHN, 2017)

O biofilme supragengival é composto por bactérias gram positivas, incluindo *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* e lactobacilos, enquanto a placa subgengival é composta principalmente por bactérias anaeróbias gram negativas, tais como *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter spp.*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e espiroquetas orais, como *Treponema denticola*. (HE; SHI, 2009)

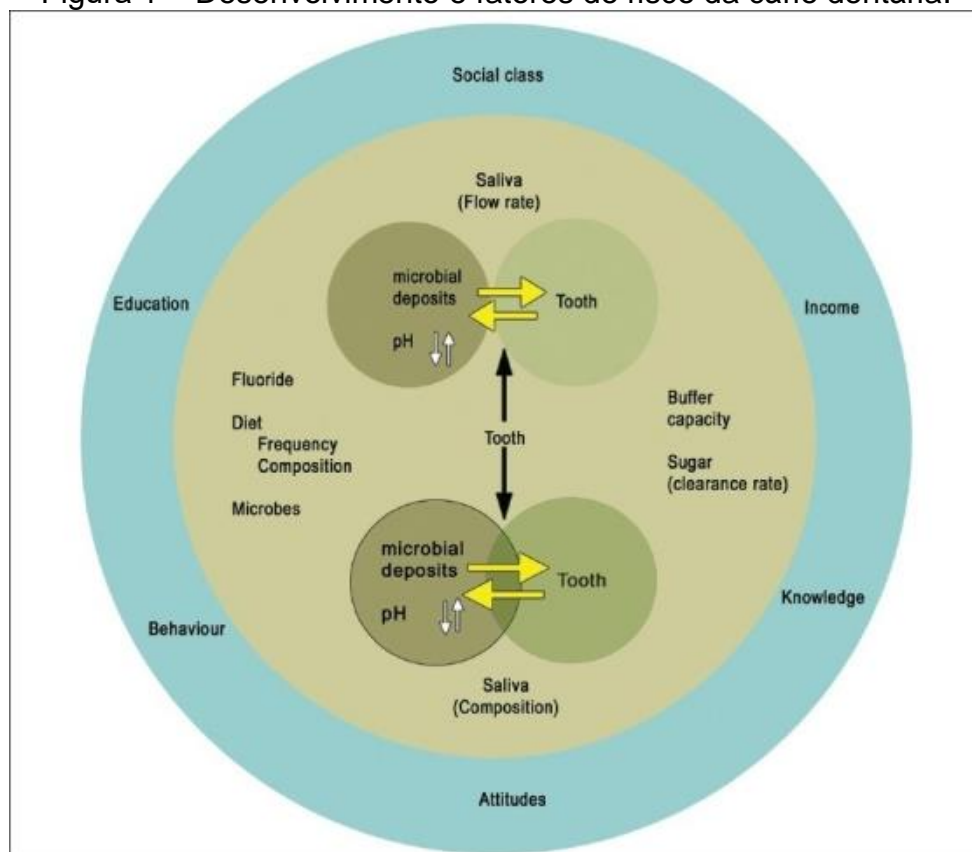
A saliva do hospedeiro também contribui para a estabilidade do ecossistema, protegendo o ambiente bucal, fornecendo nutrição para a comunidade e fatores antimicrobianos que são antagônicos para espécies exógenas (LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018). Isso envolve a manutenção de um pH favorável para o crescimento microbiano, a remoção de substratos exógenos e a provisão de um fornecimento contínuo de nutrientes endógenos para a microbiota oral residente benéfica, muitos dos quais têm um pH ótimo em torno da neutralidade para o crescimento (MARSH *et al.*, 2016).

1.2 Processo de desmineralização e cárie

A cárie dentária é atualmente considerada uma disbiose que envolve interações entre a estrutura dentária, biofilme microbiano e exposição de açúcar, onde 35% dos casos não são tratados em todo o mundo. A cárie precoce de infância (CPI) se caracteriza a presença de cárie em crianças com até 6 anos de idade. (GIACAMAN, 2017; PITTS *et al.*, 2017)

A cárie dentária é a doença mais prevalente no mundo atingindo todas as idades e classes sociais, afetando cerca de 90% da população mundial. Em países menos favorecidos socioeconomicamente quase todas as lesões de cárie permanecem sem tratamento. (BENZIAN *et al.*, 2012). Seu desenvolvimento e fatores de risco estão representados na figura 1.

Figura 1 – Desenvolvimento e fatores de risco da cárie dentária.



Fonte: Carounanidy Usha, *et al.* J Conserv Dent. 2009 Apr-Jun;12(2):46-54.

Apesar dos esforços empreendidos pela comunidade odontológica no controle da cárie dentária, a mesma continua preocupando os pesquisadores, em especial nos países menos desenvolvidos. A etiologia da cárie sempre foi bastante estudada, inclusive

considerando novos fatores que influenciam seu desenvolvimento, tais como os socioeconômicos, demográficos e cognitivos (FEITOSA *et al.*, 2003).

Quando expostos a uma dieta rica em açúcar, comensais do grupo Streptococci metabolizam os carboidratos e produzem ácidos que vão desmineralizar a estrutura dentária. Entre os agentes que irão participar desse processo, os *S. mutans* destacam-se por terem o mecanismo de ação confirmado em relação à sacarose e à cárie dentária. Essa espécie é capaz de sobreviver, proliferar e produzir ácidos. Além disso, possuem glicosiltransferases, que são enzimas que permitem os mesmos formarem diversos polímeros extracelulares de açúcares e possuem adesinas permitindo, assim, as bactérias aderirem à estrutura dentária a à outras espécies do biofilme. (PITTS *et al.*, 2017)

Apesar de não ser o agente etiológico, um aumento do número de *S. mutans* pode ser considerado um fator de risco para o início da lesão, o que torna esse grupo de bactérias, que são acidúricas e acidófilas, associadas ao desenvolvimento da lesão cariada, sendo assim um indicador de desequilíbrio da microbiota. Mesmo existindo mecanismos fisiológicos na boca, como a saliva, que vai auxiliar na remineralização, quando há um consumo de açúcar muito frequente na dieta, um desequilíbrio ecológico da microbiota bucal pode ocorrer. (GIACAMAN *et al.*, 2010; ERIKSSON *et al.*, 2017)

Na prevenção da cárie dentária em saúde pública, devem ser implementadas abordagens e promoção de comportamento saudáveis, além de políticas como a fluoretação da água pública e estratégias em grupos de alto risco, com acesso restrito aos serviços odontológicos e fluoretos. (PITTS *et al.*, 2017)

1.3 Doenças gengivais

A gengivite é uma alteração bucal dos tecidos moles frequente em pacientes sob tratamento ortodôntico. Caracteriza-se como sendo uma inflamação da gengiva marginal de caráter reversível. Clinicamente pode-se observar uma gengiva vermelha e edemaciada com sangramento espontâneo ou após sondagem. (SAMAH *et al.*, 2014)

O biofilme se desenvolve sobre a superfície dentária e é composto de diferentes espécies de microrganismos, inicialmente formados por bactérias gram positivas e aeróbias, mas posteriormente, há uma colonização sequencial de microrganismos gram negativos e anaeróbios. O tecido gengival marginal começa a desenvolver uma resposta

inflamatória provocada pelas toxinas liberadas dos microrganismos presentes no biofilme. Essa resposta acontece quando são liberadas substâncias no organismo, como a histamina, além de ocorrer produção de substâncias inflamatórias que aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos. A manutenção prolongada do processo inflamatório nos tecidos, designada inflamação crônica, pode promover sua destruição e perda óssea. Desta forma é necessário que haja uma desorganização constante e eficaz deste biofilme para prevenir essas patologias bucais, já que o biofilme é o fator etiológico principal no desenvolvimento da gengivite. (SILVA *et al.*, 2013)

As intensidades dos sinais e sintomas clínicos podem variar entre indivíduos e entre sítios numa mesma dentição. As características clínicas comuns incluem presença de placa bacteriana, eritema, edema, sangramento, sensibilidade, aumento do exsudado gengival, ausência de perda de inserção, ausência de perda óssea, mudanças histológicas e reversibilidade após a remoção da placa bacteriana (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2009).

A gengivite pode difundir-se por toda a unidade gengival remanescente. Estudos epidemiológicos brasileiros demonstraram uma alta prevalência de inflamação gengival, variando de 74% a 100%, embora a média individual de sangramento gengival varie de 28% para 35%. (LINS *et al.*, 2013)

Recentemente, a classificação para as doenças periodontais, foi atualizada em um grande evento realizado para essa finalidade, o Proceedings do Workshop Mundial para a Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares, em Chicago nos Estados Unidos. A nova classificação define a saúde periodontal como a ausência de inflamação clinicamente detectável e a gengivite como uma inflamação específica do local e desencadeada pelo acúmulo de biofilme dentário supragengival. A mesma se caracteriza por sangramento gengival (SG), gengiva avermelhada, edema e ausência de perda de inserção. De acordo com os novos conceitos, a saúde gengival clínica pode ser restaurada após o tratamento da gengivite e periodontite. (CHAPPLE *et al.*, 2017; STEFFENS; MARCANTONIO, 2018)

1.4 Flúor e dentifrícios

O flúor foi introduzido na prática clínica odontológica na década de 1970, sendo desde então o principal responsável pelo processo de reparo tecidual e conseqüentemente também relacionado ao declínio da prevalência da cárie dentária na população, principalmente em países desenvolvidos. (BUZALAF *et al.*, 2011).

Muitas vezes, a escovação dentária em casa com dentifrício fluoretado é a única forma de controlar a doença (BENZIAN *et al.*, 2012). Dentifrícios fluoretados, como géis e cremes dentários, são os mais difundidos e principais veículos de flúor utilizados pela população, sendo a forma mais importante e eficaz de controlar a cárie. Sua eficácia é comprovada em diversos estudos *in vitro* e ensaios clínicos desde 1940, sendo o creme dentário seguro independente da concentração alta dos fluoretos (OMS, 2012).

Devido ao fácil acesso aos fluoretos e disponibilidade dos mesmos em diversas formulações, especialmente dentifrícios, a prevalência da doença cárie diminuiu nas últimas décadas. Entretanto, para que o creme dentário apresente eficácia terapêutica no controle dessa doença, é necessário que uma determinada quantidade de fluoreto presente na formulação esteja na forma solúvel e regularmente presente na cavidade bucal. Somente assim o mesmo poderá ter ação evitando a desmineralização e promovendo a remineralização dos tecidos duros dentários. (HASHIZUME *et al.*, 2003)

A recomendação do uso de dentifrício fluoretado para o controle de cárie é fortemente baseada em evidência de dezenas de resultados de estudos clínicos randomizados e controlados em comparação com a escovação usando dentifrício não fluoretado. (CURY *et al.*, 2015)

No Brasil, quase toda a população utiliza cremes dentários formulados com carbonato de cálcio/monofluorofosfato de sódio (MFP). O íon MFP não forma sal insolúvel com os íons cálcio do abrasivo, mas como o mesmo não é estável, durante o armazenamento do creme dentário ocorre a liberação do íon F que irá reagir com o Ca^{2+} formando assim alguns sais de flúor insolúveis. Estes são inativos no processo da desmineralização/remineralização. Devido a essa reação, é necessário que o creme dentário contenha uma concentração mínima de 1000 ppm de F solúvel para que apresente atividade anticárie. Entretanto, a legislação brasileira apenas estabelece a concentração máxima de 1500 ppm de fluoreto, sem nenhuma exigência quanto à

solubilidade, levantando assim preocupações em relação a disponibilidade do flúor solúvel (ANVISA, 2000; WALSH *et al.*, 2010; RICOMINI FILHO *et al.*, 2012).

No âmbito odontológico, dentifrícios ou colutórios bucais têm sido combinados ao flúor e a substâncias com atividade biológica ativa a fim de realizar atividade antimicrobiana, entre eles destaca-se a própolis. (MODESTO *et al.*, 2001) Diversos são os dentifrícios desenvolvidos com a incorporação de produtos antimicrobianos, alguns de origem natural. (LOBO *et al.*, 2014).

A incorporação de produtos naturais em formulações sempre foi bastante utilizado pela indústria farmacêutica como alternativa aos medicamentos tradicionais, existindo assim uma busca constante por produtos seguros com atividade biológica e seguros. (GEORGE; KASLIWAL *et al.*, 2017)

1.5 Produtos Naturais e Odontologia

O uso de produtos naturais pelo ser humano como alternativa terapêutica remonta a idade antiga e os mesmos são essenciais na produção de novos fármacos, fato que tem levado os pesquisadores a buscar alternativas com substâncias com atividade biológica. Na Odontologia, as pesquisas com produtos naturais têm aumentado, devido à busca por novas substâncias com maior atividade farmacológica, com menor toxicidade, maior biocompatibilidade, além de apresentarem valor mais acessível à população. (LOBO *et al.*, 2014; VALADAS *et al.*, 2019)

Nos últimos anos, na busca de novas substâncias com potencial farmacológico e biocompatíveis, observa-se um aumento no número de estudos quanto ao uso de produtos naturais em Odontologia, desenvolvimento de materiais com propriedades biológicas ativas e alternativas para o manejo de doenças bucais em especial às relacionadas ao biofilme. (FREIRES *et al.*, 2015)

Por diversas gerações, a humanidade se beneficiou de medicamentos naturais para tratar ou prevenir diversas doenças. Assim, metabólitos de plantas, microrganismos e produtos marinhos têm sido considerados fontes valiosas de novas moléculas com potencial para o desenvolvimento de drogas em inúmeras áreas biomédicas. Diversas são as condições que afetam a saúde bucal que podem ser evitadas, aliviadas ou tratadas com o uso de medicamentos ou formulações à base de produtos naturais. (FREIRES; ROSALEN, 2016)

Na Odontologia, apesar dos estudos e desenvolvimento destes fármacos ainda se apresentarem em fase inicial, eles vêm crescendo ao longo dos últimos anos e buscam por substâncias que possam atuar nos microrganismos relacionados à cárie dentária e a doença periodontal. (FREIRES *et al.*, 2016)

Nas últimas duas décadas houve um desenvolvimento limitado de produtos para cuidados bucais. Isso se deve principalmente por etapas químicas inconclusivas, escassez de ensaios clínicos ou estudos mal elaborados, falta de trabalho multidisciplinar e colaborativo, bem como de parceria e investimento da indústria neste setor. Assim, mais pesquisas devem ser necessárias nos campos de toxicologia e farmacologia clínica, de modo a preencher a lacuna entre o potencial *in vitro* e *in vivo* de novos agentes fitoterápicos e sua eficácia clínica e segurança em humanos. (FREIRES; ROSALEN, 2016)

Apesar da limitação do desenvolvimento final de produtos, existe um crescente interesse nos produtos naturais que poder ser potenciais agentes farmacológicos em Odontologia. Muitos desses produtos naturais já foram incorporados a enxaguatórios bucais, dentífricios ou gomas de mascar, onde a maioria pertence a compostos de polifenol. Um polifenol é qualquer substância que contenha pelo menos um anel aromático com 1 ou mais grupos hidroxila, os mesmos são derivados de diferentes tipos de produtos naturais, e experimentos *in vitro* indicaram que alguns deles poderiam ser eficazes como antimicrobianos. (CHENG *et al.*, 2015)

1.6 Própolis

Entre um dos produtos naturais de grande destaque encontra-se a própolis vermelha brasileira se apresenta como um complexo resinoso responsável pelo selamento das colmeias de abelhas (*Apis mellifera*), sendo proveniente da coleta delas em diversos tipos de vegetais. A própolis é resultado da mistura de substâncias de origem resinosa que as abelhas coletam dos brotos, pólen, entre outros e a secreção salivar das mesmas. Assim, a própolis é utilizada como um selante, preenchendo assim os espaços indesejados espaços abertos na colmeia, vedando e isolando a mesma de baixas temperaturas, insetos e até mesmo de outras espécies de abelhas. (LOTTI *et al.*, 2010).

A própolis é uma mistura complexa formada por um material resinoso e balsâmico, não tóxico que é coletada pelas abelhas em diferentes partes da planta que associados às secreções salivares e enzimas dessas abelhas constituem esse material

rico em propriedades biológicas. Esta mistura complexa é utilizada pelas abelhas para proporcionar o fechamento da colmeia e para sua assepsia, através de sua ação antimicrobiana. Devido à sua atividade biológica e quantidades de constituintes químicos, a própolis é utilizada há séculos na medicina tradicional, inclusive para doenças bucais como uma alternativa terapêutica. (LUSTOSA *et al.*, 2008; SALATINO, 2018)

A literatura reporta pelo menos 200 tipos de compostos identificados na Própolis, a partir de amostra geográficas diferentes e da diversidade botânica. A caracterização química do Própolis padronizou constituintes como: ácido fenólico prenilado, lignanas, terpenos e alcoóis terpênicos, além de derivados p-curmarinicos (ANAUATE NETTO *et al.*, 2013; FREIRES *et al.*, 2016).

A composição química do extrato de própolis varia de acordo com a vegetação ao redor da colmeia. Normalmente, as própolis são compostas por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleo essencial e compostos aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (ARAUJO *et al.*, 2011).

Diversos são os tipos de própolis e a classificação e cor variam também de acordo com a vegetação. No Brasil existe o registro de 13 tipos diferentes de própolis que variam com as propriedades físico-químicas e localização geográfica. A mais recente, que é a própolis vermelha, foi classificada como tipo 13 com base na sua composição química única que é conhecida por seu alto conteúdo de isoflavonóide, em especial o neovestitol e vestitol. (SILVA *et al.*, 2013)

A biodiversidade botânica da região onde é produzida influencia na cor, odor e textura da própolis, bem como nas suas características químicas (SALATINO, 2018). A composição química da própolis é sujeita a variações baseadas na biodiversidade botânica, sazonalidade e localização geográfica. No geral é composta por resina, cera, óleos essenciais, pólen e outros compostos orgânicos, entre eles flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, ácidos aromáticos, etc. As atividades terapêuticas podem ocorrer através do sinergismo destes compostos químicos (Barbosa *et al.*, 2014). Além disso, a própolis contém minerais como Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn, e Fe e algumas vitaminas como A, B1, B2, B6, C, e E. (GUIDA *et al.*, 2016; ALI *et al.*, 2014)

As substâncias biologicamente ativas da maioria dos tipos de propolis correspondem aos compostos fenólicos, como flavonoides. A própolis brasileira mais produzida é a própolis verde, derivada da *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). É

consumida no país e exportada para vários países, principalmente para o Japão e China. (SALATINO, 2018).

A origem botânica da própolis vermelha brasileira é a *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taud. (Leguminosae), que é característica por seus pigmentos coloridos, sendo responsável pela cor vermelha da própolis. As abelhas *Apis mellifera* coletam o exsudado vermelho da superfície dos buracos feitos por insetos no tronco de *D. ecastophyllum* para fabricar a própolis. Esse tipo de própolis pode ser encontrado em colmeias localizadas no caule de manguezais e nas costas marinhas e fluviais nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia, localizados no Nordeste do Brasil. A própolis vermelha do estado de Alagoas obteve recentemente a Indicação Geográfica (IG) do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), que é o único produtor deste tipo de própolis em todo o mundo (FREIRES; ROSALEN, 2016).

Figura 2 – Própolis vermelha



Fonte: <https://www.naturebasdecampos.com.br>

É grande o interesse da indústria farmacêutica e cosmética quanto às propriedades biológicas da própolis vermelha brasileira, sendo bastante procurada em países como Japão, China, Rússia, França, Alemanha e Brasil. Sendo assim a própolis se encontra com produção e consumo em expansão no mercado nacional e internacional, além de uma modernização cada vez maior dos produtos derivados e crescente interesse na padronização dos produtos. (NASCIMENTO *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2018; SALATINO, 2018)

A própolis se apresenta como uma resina responsável pelo selamento das colméias de abelhas da espécie *Apis mellifera*, sendo proveniente da coleta delas em

diversos tipos de vegetais. Sabe-se da existência de pelo menos 200 tipos de compostos identificados na própolis, a partir de amostra geográficas diferentes e da diversidade botânica. A caracterização química da própolis padronizou constituintes como: ácido fenólico prenilado, lignanas, terpenos e alcoóis terpênicos, além de derivados p-curmarinicos. (ANAUATE NETTO *et al.*, 2013)

A própolis vermelha brasileira se destaca quanto à quantidade de isoflavonóides, especialmente o vestitol e neovestitol, a biodiversidade brasileira favorece a constituição química. Diversas são as propriedades farmacológicas documentadas como a antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-parasitária, anti-inflamatória, entre outras. Estudos comprovam que mesmo em baixas concentrações (0,1 - 1,0%) a própolis já demonstra atividade e o neovestitol tem atividade na redução da inflamação aguda, reduzindo a migração de neutrófilos. (FRANCHIN *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2018; PORTO *et al.*, 2018)

O Neovestitol e Vestitol são compostos bioativos da própolis vermelha brasileira que exibem diversas atividades farmacológicas, destacando-se as anti-inflamatórias e antimicrobianas, podendo ter potencial de ação em dose e concentração. As isoflavonas, como são classificados o neovestitol e vestitol, podem modular os processos de inflamação, tais como os que envolvem as doenças periodontais e alterações de tecidos moles. (SILVA *et al.*, 2013)

O Neovestitol e Vestitol são compostos bioativos da própolis vermelha brasileira que exibem atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, podendo ter potencial de ação em dose e concentração. As isoflavonas, como são classificados o neovestitol e vestitol, podem modular os processos de inflamação, tais como os que envolvem as doenças periodontais e alterações de tecidos moles. (SILVA *et al.*, 2013)

1.7 Própolis e Odontologia

Dentro do campo da Odontologia, devido à complexa microbiota bucal e sua relação com patogenias, as pesquisas concentram seus estudos no efeito antimicrobiano e/ou anti-inflamatório de extratos naturais, como o *Aloe Vera*, extrato de caju, extrato de folha de goiaba, extratos de folhas de nim, extratos de semente de uva, própolis (LUCA *et al.*, 2014; NOUSHAD *et al.*, 2018).

Diversos estudos comprovam o efeito terapêutico extrato de própolis sobre diversos microorganismo do biofilme dentário, além de apresentar-se como uma opção

clínica de baixa toxicidade. (SILVA *et al.*, 2013) Esse produto é veiculado em formulações como cápsulas, extratos, géis, dentifrícios, sprays, enxaguatório bucal, entre outros. Possuindo assim propriedades antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, antioxidante, antitumoral dentre outras (LUSTOSA *et al.*, 2008; SALATINO, 2018).

A própolis age diretamente contra microrganismos como: *S.mutans*, *Lactobacillus*, *S. Aureus*, *C. Tropicalis*, *C. Albicans*, *C. Guilliermondii*, *C. Parapsilosis*, *S. Typhimurium*, *E. Coli*. Microrganismos esses que possuem relação direto-indireta a patologias da cavidade oral, sendo causadores ou coadjuvantes em seu desenvolvimento. Além disso, são relatados efeitos: antioxidantes, antimicrobianos, antiparasitarios e citotóxicos do material. (GAVANJI; LARKI, 2015; SILVA *et al.*, 2017).

Estudos também comprovam o efeito terapêutico extrato de Própolis sobre inibição microbiana de agentes cariogênicos, além de apresentar-se como uma opção clínica de baixa toxicidade. (SILVA *et al.*, 2013) A inibição microbiana de agentes cariogênicos está relatada em diversos estudos, além disso, ele se apresenta como uma opção clínica de baixa toxicidade e biocompatibilidade. (PAULA *et al.*, 2006; LIBERIO *et al.*, 2009).

Em Odontologia, especialmente no controle do biofilme, a própolis se destaca com seu amplo espectro antimicrobiano gram – positivo e gram – negativo contra colonizadores do biofilme dentário, como *S.mutans*, *Lactobacillus*, *P. gingivalis*, *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* (CHINSEMBU, 2016; FREIRES *et al.*, 2016). Devido à alta concentração de flavonóides, o extrato apresenta potente atividade farmacológica em baixas concentrações, como 0,1%, possuindo atividade antimicrobiana e anti-inflamatória comprovada *in vitro* e *in vivo*. (FREIRES *et al.*, 2016; PORTO *et al.*, 2018)

Estudos também comprovam o efeito terapêutico extrato de Própolis sobre inibição microbiana de agentes cariogênicos, além de apresentar-se como uma opção clínica de baixa toxicidade. O Neovestitol e Vestitol são compostos bioativos da PVB que exibem atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, podendo ter potencial de ação em dose e concentração. As isoflavonas, como são classificados o neovestitol e vestitol, podem modular os processos de inflamação, tais como os que envolvem as doenças periodontais e alterações de tecidos moles. (SILVA *et al.*, 2013)

A própolis tem sido objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos nos últimos 30 anos. Em várias partes do mundo é indicada para melhorar a saúde e prevenir

doenças. Encontra-se disponível em várias formas farmacêuticas como cápsulas, extratos, enxaguatório bucal e na forma de pó. Possui propriedades antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, antioxidante, antitumoral dentre outras. As isoflavonas, particularmente neovestitol e vestitol, que são compostos bioativos da própolis, exibem atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, podem ter aplicação terapêutica potencial para modular processos inflamatórios, como os envolvidos com doenças periodontais. (SILVA *et al.*, 2013)

Diversos estudos comprovam o efeito terapêutico extrato de própolis sobre inibição microbiana de agentes cariogênicos e periodontais, além disso, ele se apresenta como uma opção clínica de baixa toxicidade e biocompatibilidade. (PAULA *et al.*, 2006; LIBERIO *et al.*, 2009)

A resistência aos antimicrobianos sintéticos e a busca por substâncias com propriedades biológicas com menores efeitos adversos aumentou o interesse por produtos naturais. Mais de cem milhões de moléculas estão catalogadas em todo o mundo e muitas ainda estão inexploradas. (LOBO *et al.*, 2014; CHINSEMBU, 2016; FREIRES; ROSALEN, 2016) A alta demanda e o investimento na biotecnologia de produtos derivados de abelhas contribuiu para o lançamento de diversos produtos no mercado, destacando-se especialmente o mel e própolis. (CHINSEMBU, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2016)

1.8 Acúmulo de biofilme e aparelhos

A presença de aparelhos fixos na cavidade oral pode alterar moderadamente a natureza do biofilme dentário, visto que sua presença pode dificultar a higienização oral efetiva e causar um alto desafio cariogênico. Além disso, a microbiota subgingival também pode ser influenciada, uma vez que acessórios ortodônticos favorecem a retenção do biofilme bacteriano. (FREITAS *et al.*, 2014)

A terapia ortodôntica fixa é a modalidade terapêutica mais indicada no tratamento das más oclusões. Apesar da eficácia comprovada dos aparelhos ortodônticos, os mesmos são fatores retentivos de biofilme, criando áreas de estagnação, estimulando o acúmulo de biofilme. Assim o uso de aparelhos, normalmente causa alteração da composição da microbiota bucal e aumenta o risco de cáries e gengivites. (BILGIC *et al.*, 2016; PITTS *et al.*, 2017; CANALES *et al.*, 2018)

A colocação de aparelhos ortodônticos fixos constituídos por metais e polímeros é acompanhada pela criação de superfícies com propriedades estranhas àquelas do

ambiente oral natural. Somando-se a isso, o número de sítios de retenção de biofilme é maior em pacientes ortodônticos e a presença do aparelho reduz consideravelmente a eficácia das forças naturais de limpeza bucal e a remoção do biofilme por escovação. Essas características não só causam aumento na quantidade de biofilme, mas também aumentam a prevalência de bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans* e bactérias periodontopatogênicas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forysthia* e espécies de *Fusobacterium*. A presença do biofilme também pode afetar o próprio aparelho e causar corrosão, afetando propriedades mecânicas, rugosidade ou topografia de adesivos compostos. (REN *et al.*, 2014)

O material dos aparelhos também influencia na composição das proteínas presentes nos meios biológicos bucais, sendo comum mudanças associadas a processos inflamatórios e do biofilme também. (CANALES *et al.*, 2018) Estudos microbiológicos indicam que em braquetes de aço inoxidável, plástico, cerâmico, titânio e ouro, ocorre a aderência de microrganismos nesses materiais, especialmente *S. mutans* e *C. albicans* (RAMMOHAN *et al.*, 2012).

Métodos mecânicos são os meios mais eficazes no controle do biofilme dentário, entretanto o uso adicional de agentes químicos no controle mecânico oferece diversas vantagens na prevenção e controle do índice de placa pois o flúor por si só não reduz o acúmulo de biofilme dentário. (JEPSEN *et al.*, 2017)

Durante o tratamento ortodôntico é frequente o aumento da desmineralização dentário e surgimento de lesões de cárie, variando entre 30 a 70% dos pacientes. No estudo de Cardoso *et al.* (2017) foram avaliados os parâmetros salivares em pacientes em tratamento ortodôntico e constataram uma diminuição da capacidade tampão após 3 meses do início do tratamento. Em indivíduos que não desenvolveram lesões de cárie houve um aumento do pH e o fluxo salivar foi aumentado no primeiro mês de tratamento.

Aparelhos ortodônticos dificultam a higienização do meio bucal, contribuindo para a formação de cáries e gengivites. O acúmulo de biofilme por aparelhos ortodônticos é amplamente conhecido, sendo mais evidente em crianças, adolescentes e adultos jovens, onde a microbiota muda consideravelmente após a instalação dos mesmos (PEDRON *et al.*, 2010). Além disso o tratamento ortodôntico está associado à inflamação devido à constante movimentação ortodôntica e a dificuldade na manutenção de higiene, frequentemente levando à gengivite. (ZOGAKIS *et al.*, 2018)

O controle do biofilme nos braquetes é um dos grandes desafios no tratamento ortodôntico, onde dados mostram uma incidência de lesões cariosas em quase 50% dos pacientes em tratamento. Além de causar a desmineralização esse acúmulo interfere na inflamação gengival visto que existe uma íntima relação do periodonto com o biofilme na superfície dentária, que ao longo do tempo pode atingir a área subgengival. (RASZL-HENRIQUE *et al.*, 2018)

Na microbiota desses pacientes com inflamação gengival e desmineralização existem espécies de bactérias que também já são encontradas em indivíduos saudáveis, entretanto a quantidade das unidades formadoras de colônia são bem maiores, especialmente de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) em adultos e jovens. Cabe ressaltar que essas alterações são transitórias e ocorrem devido a presença do aparelho ortodôntico que é um fator retentivo de biofilme, após a remoção e retorno da facilidade de higienização a microbiota tende a normalizar. (RASZL-HENRIQUE *et al.*, 2018)

Para a desorganização do biofilme dentário é frequente os ortodontistas prescreverem substâncias antimicrobianas que associadas à escovação mecânica poderão auxiliar no controle do biofilme. A clorexidina é o produto mais prescrito, entretanto são fracas as evidências do seu efeito após 3-4 semanas, além de efeitos adversos como manchamento dentário e alteração do paladar. (AL-BAZI *et al.*, 2016; AL-FAHD, 2016; TANG *et al.*, 2016)

Estudos apontam que o uso de aparelhos altera a homeostase do meio bucal, onde os parâmetros como pH, capacidade tampão, proteínas, testes microbiológicos, podem ser úteis para identificar essas possíveis alterações. (BILGIC *et al.*, 2016; MOUSSA *et al.*, 2017; CANALES *et al.*, 2017)

1.9 Antimicrobianos em Ortodontia

Os efeitos colaterais do tratamento ortodôntico podem ser reduzidos pelo uso de biomateriais com menor formação de biofilme. Alterações nesta variável podem facilitar a prevenção de cárie e gengivite. Vários estudos clínicos indicam que a natureza do biomaterial usado tem um impacto significativo na formação de biofilme. Acredita-se que as propriedades físico-químicas das superfícies sejam responsáveis por uma influência na aderência e no acúmulo de bactérias. (DITTMER *et al.*, 2015)

Estudos reportam o uso de produtos antimicrobianos no controle da doença periodontal, em formulações como dentifrícios e enxaguatórios, indicados especialmente no controle da gengivite em crianças e adolescentes. (CAGETTI *et al.*, 2015)

Pesquisas comprovam a eficácia da remoção mecânica do biofilme por escovação e uso do fio dental na prevenção de lesões de mancha branca e problemas periodontais em pacientes que fazem o uso de aparelhos ortodônticos fixos. No entanto, o controle químico deve ser realizado quando o controle mecânico não pode ser executado adequadamente. A literatura apresenta inúmeras substâncias antimicrobianas para o controle químico terapêutico ou profilático, diferindo em natureza química, mecanismo de ação, apresentação clínica e eficácia (DIAS *et al.*, 2018). É importante salientar que os agentes químicos de controle de placa devem ser usados como meios adjuvantes e não como substitutos do controle mecânico de placa. (SHAH *et al.*, 2019).

A clorexidina é o antimicrobiano mais utilizado no tratamento da gengivite, sendo bastante eficaz, entretanto devido os efeitos colaterais como alteração do paladar, manchamento dentário, recolonização, irritação da mucosa, entre outros, busca-se substâncias com eficácia mas com menores efeitos adversos. (LOBO *et al.*, 2014; GÓES *et al.*, 2016) O digluconato de clorexidina (CHX) provou ser eficaz e selecionado como agente terapêutico químico padrão ouro para esse fim. Seu mecanismo de ação está relacionado à sua carga catiônica, que se liga às paredes celulares microbianas e a outros complexos, alterando o equilíbrio osmótico do organismo, levando à morte celular. Entretanto, seu uso contínuo está relacionado com diversos efeitos colaterais locais, como coloração acastanhada dos dentes e mucosa oral, distúrbios do paladar e, em casos graves, hipersensibilidade e estenose do ducto parotídeo. Em decorrência desses efeitos secundário, foi necessário o desenvolvimento de agentes químicos antiplacas alternativos (DIAS *et al.*, 2018; SHAH *et al.*, 2019).

Dias *et al.* (2018) buscou avaliar por meio de um estudo *in vitro* a ação antimicrobiana do digluconato de clorexidina (CHX) em braquetes metálicos autoligáveis e convencionais infectados com biofilme de *Streptococcus mutans*. Os resultados indicaram que a CHX apresentou efeito inibitório sobre o *S. mutans* em ambos os braquetes, indicando os benefícios desta prescrição como um adjuvante para o controle do biofilme em pacientes que estão sob o tratamento ortodôntico.

Alguns enxaguatórios bucais estão sendo desenvolvidos utilizando probióticos com bactérias comensais naturais para fornecer um sistema de defesa natural contra

bactérias nocivas. O uso de probióticos não causa resistência a antibióticos e não possui efeitos colaterais relatados na literatura. SHAH *et al.* (2019) realizou um estudo randomizado e controlado comparando os efeitos antiplaca, antigengivite e anti-*Streptococcus mutans* de bochechos com probiótico e clorexidina. Os resultados mostraram que os probióticos são tão eficazes quanto a clorexidina como adjuvante químico no controle do biofilme. Os achados sugerem que o enxágue bucal com probiótico é eficaz na redução do acúmulo de placa, manutenção da saúde gengival e que seu uso diário poderia reduzir os níveis de *S. mutans* na saliva de pacientes sob tratamento ortodôntico.

Estudos sugerem que o uso de colutórios bucais à base de plantas é mais seguro do que compostos químicos, como a clorexidina, visto que seu uso prolongado acarreta em efeitos colaterais, dentre eles o gosto desagradável, secura e sensação de queimação na boca, levando à insatisfação do paciente. Uma pesquisa avaliou e comparou a atividade antimicrobiana do extrato de *Zataria multiflora* e da CHX contra a colonização microbiana em módulos de ligaduras elastoméricas experimentalmente contaminadas. Os resultados mostraram atividade antimicrobiana significativa do extrato de *Zataria* sobre *S. albicans*, *S. mutans* e *E. feacalis* com atividade antimicrobiana máxima observada contra a *C. albicans*. Dessa forma, o extrato de *Zataria multiflora* mostrou atividade antimicrobiana para desinfecção de ligaduras elastoméricas. (AGHILI; NADOUSHAN; HERANDI, 2015)

Estudos demonstraram que a prata é um importante agente antibacteriano, apresentando boa biocompatibilidade e baixa toxicidade para as células humanas, além de causar menos resistência bacteriana quando comparada aos antibióticos convencionais. Foi sugerido que seu mecanismo de ação é por meio da inativação enzimas vitais das bactérias, causando danos ao DNA bacteriano e culminando na perda da capacidade replicativa e sua morte celular. O uso de cimentos de ionômero de vidro modificados por resina contendo a adição de 0,1% de NAg foi capaz de inibir bactérias na superfície e distante da superfície do meio de cultura, sugerindo ser um material promissor para combater lesões de mancha branca abaixo e distante dos braquetes ortodônticos. (WANG; WANG; WANG, 2015)

1.10 Saliva como meio de diagnóstico

A saliva é uma secreção exócrina clara, levemente ácida (pH 6 a 7) e mucosa. É composta por 99% de água, eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, cloreto, magnésio,

bicarbonato, fosfato), imunoglobulinas, mucinas e outras proteínas. Glicose e produtos nitrogenados (uréia e amônia) também estão presentes na saliva. O fluxo e componentes salivares variam durante o dia. Por exemplo, o fluxo baixo circadiano ocorre durante o sono e tem um pico durante os períodos de estimulação. O fluxo de saliva não estimulada atinge um valor máximo em torno de 15h30 e é praticamente nula durante o sono. Além disso a idade do indivíduo pode alterar a concentração dos constituintes salivares. (CANALES, 2018)

Trata-se de um material complexo, como citado anteriormente, constituído por água e componentes orgânicos e inorgânicos e contém tampões, enzimas, fatores de crescimento, citocinas, imunoglobulinas, mucinas e outras glicoproteínas. A saliva possui vários sistemas de defesa, e desempenha diversas funções importantes, como lubrificação, atividade antimicrobiana, fatores de crescimento, manutenção da integridade da mucosa, lavagem e limpeza da superfície da mucosa e dos dentes, propriedades tamponadas e mineralização. Além disso, auxilia na preparação de alimentos ingeridos, mastigação e digestão, paladar e fala. (AHARI *et al.*, 2016)

Devido a todos esses fatores, a saliva é considerada um dos fluidos corporais mais versáteis e complexos, apresentando diversas funções fisiológicas, atuando no processo digestivo, fisiologia esofágica, lubrificação oral e na proteção de células gástricas e cavidade oral de fatores externos como vírus e bactérias, por digestão e inibição do seu crescimento. A mesma é composta por aproximadamente 2000 proteínas, onde 597 dessas são observadas também no sangue. Por isso tem sido considerado seu grande potencial para diagnóstico e acompanhamento clínico de doenças hereditárias, neoplasias, doenças autoimunes e doenças orais como a doença periodontal e cárie. (AZEVEDO, 2018)

As principais classes de proteínas encontradas na saliva são as proteínas ricas em prolina, mucinas, alfa amilase (proteína mais abundante), cistatinas salivares, histatinas, e estaterina. Em menor percentagem temos as lipocalinas (secretadas pelas glândulas minor), timosinas beta e alfa-defensinas. (AZEVEDO, 2018)

A saliva pode ser considerada um espelho da saúde oral e sistêmica, sendo uma valiosa fonte de biomarcadores específicos de doenças bucais, como cáries e gengivites. Mudanças na composição desses biomarcadores podem ser utilizadas na decisão diagnóstica e identificação de doenças. (GIANOBILE *et al.*, 2009; GOMAR-VERCHER *et al.*, 2014)

A possibilidade de identificar marcadores microbiológicos, imunológicos, farmacológicos, entre outros, explorando assim os componentes salivares faz com que cada vez mais a saliva seja utilizada como material de diagnóstico bucal e sistêmico. (SASHIKUMAR; KANNAN, 2010) Em estudos de eficácia clínica a análise salivar identifica biomarcadores de certas doenças e pode ser uma excelente ferramenta para acompanhar o progresso durante o tratamento. (GIANNOBILE *et al.*, 2009)

Pesquisas relacionadas ao diagnóstico da doença periodontal estão atualmente investigando o uso de fluidos orais, como a saliva, para avaliação da doença. Facilmente coletados e contendo biomarcadores locais e sistêmicos da doença periodontal, os fluidos orais oferecem uma base para testes diagnósticos específicos do paciente para a doença periodontal. (CAROLINA *et al.*, 2017)

O fluxo salivar, outro parâmetro importante, é uma propriedade importante da saliva, tendo função essencial na saúde bucal. Sabe-se que o aumento do fluxo salivar promove limpeza física da saliva, aumenta suas propriedades antimicrobianas e acelera a eliminação de substratos, tendo a baixa secreção mudanças negativas na saúde bucal. Sendo assim, mudanças no fluxo salivar podem ser consideradas uma resposta fisiológica à presença de aparelhos ortodônticos fixos, já que a introdução desses aparelhos altera a homeostase do meio bucal. (ARAB *et al.*, 2016) A quantidade de saliva é definida pela taxa de fluxo salivar, enquanto sua qualidade é definida pelo seu conteúdo de proteína salivar e sua viscosidade. O fluxo salivar pode ser calculado dividindo-se o volume de saliva com o tempo da coleta. Existem dois tipos de saliva, a estimulada e a não-estimulada. (SANCHEZ; HONORES, 2015)

1.11 Alterações salivares e aparelhos ortodônticos

O movimento dentário ocorre em resposta a forças ortodônticas e isso gera respostas biológicas, envolvendo citocinas e quimiocinas inflamatórias nesse processo. Assim existe uma exacerbação de marcadores inflamatórios durante o tratamento ortodôntico, além disso alterações microbiológicas e periodontais são frequentes. (ALIKHANI *et al.*, 2015; ARAB *et al.*, 2016)

Estudos indicam alterações de biomarcadores em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico, como mucina, amilase e outras proteínas, incluindo também interleucinas, fator de necrose tumoral- α , fator de crescimento transformador β 1, proteoglicanos, prostaglandina E, fosfatases ácida e alcalina, entre outros. Por exemplo, as

imunoglobulinas (Ig) são importantes fatores específicos de defesa da saliva. Das diferentes classes de imunoglobulinas, IgA, IgG e IgM influenciam a microbiota oral ao interferir na aderência das bactérias ou inibir o metabolismo bacteriano, sendo a IgA a imunoglobulina predominante a este respeito. Assim, pacientes com doença periodontal demonstraram ter maiores concentrações salivares de IgA, IgG e IgM específicos para os patógenos periodontais em comparação com pacientes saudáveis. Além disso, os níveis dessas imunoglobulinas na saliva são bastante reduzidos após o tratamento periodontal. (GIANNOBILE *et al.*, 2009; ALIKHANI *et al.*, 2015; KACZOR-URBANOWICZ *et al.*, 2017)

Sabe-se que a terapia ortodôntica fixa pode afetar a secreção salivar e a viscosidade devido ao aumento do acúmulo de biofilme bacteriano e ao maior nível de dificuldade para a higiene bucal (SANCHEZ; HONORES, 2015). Estudos apontam que os aparelhos ortodônticos diminuem a capacidade de tamponamento da saliva, isso pode ter um envolvimento direto na taxa de lesões ativas de cárie, surgindo assim as frequentes manchas brancas ao redor dos braquetes. Além disso, tem sido sugerido que os braquetes ortodônticos metálicos diminuem o pH salivar e aumentam a colonização por *Streptococcus mutans*. É importante salientar que pacientes sob tratamento ortodôntico estão mais suscetíveis não somente a um maior acúmulo de biofilme, mas principalmente estão sujeitos a importantes alterações bioquímicas e microbiológicas na saliva e no biofilme. (CANALES, 2018)

1.12 Amilase

Entre as diversas enzimas da saliva, a amilase é a mais abundante e sua principal função é a digestão dos carboidratos, sendo um dos principais elementos orgânicos. Além disso, a amilase facilita a adesão de bactérias às superfícies dos dentes, facilitando assim na formação do biofilme dentário. Estudos também indicam que a amilase é secretada devido ao estresse mecânico e psicológico que ocorre durante o tratamento ortodôntico, existindo poucos estudos nesse grupo de pacientes, sendo importante assim entender a relação da atividade da amilase, biofilme e Ortodontia fixa. (TEXEIRA *et al.*, 2012; CARDOSO *et al.*, 2017; CAROLINA *et al.*, 2017)

A enzima amilase é responsável por 10-20% de todas as proteínas produzidas pela glândula parótida, não se restringindo apenas à digestão na cavidade oral. A amilase

também possui importante função na modulação da adesão e crescimento bacteriano em superfícies intra-orais. (ABRÃO, LEAL, FALCÃO, 2014)

Sabe-se que na saliva se encontram diversos biomarcadores, incluindo a amilase, que está associada à doença inflamatória periodontal. Assim estudos utilizam a enzima alfa-amilase como um importante indicador da gravidade da doença periodontal. (CAROLINA *et al.*, 2017) Assim, a amilase, proteína mais abundante, é um dos principais marcadores baseados na saliva que serve como um indicador de estresse que foi investigado na esperança de confirmar a inter-relação entre estresse psicológico e doença periodontal. Os níveis dessa proteína tende a aumentar em indivíduos com doença periodontal. (GIANNOBILE *et al.*, 2009)

O uso dos biomarcadores salivares vem recebendo notoriedade nas últimas décadas. A avaliação da atividade da alfa amilase salivar como indicador de estresse pode substituir exames tradicionais ou ser utilizada como exame complementar. As glândulas salivares respondem de uma maneira mais rápida e são mais sensíveis que o cortisol. Em situações de estresse físico e psicológico a amilase se eleva rapidamente. (OLIVEIRA *et al.*, 2005)

1.13 Interleucina 10

As interleucinas (IL) são constituintes importantes, sendo parte do grupo das citocinas e estão envolvidas na comunicação entre os leucócitos e outras células que participam dos processos imune e inflamatório. Assim, existe uma complexa rede de citocinas pró e anti-inflamatórias agindo nos tecidos periodontais inflamados, onde possivelmente a doença inflamatória seja um desequilíbrio proveniente da maior concentração de citocinas pró-inflamatórias em detrimento das anti-inflamatórias. (LAPPIN *et al.*, 2001; NAKAMA *et al.*, 2012)

A interleucina-10 (IL-10), por exemplo, é uma citocina anti-inflamatória que inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, estimulando a produção de anticorpos e realiza outras funções acessórias, como regular a produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) que promove a reabsorção óssea. (NAKAMA *et al.*, 2012)

A IL-10 é a citocina anti-inflamatória mais potente, pois induz a energia de células T e regula negativamente a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias. (GENG *et al.*, 2018)

Pesquisas demonstram que existe uma forte relação entre a inflamação relacionada à placa bacteriana e respostas imunes inatas do hospedeiro. Isso altera o mecanismo de elementos imunológicos, entre os mesmos as citocinas. Polimorfismos em genes de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa, fator de crescimento transformador beta, interferon gama e IL-10 estão fortemente associados à suscetibilidade às doenças inflamatórias crônicas. (MOUDI *et al.*, 2018)

A IL - 10, é uma citocina anti-inflamatória com importante função nas doenças periodontais. Esta citocina é expressa por várias células, principalmente leucócitos. A IL-10 pode controlar infecções virais e danos nos tecidos relacionados, estimulando a secreção de fatores imunológicos, controlando a fagocitose e a apresentação de antígenos. Além disso, a IL-10 melhora a imunidade inata e adaptativa. (MOUDI *et al.*, 2018)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros bioquímicos e clínicos salivares após uso de um dentífrico incorporado com extrato de Própolis vermelha em pacientes com aparelhos ortodônticos e comparar a um dentífrico fluoretado comum em pacientes com gengivite.

2.2 Específicos

- Dosar a proteína total salivar antes e após a utilização do dentífrico;
- Verificar a atividade da amilase na saliva antes e após a utilização do dentífrico;
- Verificar a atividade da interleucina 10 na saliva antes e após a utilização do dentífrico;
- Medir o pH salivar;
- Estimar o fluxo salivar;
- Quantificar o índice de placa;
- Investigar a aceitação do dentífrico pelos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo, aspectos éticos e população

Trata-se de um estudo longitudinal, em paralelo, randomizado, duplo-cego.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará (número de aprovação 2.551.395), de acordo com a resolução 466/12 de pesquisa com seres humanos e com a Declaração de Helsinki sob princípios éticos para pesquisa médica envolvendo seres humanos. Além disso foi registrado no SISGEN sob cadastro A854028.

A amostra foi dimensionada para demonstrar a superioridade estatística do dentifrício contendo extrato de própolis vermelha em relação ao dentifrício comum no controle do biofilme dentário, considerando um grau de confiança de 90% ($\beta = 0,10$) e ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Para tanto, definiu-se que a taxa de alocação seria de 1, ou seja, os grupos teriam tamanhos iguais. Assim, utilizando-se a expressão própria para estudos de superioridade estatística e considerando que o desfecho primário é uma variável quantitativa, o tamanho da amostra necessário para satisfazer os requisitos precitados foi calculado em 38 sujeitos em cada grupo.

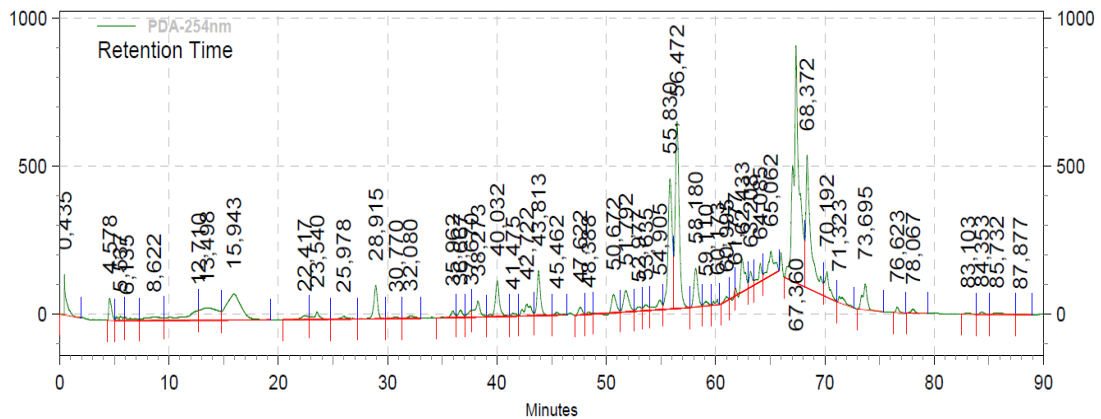
Foi realizada uma busca ativa em escolas públicas de ensino fundamental e médio para a seleção dos participantes. Após a assinatura do consentimento informado dos responsáveis e assentimento dos participantes foram selecionados 76 adolescentes de 12 a 18 anos, de ambos os gêneros, livres de cáries (ICDAS II=0), usuários de aparelho ortodôntico fixo, e com índice de placa visível.

3.2 Extrato de própolis vermelha brasileira e preparação dos dentifrícios

O extrato de própolis vermelha foi coletado da cidade de Marechal Deodoro (Latitude Sul 9° 44.555', Longitude Oeste 35° 52.080' e altitude de 18.1 m acima do nível do mar), região com indicação geográfica concedida pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial, no estado de Alagoas, Brasil. Foi utilizado 150 gramas do extrato de própolis vermelha e dissolvido em 1 L de álcool de cereais de maior graduação. O extrato de própolis vermelha brasileira na concentração de 1% (concentração antimicrobiana previamente estudada) foi incorporado ao dentifrício fluoretado (1500ppm) no laboratório

de Farmacotécnica do curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, Brasil. Após identificação química dos constituintes (Figura 3) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), os dentifrícos foram formulados com mesmo sabor, cor e odor.

Figura 3 – Análise do extrato de própolis vermelha através de HPLC



3.3 Critérios e procedimentos para seleção dos sujeitos

A seleção dos participantes foi realizada no município de Aracati- CE, município sem fluoretação pública de água.

O procedimento inicial consistiu em um esclarecimento sobre as condições nas quais são desenvolvidas as pesquisas clínicas e explicações sucintas do que se trata e quais os procedimentos envolvidos no estudo.

Os participantes que aceitaram participar e que não se enquadram em nenhum dos critérios de exclusão foram atendidos individualmente, para que prestadas informações adicionais relativas ao estudo e esclarecidas todas as dúvidas restantes. Após a coleta de dados pessoais e de saúde geral, os participantes foram submetidos a uma avaliação preliminar de triagem e os que concordaram assinaram o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) e os pais/responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para participação no estudo.

3.4 Examinadores

A seleção de voluntários foi feita pelo pesquisador responsável e um cirurgião-dentista. Foi realizado exame clínico intra-oral para avaliação da condição de saúde bucal e índice de placa visível.

3.5 Critérios de inclusão

Os seguintes critérios foram adotados no processo de recrutamento dos sujeitos:

- Idade entre 12 e 18 anos;
- Uso de aparelho ortodôntico fixo;
- Ser destro;
- Ser normossistêmico.
- Índice de placa visível

3.6 Critérios de exclusão

Foram excluídos sujeitos que:

- Apresentassem alterações sistêmicas relacionados com o processo saúde-doença periodontal;
- Fossem submetidos à terapia antimicrobiana (tratamento com antibiótico e/ou antiinflamatório) até seis meses antes da pesquisa;
- Usuários de drogas lícitas/ ilícitas;
- Fossem portadores de próteses;
- Portadores de menos de 10 elementos dentários por arco dentário;
- Pacientes com história de alergias (asma, urticária, rinite, sinusite);
- Pacientes com história de hipersensibilidade a medicamentos, alimentos ou a outros fatores;
- Pacientes com história de doenças crônicas;
- Gravidez.

3.7 Exame intra-oral de triagem

Este exame intra-oral foi realizado utilizando sonda periodontal, espelho bucal. Durante o procedimento de exame dos dentes, os seguintes parâmetros foram averiguados e anotados no registro:

- Presença de biofilme bacteriano
- Presença de cárie e/ou outras patologias

3.8 Anamnese

Os dados pessoais e referentes ao estado geral de saúde foram coletados, pela pesquisadora responsável e colaboradora, seguindo roteiro estruturado no formulário.

3.9 Restrições e proibições: antes e durante o estudo

Durante a fase de uso do dentifrício os participantes foram orientados a não fazer uso de antibióticos, antiinflamatórios, anticoagulantes, e anticonvulsivantes.

Todavia, em caso de emergência, incluindo efeitos adversos, os participantes que precisassem e sob orientação médica, poderiam receber a administração de medicações, as quais fossem consideradas absolutamente necessárias para o bem-estar dos participantes.

3.10 Critérios para descontinuação

3.10.1 À critério do voluntário

- Voluntário que não desejasse continuar no estudo por razões pessoais (ou mesmo sem razão);
- Voluntário que não desejasse continuar no estudo devido os eventos adversos do fármaco do estudo (efeitos não desejáveis possivelmente relacionados ao fármaco em estudo);
- Voluntário que não desejasse continuar por razões outras que não efeitos adversos, por exemplo, indisponibilidade, intolerância aos procedimentos do estudo.

3.10.2 À critério do investigador

- Resposta positiva à reavaliação de qualquer um dos critérios de exclusão, no momento da admissão em ocasião subsequente;
- Não aderência às exigências do protocolo;

- Eventos adversos e/ou sintomas ou sinais de possível toxicidade;
- Doença intercorrente requerendo medicação, a critério do médico responsável;
- Qualquer outra condição que, a juízo do investigador, seja do interesse para manutenção da saúde do voluntário.
- Uso de terapia com antibióticos durante o período (28 dias).

Todos os detalhes e razões da retirada do voluntário do estudo foram anotados na ficha clínica destinada para este fim.

3.11 Fase clínica

Os participantes foram randomizados a um dos dois grupos abaixo relacionados, com um total de 38 participantes em cada grupo, amostra calculada como adequada. Foi mantido em sigilo o tipo de tratamento aplicado tanto aos pesquisadores envolvidos no ensaio clínico, quanto aos participantes.

Todos os participantes receberam escova de dente de mesma marca, com cabo reto, cabeça pequena e cerdas macias, e ainda o dentifrício do tratamento. Além disso, todos receberam instrução de higiene bucal padronizada através de um mesmo instrutor onde foram abordados os seguintes tópicos:

- Número de escovações: 03 escovações diárias (após o café da manhã, depois do almoço e antes de dormir) por um período de 1 minuto;
- Padronização na técnica de escovação que foi explicada da mesma forma para todos os participantes e seus respectivos responsáveis;

Os grupos foram distribuídos seguindo o esquema abaixo:

Grupo TESTE (Tratamento I) - Dentifrício incorporado com 1% de própolis vermelha associado à escovação.

Grupo CONTROLE (Tratamento II) - Dentifrício fluoretado comum associado à escovação.

Os pacientes selecionados foram submetidos a uma consulta inicial onde foi avaliado o registro da presença de fatores retentivos de biofilme. Durante 28 dias os participantes utilizaram o dentifrício e retornaram no último dia para avaliação final.

3.11.1 Coleta de saliva

Saliva não-estimulada dos participantes foi coletada através de uma pipeta pasteur e armazenada em microtubos estéreis (Eppendorfs®). Em seguida, foi adicionado um coquetel inibidor de protease (Sigma, P2714) e essas amostras foram mantidas e transportadas sob gelo para posterior centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C, coleta do sobrenadante e armazenamento a -80°C até a data da análise. (PONTE, 2017) Foi utilizada uma proporção de 5µl (microlitros) por mL (mililitro) do seguinte inibidor de proteinase: Protease Inhibitor Cocktail, (Sigma Aldrich, Saint Louis, Mo, USA)

Na consulta inicial e no retorno foi coletada a saliva, totalizando duas coletas. Para minimizar a influência do circo circadiano no fluxo salivar, todas as amostras foram coletadas sob mesmas condições, mesmo operador e entre 9:00 as 11:00 da manhã.

3.11.2 Dosagem de proteínas totais salivares pelo método do ácido bicinconínico (BCA)

A concentração de proteínas totais salivares das alíquotas de saliva foi determinada pelo método BCA, utilizando como padrão uma curva de albumina sérica bovina (BSA). Foi utilizado um kit comercial (Sigma®) e seguidas as recomendações do fabricante, sendo a solução homogeneizada e lida a uma absorbância de 562 nm através de espectrofotômetro. Os resultados foram calculados baseando-se na curva padrão de BSA. (PONTE, 2017)

3.11.3 Medida da amilase

A atividade da amilase foi verificada através das alíquotas de saliva utilizando um kit comercial (Biotecnica®) e seguidas as recomendações do fabricante, sendo a solução homogeneizada e lida a uma absorbância de 562 nm através de espectrofotômetro.

3.11.4 Dosagem da IL-10

As concentrações de IL-10 foram determinadas por ELISA. As placas de microtitulação foram revestidas com anti-IL10 (Dako®, 1: 1000, albumina de soro bovino BSA 1%). Após lavagem (três vezes) e bloqueio das placas (BSA a 1%, 2h), as amostras

foram incubadas à temperatura ambiente durante 30min. As placas foram lavadas três vezes com tampão, seguida de adição do anticorpo secundário policlonal (Sigma® 1: 1.000, BSA 1%).

Após incubação adicional à temperatura ambiente por 30min, as placas foram lavadas e 50 µl de avidina-HRP (Abcam®, 1: 5.000) foram adicionados. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD; Biosystems®, 50 µl) foi adicionado 15 min depois, e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 30 min para IL-10. A absorvância foi medida a 490 nm. Os resultados são expressos em pg/mL de amostra e são relatados como média ± EPM em uma curva padrão de citocina avaliada.

3.11.5 Determinação do fluxo salivar e potencial hidrogeniônico (pH)

O fluxo salivar foi registrado em mL/min se baseando no volume total de saliva coletado durante 5 minutos. O pH salivar foi verificado por meio de fitas medidoras.

3.12 Avaliação da aceitação do dentifício pelos pacientes

Ao final do estudo apenas os pacientes do grupo tratados com dentifício de própolis vermelha brasileira responderam a um questionário de aceitação do produto, adaptado do estudo de Diniz *et al.* (2014).

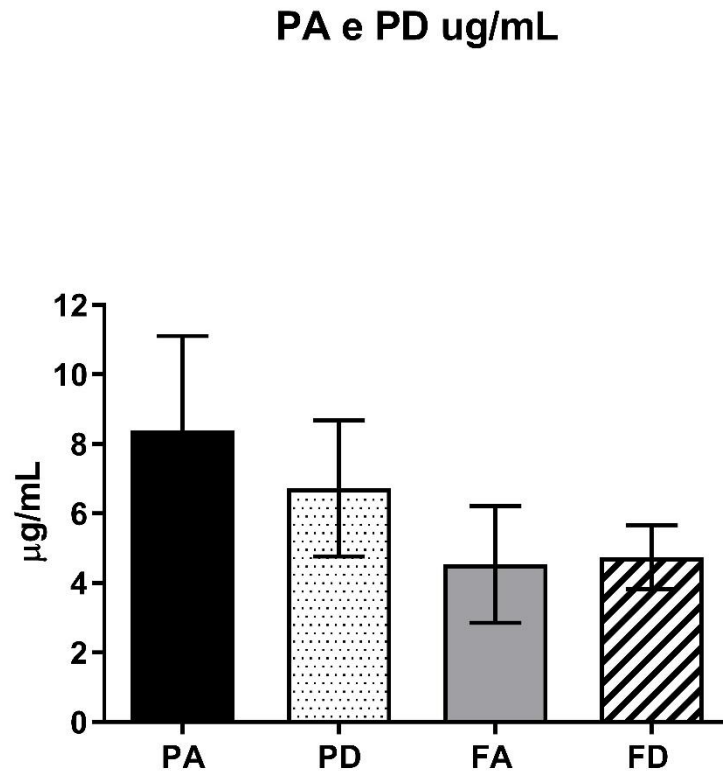
3.13 Método Estatístico

Para a análise dos resultados, foi realizada uma estatística descritiva, que comparou intra-grupo e inter-grupo, os dois momentos estudados. A mesma foi realizada mediante o uso do teste de Mann-Whitney (variáveis não paramétricas). Esse teste foi desenvolvido para comparar tendências centrais de duas amostras independentes de tamanhos iguais.

4. RESULTADOS

A média do pH no grupo tratado com dentífrico de própolis foi 5,85 antes do tratamento e 5,95 depois. No grupo do dentífrico comum foi 6 antes e após o tratamento.

Gráfico 1 – Concentração de proteínas totais nos grupos estudados

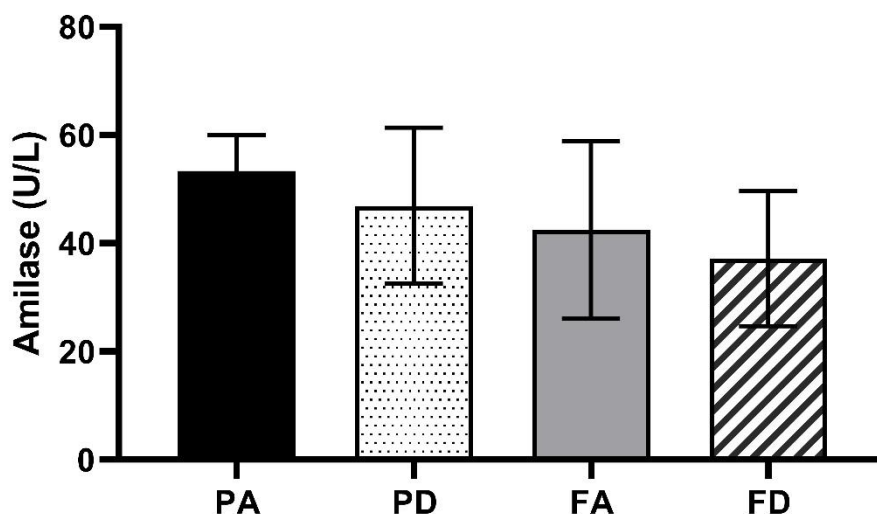


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e PD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentífrico PVB. FA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e FD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentífrico comum.

O gráfico 1 mostra a variação na concentração em µg/mL de proteínas totais na saliva dos pacientes antes e após o tratamento com dentífrico de própolis vermelha brasileira. Nessa análise não houve diferença estatística significativa entre os diferentes grupos e tempos, onde G1 ($p = 0,0746$) e G2 ($p = 0,2144$).

Gráfico 2 – Atividade da amilase nos grupos estudados nos diferentes tempos.

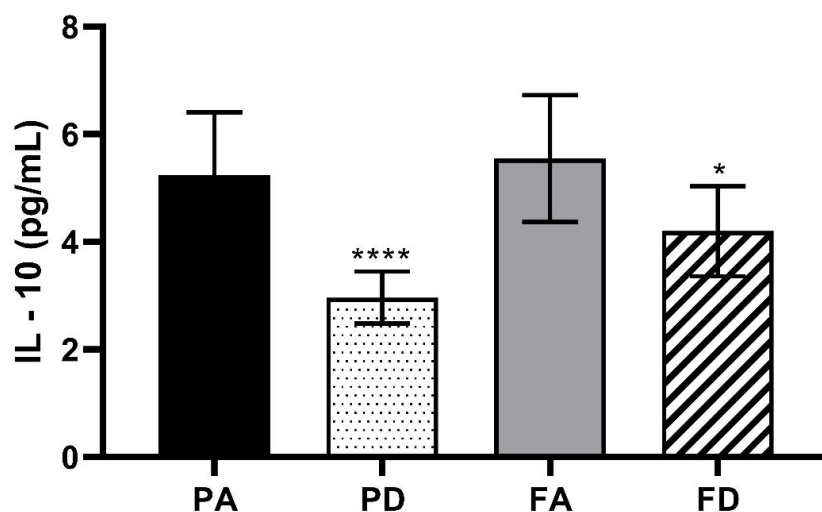


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e PD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentifricio PVB. FA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e FD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentifricio comum.

O gráfico 2 mostra a atividade da amilase em U/L na saliva dos pacientes antes e após o tratamento com dentifricio de própolis vermelha brasileira e o comum. Nessa análise não houve diferença estatística significativa entre os diferentes grupos e tempos, G1 ($p=0,1877$) e G2 ($p=0,4674$).

Gráfico 3 – Dosagem da IL-10 nos grupos estudados nos diferentes tempos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e PD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentífrico PVB. FA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e FD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentífrico comum.

O gráfico 3 mostra a dosagem da interleucina 10 (IL-10) na saliva dos pacientes ao final dos diferentes tratamentos. Nessa análise houve diferença estatística com redução significativa, G1 ($p < 0,0001$) e G2 ($p = 0,03$). Na tabela 1 encontra-se a medida do fluxo salivar dos participantes nos diferentes grupos e tempos, no grupo tratado com dentífrico PVB houve um aumento do fluxo mas sem relevância estatística ($p=0,172$), no grupo tratado com dentífrico comum também houve um aumento sem relevância estatística ($p=0,329$),

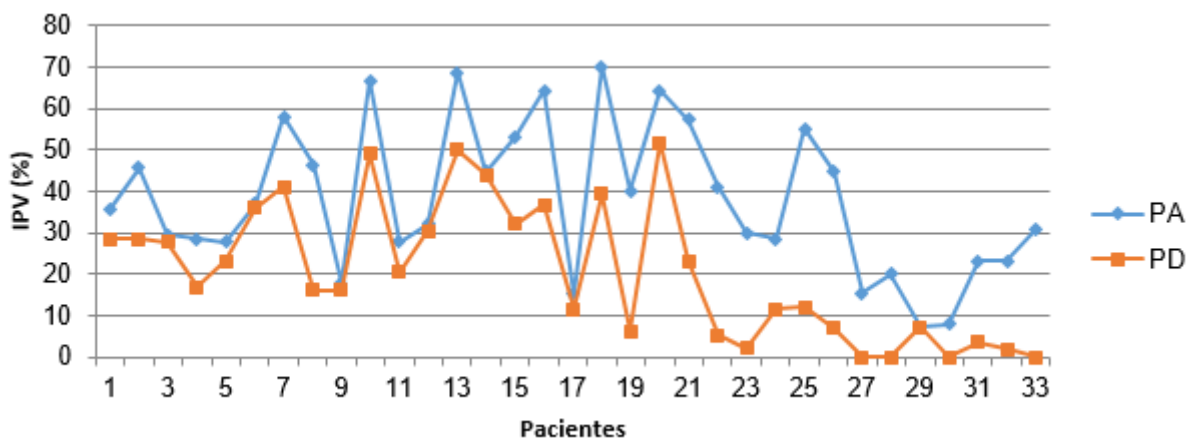
Tabela 1- Medição do fluxo salivar no grupo tratado com dentífrico PVB e comum nos diferentes tempos.

FLUXO SALIVAR (mL/min)				
	PA	PD	FA	FD
MÉDIA ±	0,787 ±	0,846 ±	0,799 ±	0,851 ±
DP	0,126	0,128	0,154	0,153
p	0,172		0,329	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e PD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentífrico PVB. FA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e FD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentífrico comum.

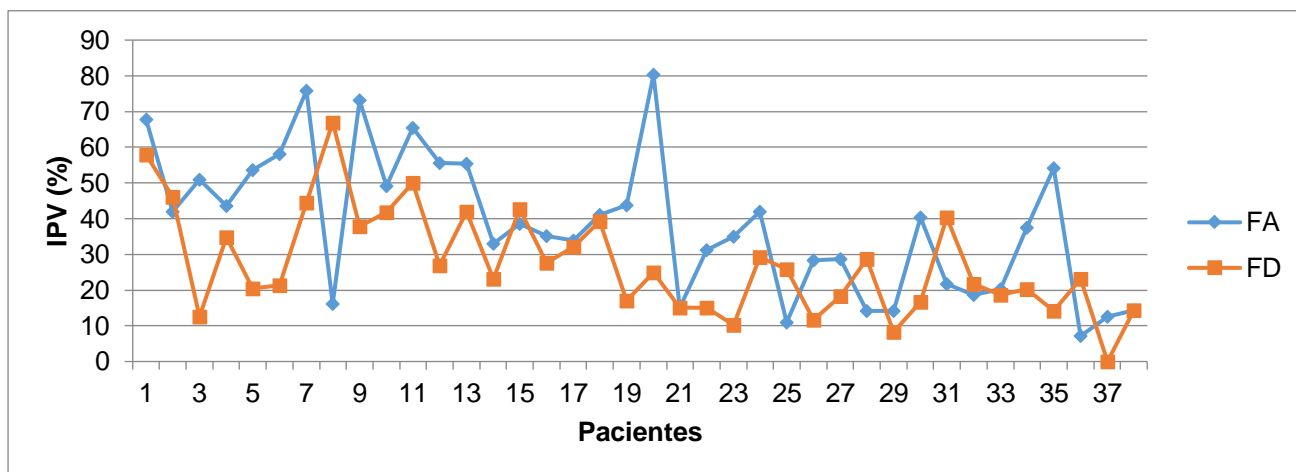
Gráfico 4 – Índice de placa visível (IPV) antes e após o uso do dentífrico de própolis vermelha brasileira.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: PA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e PD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentifício PVB.

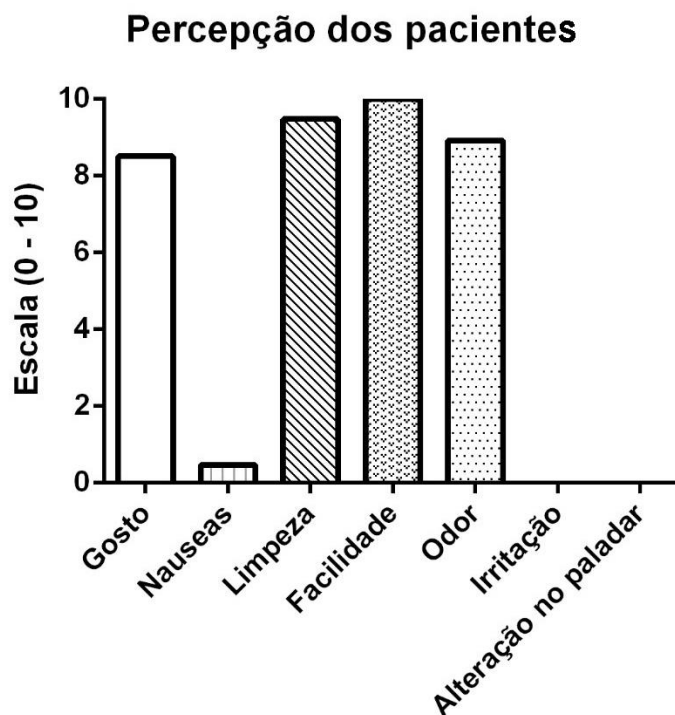
Gráfico 5 – Índice de placa visível (IPV) antes e após o uso do dentifício comum.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: FA corresponde ao valor encontrado antes do início do tratamento (D0) e FD ao valor encontrado após a finalização do tratamento (D28) com dentifício de flúor.

Gráfico 6 – Percepção e aceitação dos pacientes do grupo tratado com dentifício de própolis vermelha brasileira.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O gráfico 6 mostra a percepção dos pacientes em relação à aceitação do dentífrico de própolis vermelha brasileira em uma escala de 0 a 10. Em relação ao gosto, limpeza, facilidade e odor o dentífrico foi bem aceito pelos pacientes, havendo um relato de náuseas e sem relator de irritação ou alteração do paladar.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou alterações nos biomarcadores salivares após 4 semanas de uso com um novo dentifrício proposto, já com atividade antimicrobiana comprovada. O desafio quanto a resistência aos antimicrobianos sintéticos fez com que crescesse o interesse por produtos de origem natural. (CHINSEMBU, 2016) Os produtos naturais têm sido atribuídos como fontes valiosas de moléculas bioativas utilizadas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Assim é cada vez mais frequente pesquisas que utilizam alimentos e produtos naturais, destacando-se café, uva, própolis e ou plantas medicinais, inclusive em formulações farmacêuticas para uso odontológico. No caso da própolis, é um desses produtos que atraiu a atenção dos pesquisadores, sendo crescente o interesse devido à sua atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos patogênicos. (CHENG *et al.*, 2015 ; RUFATTO *et al.*, 2017)

Estudos na literatura demonstram que durante o tratamento ortodôntico é maior a prevalência de lesões ativas de cárie. A introdução de aparelhos ortodônticos fixos na cavidade bucal resulta em um constituinte adicional que pode aumentar a complexidade do ambiente bucal, envolvendo inflamação, formação de biofilme, e doença periodontal. Devido à isso buscou-se estudar a alteração de parâmetros salivares em pacientes ortodônticos sob terapia antimicrobiana com o dentifrício de PVB. (ZOGAKIS *et al.*, 2018) No presente estudo, utilizou-se a saliva por ser um fluido que reflete alterações bucais e sistêmicas, sendo um excelente biomarcador. Assim pode ainda servir como identificador precoce da doença, e isso tem sido considerado como a alternativa promissora. (GIANOBILE *et al.*, 2009)

Carolina *et al.*, (2017) reiteram em sua pesquisa que o desenvolvimento da doença periodontal é influenciado pela placa bacteriana, e que a alfa-amilase é um biomarcador associado à essa doença, sendo maior na periodontite. Cardoso *et al.* (2017) avaliaram o desenvolvimento de lesões de cárie e parâmetros salivares em pacientes ortodônticos. Nesse estudo o pH nos pacientes que desenvolveram lesões de cárie foi menor, onde as mesmas foram mais frequentes com o passar do tempo. Assim, mudanças na composição das propriedades salivares podem modular o desenvolvimento e prevenção de doenças bucais. (CARDOSO *et al.*, 2017) No presente estudo não houve diferenças significativas entre o pH dos diferentes tempos, antes e após o tratamento nos

grupos que utilizaram dentifrício de própolis vermelha e dentifrício comum. A atividade da amilase também não mostrou alteração entre os diferentes grupos, antes e após o tratamento, G1 ($p=0,1877$) e G2 ($p=0,4674$).

Em um estudo de caso-controle que avaliou parâmetros clínicos e microbiológicos de crianças e adolescentes em tratamento ortodôntico, observou-se um alto índice de placa e de sangramento gengival. A análise da saliva revelou uma alta concentração de *S.mutans* e *A. naeslundii*. No presente estudo houve uma diminuição no índice de placa de ambos os grupos, mas o grupo tratado com dentifrício de própolis vermelha brasileira obteve uma maior redução no biofilme dentário (REGO *et al.*, 2010)

Moussa *et al.*, (2017) avaliaram a composição bioquímica da saliva e biofilme supragengival em pacientes adolescentes com aparelhos ortodônticos fixos. Parâmetros como fluxo salivar estimado e não estimulado, pH, capacidade tampão e contagem de *Streptococcus mutans* foram avaliados. Redução do pH e da capacidade tampão foi relacionado ao grupo em tratamento ortodôntico.

Ahmed *et al.*, (2015) analisaram os parâmetros salivares de vinte e quatro pacientes com aparelhos ortodônticos, além do índice de placa. Não houve diferenças nos valores do pH, e índice de placa aumentou quando comparado a antes de colocar o aparelho.

Henskens *et al.* (1993) investigaram mudanças nas proteínas salivares em pacientes com gengivite e periodontite e compararam a pacientes saudáveis. Nos indivíduos que apresentaram doença periodontal, os níveis de proteínas salivares aumentaram consideravelmente. Nesse estudo também foi utilizado o método BCA. No presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa intra-grupo na comparação dos diferentes tratamentos no D0 e D28.

Arab *et al.* (2016) também avaliaram mudanças nos parâmetros salivares em pacientes em tratamento ortodôntico. O fluxo salivar, pH e composição da microbiota foram analisados antes, após 6, 12 e 18 semanas de tratamento, havendo redução significativa do pH mas sem alterações significativas no fluxo salivar. No presente estudo ambos os grupos demonstraram aumento do fluxo salivar, porém sem significância (G1: $p= 0,172$; G2: $p=0,329$).

Sánchez & Honores (2015) determinaram o efeito dos aparelhos ortodônticos no fluxo salivar e viscosidade. Pacientes entre 10-34 anos de idade foram avaliados sendo divididos em grupos controle e teste. Nesse estudo diferenças estatisticamente

significativas no aumento do fluxo salivar e diminuição da viscosidade foram encontrados antes e após um mês do tratamento ortodôntico.

Teixeira *et al.* (2012) também avaliaram possíveis mudanças nos parâmetros salivares após o início do tratamento ortodôntico. Fluxo salivar, pH, capacidade tampão, atividade de amilase, concentrações de proteínas totais, cálcio e glicose foram medidas em todas as amostras salivares. Identificou-se no grupo em tratamento ortodôntico uma redução significativa do pH salivar e capacidade tampão e aumento de amilase e outras proteínas salivares, mas sem significância.

Zogakis *et al.* (2018) verificaram alterações no pH e proteínas em pacientes tratados com aparelhos ortodônticos fixos. Os pacientes foram avaliados antes do início do tratamento ortodôntico, 1 hora após ligação e 4-6 semanas após a ligação. Nesse estudo uma diminuição significativa no pH da saliva foi observada após a colagem, mudanças na presença de proteínas não tiveram mudanças significantes.

Bilgic *et al.* (2016) avaliaram os efeitos do tratamento ortodôntico sobre diversos parâmetros após 1 dia, 7 dias e 3 meses após o início da terapia. Entre os parâmetros observados avaliou-se as proteínas totais, não havendo alteração durante o período observado. No presente estudo a alteração das proteínas totais não mostrou diferença estatística significativa.

A literatura aponta que a amilase facilita a adesão de bactérias à superfície dentária, contribuindo para a formação de biofilme e cárie dentária. A amilase também é secretada devido ao estresse mecânico e psicológico que ocorre durante o tratamento ortodôntico e doença periodontal, condições estas presentes em todos os pacientes do presente estudo. (CANALES, 2018)

A literatura relaciona uma forte relação entre a interleucina-10 (IL-10) e doença periodontal. A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que desempenha importantes papéis nas doenças periodontais, sendo a presença desta um fator de risco potencial para doenças periodontais. (GENG *et al.*, 2018; MOUDI *et al.*, 2018)

Geng *et al.*, (2018) quantificaram a produção de IL-10 em pacientes com doença periodontal e comparou a pessoas saudáveis, encontrando uma maior concentração nos pacientes com doenças periodontal que nos controles. Lappin *et al.*, (2001) identificaram citocinas em pacientes com doença periodontal e observou que um grande número de células inflamatórias infiltrantes, bem como células acessórias, estão envolvidas na regulação negativa da resposta inflamatória e imune na periodontite. (LAPPIN *et al.*, 2001)

Na análise de IL -10 do presente estudo, observou-se que ao final do tratamento houve diferença estatística com redução significativa nos grupos, G1 ($p < 0,0001$) e G2 ($p = 0,03$).

Al Fahd *et al.*, (2016) por meio de uma revisão sistemática avaliaram a eficácia antimicrobiana de vernizes de clorexidina em pacientes ortodônticos. O estudo concluiu que apesar de se mostrar eficaz, o uso de formulações com clorexidina necessitam de maior tempo e frequência de aplicação, além de os ensaios clínicos serem de baixa evidência quanto ao tema. É fato que os aparelhos ortodônticos fixos atuam como fatores retentivos de biofilme dentário, tornando assim os procedimentos tradicionais de higiene bucal mais difíceis e desafiadores.

Sabe-se que o controle diário adequado do biofilme mecânico é a estratégia de prevenção mais importante para as doenças periodontais, entretanto no caso de pacientes ortodônticos não é suficiente, o que faz esse grupo buscar alternativas, como os enxaguatórios bucais. Apesar da clorexidina apresentar excelentes resultados anti-biofilme e antimicrobianos, não deve ter uso contínuo, não sendo indicada para períodos de longo prazo. (HAAS *et al.*, 2014) Assim, busca-se alternativas para o controle químico e mecânico do biofilme para esses paciente.

Um dentífricio ter atividade antimicrobiana é uma vantagem, entretanto para isso é necessário a aceitação do produto pelo paciente. A consistência do dentífricio, por exemplo, é um importante parâmetro na aceitação do produto, pois esta é responsável pela fluência de dispensação sobre a escova, dispersão na boca, velocidade de liberação dos flavorizantes e dos princípios ativos, devendo tudo isso ocorrer em um tempo relativamente curto. (NUNES *et al.*, 2006) No presente trabalho a facilidade de utilização praticamente obteve escores máximos. Parâmetros quanto ao gosto, odor e limpeza, obtiveram também altos escores.

Diniz *et al.*, (2014) avaliaram a percepção dos pacientes após uso de enxaguatórios à base de óleos essenciais e compararam com enxaguatório de cloreto de cetilperidíneo. Nesse estudo o grupo tratado com enxaguatórios de óleos essenciais apresentaram maior desconforto e ardor. O uso de enxaguatórios orais aumenta a exposição da mucosa bucal ao álcool, e esta não é o local preferencial para degradação do álcool, porém alguma quantidade é absorvida e metabolizada em nível tecidual durante a deglutição, sendo assim, os dentífrícios com propriedades antimicrobianas tornam-se uma opção. No presente estudo não houve relatos de irritação, fato este que deve estar ligado à

concentração de 1% de própolis utilizada, resultando numa quantidade de álcool mínima na preparação final.

Formulações de dentifrícios e enxaguatórios contendo óleos essenciais obtiveram selo de aceitação da American Dental Association (ADA) e têm demonstrado que possuem excelente tolerabilidade e segurança, não havendo relatos de mudanças na percepção de sabores pelos usuários. (CHARLES *et al.*, 2001)

6. CONCLUSÃO

O mercado de produtos com própolis está se expandindo cada vez mais em todo o mundo, destacando-se a própolis vermelha brasileira, especialmente por sua atividade anti-biofilme, o que se torna uma opção para pacientes com retenção de biofilme, como no caso dos aparelhos ortodônticos.

Nesse estudo, após 4 semanas de uso pelos participantes, não houve diferenças entre os marcadores de proteína total, pH e amilase, quando comparado o grupo do dentifrício de própolis com o grupo do dentifrício de flúor. A dosagem de IL-10 e o índice de placa foram reduzidos no grupo do dentifrício de própolis após o período de uso. Quanto à percepção e aceitação da formulação com própolis, a mesma não causou efeitos adversos e teve uma boa aceitação pelos usuários.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, Aline Lauria Pires; LEAL, Soraya Coelho; FALCÃO, Denise Pinheiro. Salivary and serum cortisol levels, salivary alpha-amylase and unstimulated whole saliva flow rate in pregnant and non-pregnant. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 2, p. 72-78, 2014.
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. **Annals of Periodontol.** v. 4, n. 1, p. 8-38, 2009.
- AGHILI, Hossein; NADOUSHAN, Abbas Ali Jafari; HERANDI, Vahid. Antimicrobial effect of zataria multiflora extract in comparison with chlorhexidine mouthwash on experimentally contaminated orthodontic elastomeric ligatures. **Journal of Dentistry**, v.12, n.1. p.1–10, 2015.
- AHARI, Ulduz Zamani *et al.* Comparison of Salivary Alpha Amylase and Peroxidase Levels in Women with GDM and Non-diabetic Pregnant Women. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 9, n. 2, p. 499-506, 2016.
- AHMED, Maha Abdul Aziz *et al.* Time-related salivary cathepsin B levels and periodontal status in different orthodontic force magnitudes. **Journal of Baghdad College of Dentistry**, v. 325, n. 2219, p. 1-8, 2015.
- AL-BAZI, Samar. *et al.* . Effects of chlorhexidine (gel) application on bacterial levels and orthodontic brackets during orthodontic treatment. **Journal of Oral Science**, v. 58, n. 1, p. 35-42, 2016.
- AL-FAHD, Adnan Abdullah. Weak Evidence Supports Antimicrobial Effect of Chlorhexidine Varnish in Patients with Fixed Orthodontic Appliances. **Int Journal of Dental Hygiene**, v.14, p.53–61, 2016.
- ALI, Asgar *et al.* Efficacy of Propolis and Cinnamon Oil Coating in Controlling Post-Harvest Anthracnose and Quality of Chilli (*Capsicum annum L.*) during Cold Storage Propolis as an Antimicrobial Edible Coating to Control Post harvest Anthracnose of Bell Pepper. **Packaging Technology and Science**, v. 28, n. 2, p.173-179, 2014.
- ALIKHANI, Mani *et al.* Saturation of the biological response to orthodontic forces and its effect on the rate of tooth movement. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v.18, n.1, p.8–17, 2015.
- ANAUATE NETTO, Camillo *et al.* Effects of typified propolis on mutans streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. **Brazilian Dental Science**, v.16, n.2, p.31–36, 2013.
- ARAB, Sepideh *et al.* Effect of Fixed Orthodontic Treatment on Salivary Flow, pH and Microbial Count. **Journal of Dentistry**, Tehran, v. 13, n. 1, p. 18-22, 2016.

ARAUJO, Yzila Liziane Farias Maia *et al.* Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia plena**, v. 7, n. 4, p.1-4, 2011.

AZEVEDO, Lais Farias *et al.* Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, PCL-Pluronic versus Eudragit® E100-Pluronic. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p. 255-270, 2018.

BARBOSA, Vanessa *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e tintura de própolis frente à bactéria causadora da acne *Propionibacterium acnes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 169–173, jun. 2014.

BENZIAN, Habib *et al.* Total and free available fluoride in toothpastes in Brunei, Cambodia, Laos, the Netherlands and Suriname. **International Dental Journal**, v. 62, n. 4, p. 213–221, ago. 2012.

BILGIC, Fundagul *et al.* Evaluation of inflammation during fixed orthodontic treatment. **Archives of Oral Biology**, v. 71, p. 54-58, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n.º 729, de 28 de agosto de 2000. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, p.1415-1537, 30 ago. 2000.

BUENO-SILVA, Bruno *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.19, p.4546-4550, 2013.

BUZALAF, Marília Afonso Rabelo *et al.* Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control. **Monogr Oral Sci.**, v. 22, n.1, p. 97–114, 2011.

CAGETTI, Maria Grazia *et al.* Effect of a toothpaste containing triclosan, cetylpyridinium chloride, and essential oils on gingival status in schoolchildren: A randomized clinical pilot study. **Quintessence International**, v.46, n.5, p.437–445, 2015.

CANALES, Maria Pia. **Binding of Salivary Proteins to Orthodontic Brackets**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ortodontia) - Programa de Pós-Graduação em Ortodontia, The University of Western Ontario, Ontario, 2017.

CARDOSO, Andréia *et al.* Influence of salivary parameters in the caries development in orthodontic patients—an observational clinical study. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 27, n. 6, p. 540-550, 2017.

CAROLINA, Dyah Nindita; RUSYANTI, Yanti; SUSANTO, Agus. Comparison of salivary alpha-amylase levels in gingivitis and periodontitis. **Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)**, v. 50, n. 4, p. 216-219, 2017.

CHAPPLE, Iain *et al.* Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the

Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Periodontology**, v.89, p. S74-S84, 2018.

CHARLES, Christine *et al.* Comparative efficacy of an antiseptic mouthrinse and an antiplaque/antigingivitis dentifrice: a six-month clinical trial. **The Journal of the American Dental Association**, v. 132, n. 5, p. 670-675, 2001.

CHENG, Lei *et al.* Natural products and caries prevention. **Caries Research**, v. 49, n.1, p. 38-45, 2015.

CHINSEMBU, Kazhila. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. **Acta Tropica**, v. 154, p. 6-18, 2016.

CURY, Jaime Aparecido; CALDARELLI, Pablo Guilherme; TENUTA, Livia Maria Andaló. Necessity to review the Brazilian regulation about fluoride toothpastes. **Revista de saude publica**, v. 49, p.74, 2015.

DIAS, Ana Paula *et al.* Antimicrobial action of chlorhexidine digluconate in self-ligating and conventional metal brackets infected with *Streptococcus mutans* biofilm. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 10, p. 69-74, 2018.

DINIZ, Pamela Aparecida *et al.* Percepção dos pacientes em uso de enxaguatórios bucais: óleos essenciais e cloreto de cetilperidíneo. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 68, n. 3, p. 245-249, 2014.

DITTMER, Marc Philipp *et al.* Comparative three-dimensional analysis of initial biofilm formation on three orthodontic bracket materials. **Head & Face Medicine**, v. 11, n. 1, p.1-6, 2015.

ERIKSSON, Linda; HOLGERSON, Pernilla Lif; JOHANSSON, Ingegerd. Saliva and tooth biofilm bacterial microbiota in adolescents in a low caries community. **Scientific reports**, v.7, n.1, p. 5861, 2017.

FEITOSA, Sandra *et al.* As Repercussões da Cárie Precoce na Infância na Qualidade de Vida de Pré-escolares. **Revista Ibero-americana de Odontopediatria & Odontologia de Bebê**, v. 6, n. 34, p. 542-548, 2003.

FRANCHIN, Marcelo *et al.* Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36401, 2016.

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

FREIRES, Irlan Almeida *et al.* Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. **Molecules**, v. 20, n.1, p.7329-7358, 2015.

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

FREITAS, Amanda Osório Ayres *et al.* The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: a systematic review. **Dental Press Journal of Orthodontics**. v. 19, n. 2, p. 46-55, 2014.

GAVANJI, Shahin; LARKI, Behrouz. Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. **Chinese journal of Integrative Medicine**, v. 23, n. 3, p. 201-207, 2017.

GENG, Ying *et al.* Interleukin-10 polymorphisms affect the key periodontal pathogens in Chinese periodontitis patients. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9068, 2018.

GEORGE, Rajani Mary; KASLIWAL, Akash V. Effectiveness of Propolis, Probiotics And Chlorhexidine on *Streptococcus Mutans* And *Candida Albicans*: An In-Vitro Study. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 16, n. 03, p. 15–18, mar, 2017.

GIACAMAN, Rodrigo Andrés. Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrientes and their potential impact on caries. Oral diseases. v.1, n.1, p.1-13, 2017.

GIANNOBILE, William *et al.* Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. **Periodontology 2000**, v. 50, n. 1, p. 52-64, 2009.

GOES, Paula *et al.* Clinical efficacy of a 1% *Matricaria chamomile* L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. **Journal of Oral Science**, v. 58, n. 4, p. 569 - 574, 2016.

GOMAR-VERCHER, Sônia *et al.* Relationship of children's salivary microbiota with their caries status: a pyrosequencing study. **Clinical Oral Investigations**, v.18, n.9, p.2087-2094, 2014.

GUIDA, Mauro Agildo Barbosa *et al.* Desenvolvimento e Avaliação de Metodologia Analítica para Determinação de Micronutrientes (Na, K, Mg e Ca) em Amostras de Própolis in natura Empregando HR-CS FAAS. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 8, p.1792-1804, 2016.

HAAS, Alex Nogueira *et al.* Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. **Brazilian Oral Research**, v. 28, n. SPE, p. 1-8, 2014.

HASHIZUME, Lina Naomi *et al.* Fluoride availability and stability of Japanese dentifrices. **Journal of Oral Science**, v. 45, n. 4, p. 193–199, 2003.

HE, Xue-Song.; SHI, Wen-Yuan. Oral microbiology: past, present and future. **International Journal of Oral Science**, v. 1, n. 2, p. 47-58, 2009.

HENSKENS, Yvonne M. C. *et al.* Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis periodonitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 28, n. 1, p. 43-48, 1993.

JEPSEN, Søren *et al.* Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v.44, n.18, p.85–93, 2017.

KACZOR-URBANOWICZ, Karolina Elżbieta *et al.* Identification of Salivary Protein Biomarkers for Orthodontically Induced Inflammatory Root Resorption. **Proteomics - Clinical Applications**, v.1, n.9-10, p.1-27, 2017.

LAMONT, Richard J.; KOO, Hyun; HAJISHENGALLIS, George. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, p. 745-759, 2018.

LAPPIN, David F. *et al.* Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 123, n. 2, p. 294-300, 2001.

LARSEN, Tove; FIEHN, Nils-Erik. Dental biofilm infections - an update. **Acta Pathologica, Microbiologica, e Immunologica Scandinavica**, v. 125, n. 4, p.376-384, 2017.

LIBERIO, Silvana Amado *et al.* The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 1–9, 2009.

LINS, Ruthineia *et al.* Avaliação clínica de bochechos com extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e Camomila (*Matricaria recutita* L.) sobre a placa bacteriana e a gengivite. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.1, p.112-120, 2013.

LOBO, Patrícia Leal Dantas *et al.* The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 9, p. 1043-1047, 2014.

LOTTI, Cinzia *et al.* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.4, p. 2209-2213, 2010.

LUCA, Mariana Passos de *et al.* Propolis Varnish: Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria, Cytotoxicity, and Sustained-Release Profile. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-6, 2014.

LUSTOSA, Sarah Rodrigues *et al.* Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447- 454, 2008.

MARSH, Philip. In Sickness and in Health: What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. **Advances in Dental Research**. v. 29, n. 1, p. 60-65, 2018.

MARSH, Philip *et al.* Influence of saliva on the oral microbiota. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 80-92, 2016.

- MODESTO, Adriana; LIMA, Kenio Costa; UZEDA, Milton de. Atividade antimicrobiana de três dentifrícios utilizados na higiene oral de bebês: estudo in vitro. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**, v. 55, n. 1, p. 43-48, 2001.
- MOUDI, Bitá et al. Analysis of interleukin-10 gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis and healthy controls. **Dental research journal**, v. 15, n. 1, p. 71, 2018.
- MOUSSA, Shady Ahmed *et al.* Dental Biofilm and Saliva Biochemical Composition Changes in Young Orthodontic Patients. **Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2017.
- NAKAMA, Daiana Mitiko et al. Polimorfismo no gene IL-10 (-627) em idosos portadores de doença periodontal. **ConScientiae Saúde**, v. 11, n. 3, p. 369-376, 2012.
- OLIVEIRA, Vanessa Neves *et al.* Biomarcadores salivares na avaliação do limiar anaeróbio. **Fitness & Performance Journal**, v. 4, n. 2, p. 85-89, 2005.
- NASCIMENTO, Ticiano Gomes do *et al.* Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v.11, n.1, p. 301, 2016.
- NOUSHAD, Matavan Chalil *et al.* Antimicrobial efficacy of different natural extracts against persistent root canal pathogens: An In vitro study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v.9, n. 2, p.177-181, 2018.
- NUNES, Rogéria de Souza *et al.* Obtention and evaluation of odontologic products made with the crude extract of Lippia sidoides Cham (Verbenaceae) over the dental biofilm. **Rev Odontol UNESP**. v.35, n.4, p.275-283, 2006.
- PAULA, Alfredo Mauricio Batista *et al.* Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. **Pharmacology Online**, v.3, p. 467–473, 2006.
- PEDRON, Irineu Gregnanin *et al.* Processos proliferativos gengivais não neoplásicos em paciente sob tratamento ortodôntico. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v.11, n. 80, 80-87, 2010.
- PITTS, Nigel Berry *et al.* Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**, v.3, n.17030, 2017.
- PONTE, Emerson Dias. **Avaliação de controle metabólico, perfil de proteínas totais salivares e índices de placa gengival em crianças com e sem diabetes mellitus tipo 1: Um estudo caso-controle e prospectivo**. 2017. Dissertação (Mestrado em Odontologia)- Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- PORTO, Isabel Cristina Celerino de Moraes *et al.* Mechanical and aesthetics compatibility of Brazilian red propolis micellar nanocomposite as a cavity cleaning agent. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.18, n.1, p. 219, 2018.

RAMMOHAN, Shrinivaasan Nambi *et al.* Adherence of Streptococcus mutans and Candida albicans to different bracket materials. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. v. 4, n.2, p. 212-216, 2012.

RASZL-HENRIQUE, Patrícia *et al.* Influência dos braquetes convencionais ou autoligados nos parâmetros periodontais—revisão de literatura. **Brazilian Journal of Periodontology**, v.28, n.1, p. 28, 2018.

REGO, Rodrigo Otávio *et al.* Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. **American journal of dentistry**, v. 23, n. 6, p. 317-323, 2010.

REN, Yijin *et al.* Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation: a potential public health threat? **Clinical Oral Investigations**, v 18, n. 7, p. 1711-1718, 2014.

RICOMINI FILHO, Antônio Pedro *et al.* Fluoride concentration in the top-selling Brazilian toothpastes purchased at different regions. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 45–48, 2012.

RUFATTO, Luciane Corbellini *et al.* Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591–598, 2017.

SALATINO, Antônio. Brazilian Red Propolis: Legitimate Name of the Plant Resin Source. **Med Crave: Step Into The World Of Research**, v.5, n.4, p. 435-441, 2018.

SAMAH, Alfuriji *et al.* The effect of orthodontic therapy on periodontal health: a review of the literature. **International Journal of Dentistry**, v. 2014, 2014.

SÁNCHEZ, Emanuel Barreto *et al.* Effect of orthodontic fixed appliances on salivary flow and viscosity. **Revista Mexicana de Ortodoncia**, v. 3, n. 3, p. 186-190, 2015.

SASHIKUMAR, Radhika; KANNAN, Ranganathan. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 109, n.5, p. 706-711, 2010.

SHAH, Shreya Shruti *et al.* Comparative Evaluation of Plaque Inhibitory and Antimicrobial Efficacy of Probiotic and Chlorhexidine Oral Rinses in Orthodontic Patients: A Randomized Clinical Trial. **International Journal of Dentistry**, v. 1964158, p.1-6, 2019.

SILVA, Rejane Pina Dantas *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos One**, v. 12, n. 3, p.1-18, 2017.

SILVA, Tania Maria Sarmiento *et al.* Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2013.

STEFFENS, João Paulo; MARCANTONIO, Rosemary Adriana Chiérnici. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 47, n. 4, p. 189-197, 2018.

TANG, Xiaofei *et al.* Weak Evidence Supports Antimicrobial Effect of Chlorhexidine Varnish in Patients with Fixed Orthodontic Appliances. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 14, p. 53-61, 2016.

TEIXEIRA, Hellen Soares *et al.* Calcium, amylase, glucose, total protein concentrations, flow rate, pH and buffering capacity of saliva in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 17, n. 2, p. 157-161, 2012.

VALADAS, Lídia Audrey Rocha *et al.* Dose-response evaluation of a copaibacontaining varnish against streptococcus mutans in vivo. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 3, p. 363-367, 2019.

WALSH, Tanya *et al.* Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.1, n.1 2010.

WANG, Xiaoying; WANG, Bianhong; WANG, Yanhua. _Antibacterial orthodontic cement to combat biofilm and white spot lesions. **J Orthod Dentofacial Orthop**, v.148, n.6, p. 974-981, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Achieving Dental Health through Fluoride in China and South East Asia. **Conference on Dental Health through Fluoride in China and South East Asia**, Beijing, 2012.

XIN, Xu; JUNZHI, He; XUEDONG, Zhou. Oral microbiota: a promising predictor of human oral and systemic diseases. **West China Journal of Stomatology**, v. 33, p. 555-560, 2015.

ZOGAKIS, Ioannis *et al.* Effect of fixed orthodontic appliances on nonmicrobial salivary parameters. **The Angle Orthodontist**, v.88, n.6, p.806-811, 2018.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado pela pesquisadora Mônica do Amaral Silva, como participante da pesquisa intitulada “ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM GENGIVITE APÓS USO DE DENTIFRÍCIO DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Seu filho ou filha está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, ele(a) não deve participar contra vontade própria ou contra a sua vontade. Leia com atenção as informações abaixo, sentindo-se livre para fazer qualquer pergunta que desejar, para que não haja dúvida alguma sobre os procedimentos a serem realizados.

a) O objetivo da pesquisa é avaliar a ação de um dentifricio (pasta de dente) que é feito com um produto natural, na composição da sua saliva, para auxiliar no tratamento da gengivite (inflamação e sangramento da gengiva)

b) Durante o estudo você deverá fornecer informação sobre o estado geral de saúde do seu filho ou filha, bem como possíveis reações alérgicas que ele(a) já possa ter tido

c) A participação neste estudo consistirá de:

- Exame dentário e gengival de seu filho ou filha,
- Utilização de uma pasta de dente feita de um produto natural (Própolis), por 3 vezes ao dia durante 28 dias.
- Coleta de saliva de seu filho ou filha por 2 vezes, uma a cada consulta. Para que seja feita a coleta seu filho ou filha terá que mastigar um pequeno pedaço de “chiclete” por um minuto, e a mesma se encontrará ligada a um pedaço de fio dental para evitar que o seu filho ou filha venha a engolir material. Depois de decorrido o tempo o mesmo será retirado da boca e colocado em um pequeno frasco.

d) A coleta de saliva e o exame bucal NÃO causarão DOR ao seu filho ou filha.

f) Seu filho ou filha **NÃO RECEBERÁ INJEÇÃO** de anestésico local.

g) Após a aplicação do tratamento a saliva recolhida (conforme descrito acima) e analisada para descobrir se o remédio usado nos dentes de seu filho ou filha foi capaz de diminuir a número de bactérias da boca que causam cárie, podendo trazer como benefício um tratamento para cárie no futuro.

i) Você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação do seu filho ou filha neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

k) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo. Os pesquisadores não o identificará por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos (os dados serão publicados somente em revista científica e/ou congressos científicos não identificando o nome de seu filho ou filha).

l) O surgimento de resfriados ou viroses no dia da pesquisa, com conseqüente uso de medicações por período de tempo limitado, exclui seu filho ou filha do estudo.

m) A participação nessa pesquisa é voluntária e o participante não irá receber nenhum pagamento por isso.

Endereço d(os, as) responsável(is) pela pesquisa:

Caso venham a surgir dúvidas ou perguntas, sinta-se livre para contactar a pesquisadora Mônica do Amaral Silva (responsável pelo projeto) no telefone (85) 999528736, ou no endereço Capitão Francisco Pedro, 1210 – Rodolfo Teófilo – CEP 60430-370, Fortaleza-Ce.

Nome: Mônica do Amaral Silva
Instituição: Universidade Federal do Ceará
Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210- Rodolfo Teófilo- CEP 60430-370, Fortaleza-Ce
Telefones para contato: 8599528736

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, ____ anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome do pesquisador	Data	Assinatura
Nome da testemunha (se o voluntário não souber ler)	Data	Assinatura
Nome do profissional que aplicou o TCLE	Data	Assinatura

ANEXO II

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como participante da pesquisa: **“ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM GENGIVITE APÓS USO DE DENTIFRÍCIO DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO”**.

Nesse estudo pretendemos avaliar a diminuição do sangramento da sua gengiva quando você escova os dentes. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é a grande presença de gengiva inflamada em pessoas que estão usando aparelho nos dentes e assim busca-se algum produto que diminua isso.

O estudo será composto pelos seguintes procedimentos:

- Exame dos seus dentes e da gengiva
- Utilização de uma pasta de dente feita de um produto natural (Própolis), por 3 vezes ao dia durante 28 dias.
- Coleta de saliva (cuspe) na consulta.

Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) em qualquer dúvida que tiver e estará livre para participar ou não. O responsável por você poderá também a qualquer momento decidir se você continua ou não na pesquisa. A sua participação é de livre espontânea vontade, e se não quiser participar não vai ser penalizado por isso. Você não terá seu nome divulgado de maneira alguma. Este estudo apresenta risco mínimo isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras como conversar, tomar banho, ler etc.

No final da pesquisa se você quiser, os resultados sobre o uso da pasta de dente estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e resultados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos e, após esse tempo, serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas folhas, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador(a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar, se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste Termo de Assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Fortaleza, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do(a) menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Endereço d(os, as) responsável (is) pela pesquisa:

Nome: Mônica do Amaral Silva
Instituição: Universidade Federal do Ceará
Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210- Rodolfo Teófilo- CEP 60430-370, Fortaleza-Ce
Telefones para contato: (85) 999528736

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

ANEXO III- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE BIOMARCADORES SALIVARES EM PACIENTES COM GENGVITE APÓS USO DE DENTIFRÍCIO DE PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Pesquisador: Monica do Amaral Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 81191417.9.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Farmácia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.551.395

Apresentação do Projeto:

Diversos estudos comprovam o efeito terapêutico extrato de Própolis sobre inibição microbiana de agentes cariogênicos, além disso, ele se apresenta como uma opção clínica de baixa toxicidade e biocompatibilidade. Nos últimos anos, os medicamentos a base de produtos naturais vêm passando por uma revolução tecnológica que se estende da engenharia genética à biologia molecular e à bioquímica, utilizando os mais avançados recursos. Esse avanço que ocorre em ritmo acelerado é explicado pelo desejo da população de encontrar uma alternativa aos medicamentos sintéticos, em geral carregados de efeitos colaterais, e pelo respaldo que a ciência, com a ampliação das pesquisas acadêmicas e clínicas, está oferecendo às drogas a base de ervas, constatando que a medicina popular de fato tem fundamento. Este trabalho propõe a avaliação de um novo dentifrício, à base de própolis vermelha, com atividade antimicrobiana e anti-inflamatória comprovadas, tendo a finalidade de comprovar sua ação nas proteínas salivares e indicá-lo para situações em que seja necessário um controle maior do biofilme oral.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar parâmetros salivares após uso de um dentifrício manipulado com extrato de Própolis

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.551.395

vermelha em pacientes com aparelhos ortodônticos e comparar a um dentífrico fluoretado comum.

Objetivo Secundário:

- Avaliar o pH e proteínas da saliva antes e após a utilização do dentífrico;
- Avaliar a capacidade tampão salivar;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Por se tratar de um produto inclusive utilizado como alimento e toxicidade conhecida os riscos serão mínimos como desaprovação do gosto e/ou odor da pasta.

Benefícios:

O benefício esperado é a utilização de um dentífrico eficaz que tenha ação antimicrobiana e anti-inflamatória sobre os tecidos gengivais em uma população que apresenta dificuldade de higiene oral em virtude da utilização dos aparatos ortodônticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto em questão está muito bem escrito, de boa leitura e entendimento. Está incluído desenho do estudo, introdução, revisão, objetivos, metodologia, cronograma de atividades, orçamento e outros. A documentação exigida pela RESOLUÇÃO 466/12 que regulamenta os estudos aplicados aos seres humanos está incluída.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados de forma adequada todos os termos e documentos solicitados.

Recomendações:

O projeto de pesquisa está devidamente instruído para que o mesmo seja executado. Portanto o parecer é favorável à sua APROVAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1047538.pdf	14/12/2017 00:51:35		Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.551.395

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMonica.docx	14/12/2017 00:50:42	Lídia Audrey Rocha Valadas Marques	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	14/12/2017 00:43:26	Lídia Audrey Rocha Valadas Marques	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.docx	12/12/2017 18:21:49	Monica do Amaral Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	12/12/2017 18:19:17	Monica do Amaral Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaoconcordancia.pdf	12/12/2017 18:18:41	Monica do Amaral Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaoinfraestrutura2.pdf	12/12/2017 18:17:55	Monica do Amaral Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaoinfraestrutura.pdf	12/12/2017 18:17:07	Monica do Amaral Silva	Aceito
Outros	Apresiasiacao.pdf	12/12/2017 18:14:19	Monica do Amaral Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	12/12/2017 18:13:08	Monica do Amaral Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	12/12/2017 18:12:40	Monica do Amaral Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 20 de Março de 2018

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

UF: CE

Telefone: (85)3366-8344

CEP: 60.430-275

Município: FORTALEZA

E-mail: comepe@ufc.br

**ANEXO IV
COMPROVANTE DE ACEITE
JOURNAL OF YOUNG PHARMACISTS**



Monica Amaral <monicaamaralufc@gmail.com>

Regarding your manuscript JYP_43_19

Mohammed Yunus <mohammed.yunus@phcog.net>
Para: monicaamaralufc@gmail.com

1 de março de 2019 21:58

Dear Author,

Regarding your submission to "Journal of Young Pharmacists", we are pleased to inform you that your manuscript entitled "Perception And Adverse Effects Of Patients After Using Propolis Containing-Dentifrice" is accepted and shortlisted for publication in April-July issue of Journal of Young Pharmacists. You will be receiving the galley proof and Proforma Invoice from the publisher (EManuscript Technologies) shortly. Following author proofing, it will be processed in the issue. Please check your inbox regularly to receive the edited version (if any queries) and Galley Proof for your corrections and Approval.

Please note that the copyright form signed by all authors is mandatory for the publication in Journal of Young Pharmacists.

Kindly revert if you have any further queries.

Regards

--

Mr. Mohammed Yunus

Publishing Editor

Editorial Office

Phcog.Net

#17, II Floor, Buddha Vihar Road

Cox Town, Bangalore 560 046, INDIA

M: +91-09686980760

E : mohammed.yunus@phcog.net

W : www.phcog.net

ANEXO V COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO JOURNAL OF YOUNG PHARMACISTS

J Young Pharm, 2019; 11(2) : x-x

A multifaceted peer reviewed journal in the field of Pharmacy
www.jyoungpharm.org | www.phcog.net

Original Article

Perception and Adverse Effects of Patients after using Propolis-Containing Dentifrice

Mônica Do Amaral Silva^{1,2,*}, Lídia Audrey Rocha Valadas¹, Francisco Josimar Girão Júnior¹, Guilherme Antônio Lopes De Oliveira², Ana Cristina de Mello Fiallos¹, Edilson Martins Rodrigues Neto¹, Emerson Dias Ponte¹, Pedro Alves de Souza Neto¹, Gandhi Radis Baptista¹

¹College of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceara, Fortaleza, CE, BRAZIL.

²Chrisfapi University, R. Acelino Rezende, 132 - Fonte dos Matos, Piri-piri - PI, Brazil Piri-piri, PI, BRAZIL.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to evaluate the perceptions of patients undergoing orthodontic treatment, for the perceptions and possible adverse effects after using toothpaste based on Brazilian red propolis (BRP). **Materials and Methods:** This is a longitudinal clinical study. 40 participants used a toothpaste BRP three times a day for a total of four weeks. After 4 weeks, the end of the study, participants completed a questionnaire with a scale ranging from 0 to 10 for parameters such as taste, nausea, cleanliness, ease, irritation, odor and sense of taste change. **Results:** The taste, cleaning ability, ease and odor had high scores. There were no reports as to the possible adverse events such as irritation and change in taste. One participant reported the occurrence of nausea after brushing, indicating score 1. **Conclusion:** The use for 4 weeks of the BRP toothpaste

did not cause adverse effects and had a good acceptance by the users.

Key words: Antibiotics, Bacteremia, Intravenous, Oral Surgery, Impacted, Third Molar, Biofilm, Natural Products, Propolis, Saliva, Toothpaste.

Correspondence

Prof. Mônica Do Amaral Silva,

Federal University of Ceara, 1210 Capitaó Francisco Pedro, Rodolfo Teófilo, CE, BRAZIL.

Phone: +55 85 33668000

Email: monicaamaralufc@gmail.com

DOI: 10.5530/jyp.2019.11.x

INTRODUCTION

Many microorganisms that colonize both the tooth surface and adjacent structures such as the gingival, buccal mucosa and tongue inhabit the oral cavity. The diversity and complexity of the oral microbiota in different areas is established by the environmental characteristics of the cavity, such as high humidity, relatively constant temperature (34 to 36°C) pH near neutrality and nutrient availability. Factors such as age, diet, hormones, salivary flow, hygiene, alcoholism and others determine variability of the composition of the oral microbiota. It is known that in patients who are undergoing orthodontic treatment it is common the appearance of caries and gingivitis because of the difficulty of cleaning and plaque accumulation.^{1,2}

Studies report the use of antimicrobial products in controlling periodontal disease in formulations such as toothpastes and mouthwashes, which are indicated especially in controlling gingivitis in children and teenagers.³ Chlorhexidine is the most widely used antimicrobial in the treatment of gingivitis, being quite effective. However due side effects such as taste disturbance, tooth staining, recolonization, mucosal irritation, among other things, seeks to effectively substances but with minor adverse effects.^{4,5}

The use of natural products as an alternative therapy dates back to ancient age and they are essential in the production of new drugs. Dentistry research on natural products have increased in recent years due to the search for new substances with greater pharmacological activity, lower toxicity and greater biocompatibility, in addition to having more affordable value to the population.^{4,6}

Propolis is presented as a resin complex responsible for sealing of bee hives (*Apis mellifera*) and from the collection of them in various types of vegetables. Currently we have knowledge of at least 200 types of compounds identified in propolis from different geographical sample and botanical diversity. The main constituents are prenylated phenolic acid, lignans, terpenes, terpene alcohols and coumaric p-derivatives.⁷

The chemical composition of propolis depends on vegetation around the hive. Most of propolis are composed of 50% vegetable resin and balsam, 30% wax, 10% essential oils and aromatic compounds, 5% pollen, 5% other substances.⁸ The Brazilian propolis was classified into 13 different types according to their physicochemical characteristics and geographic location. The latest, red propolis has been classified as type 13 based on its unique chemical composition that is known for its high content of isoflavonoid, with particular interest in neovestitol and vestitol for anti-oxidant activity.⁹

The Neovestitol and Vestitol are the main bioactive compounds of Brazilian Red Propolis and exhibit anti-inflammatory and antimicrobial activity, with potential of action at a dose and concentration. Neovestitol and vestitol are isoflavones and can modulate the inflammatory processes such as those involving periodontal diseases and soft tissue changes. Studies also show the therapeutic effect of the propolis extract on inhibition of cariogenic microbial agents, being presented as a clinical option of low toxicity.⁹

Several studies show the therapeutic effect of propolis extract on inhibition of cariogenic microbial agents, moreover it appears as a clinical option low toxicity and high biocompatibility.^{10,11}

The aim of this study was to evaluate the perceptions of patients undergoing orthodontic treatment, for the sensations and possible adverse effects after using BRP toothpaste.

MATERIALS AND METHODS

Extract of Brazilian Red Propolis and preparation of toothpastes

The propolis extract was collected in the city of Marechal Deodoro (Latitude 44 555 South 9th, latitude 35°C 52 080 West and elevation of 1.8.1 m above sea level), region with geographical indications granted by the

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

National Institute of Industrial Property (INPI) in the state of Alagoas, Brazil. It used 150 g of the propolis extract dissolved in 1 L of great degree grain alcohol. The BRP extract at a concentration of 1% (previously studied antimicrobial concentration) was incorporated into the fluoridated toothpaste (1500ppm) in the Pharmaceutechnical Laboratory at the Federal University of Ceará, Brazil. After identification of chemical constituents by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), dentifrices were formulated with the same flavor, color and odor.

Criteria and Procedures for selection of subjects

This study is longitudinal, parallel, randomized, double-blind and controlled design. The selection of participants was held in Aracati-CE, town without public water fluoridation. Adolescents were selected under orthodontic treatment and visible plaque in public schools. Individuals who agreed to participate and do not fall into any of the exclusion criteria were met individually, to be given additional information about the study and clarify all remaining questions. After the collection of personal and general health data, they signed the Informed Consent Form (ICF) for participation in the study.

Presence of visible plaque on tooth surfaces, teenagers between 12 and 18 years, caries-free and being right-handed were included in the study. Presented systemic changes related to periodontal health-disease process, previous antibiotic therapy (treatment with antibiotic and/or anti-inflammatory) up to six months before the study, users of legal / illegal drugs, use of prostheses, patients with less than 10 elements per dental arch, patients with a history of allergies (asthma, urticarial, rhinitis, sinusitis), patients with a history of hypersensitivity to medicines, foods or other factors, patients with a history of chronic diseases, pregnancy and volunteer not want to continue for reasons other than adverse effects are excluded from the study.

Clinical Period

Participants received toothbrush of same brand, straight cord, small head and soft bristles and also the dentifrice treatment. All received standard oral hygiene instruction by the same instructor where the following topics were discussed:

Number of brushings: 03 daily brushings (after breakfast, after lunch and before bedtime);

Standardization in brushing technique which was explained similarly to the volunteers and their guardians;

Explanation of the harm that a cariogenic diet may lead to oral health.

Two visits were made:

Visit 01 (Day 0) - initial clinical consultation, delivery of toothpaste for use for four weeks and oral hygiene instruction;

Visit 02 (DAY 28) - Final consultation and application of questionnaires.

RESULTS

The average age of the participants was 15.1 (+/- 1.7).

Figure 1 shows the perception of patients regarding the acceptance of Brazilian red propolis dentifrice on a scale of 0 to 10. All parameters were above 8 scores.

Regarding possible adverse effects such as nausea, irritation and change in sense of taste, there was only one report of nausea without irritation reports or altered sense of taste (Figure 2).

DISCUSSION

In recent years, drug and embedded products with bioactive molecules are undergoing a technological revolution that extends from genetic engineering to molecular biology and biochemistry using the most advanced features. This advancement occurring at an accelerated pace is explained by the search for alternatives to synthetic drugs, generally loaded with

side effects and the support that science and the expansion of academic and clinical research is offering to drugs based on natural products, stating that popular medicine is in fact grounded by science.^{4,6,12}

Bioactive molecules are incorporated in different formulations existing in the market, especially mouthwash, for the dental plaque as Malvatricids⁵, Anapyon⁷, Clinexidin⁸, Malvatricin Plus⁹ Plax¹⁰ Colgate Fresh Tea, Própolis, Caléndula¹¹, Malvona¹², among others. Ribeiro *et al.* 2015. In addition to the mouthwashes, dentifrices are the most found formulations.¹²

Antimicrobials are widely used by individuals who have plaque build-up, besides chlorhexidine, triclosan, stannous fluoride; the essential oils have gained popularity. Toothpaste with natural products have demonstrated antimicrobial activity in several studies, having widely recommended use, especially against cariogenic and periodontal bacteria.¹³⁻¹⁵

It is known that orthodontic appliances facilitates biofilm buildup, which can cause bacterial imbalance and thus antibacterial substances could be used in plaque removal in individuals who have difficulty in mechanical control of dental plaque. Several studies demonstrate the antimicrobial activity of propolis. Fogueira *et al.* 2012 achieved significant results in patients with gingivitis.¹⁶

Chlorhexidine is the antimicrobial and antiseptic agent most widely used in dentistry, though it is documented that prolonged use causes adverse effects such as a change in color in the dental element, loss of sense of taste, burning of soft tissue, xerostomia, scaly lesions, mucosa ulcerations and unpleasant aftertaste in the mouth. These changes must be controlled and prevented through appropriate use in order to avoid local compromising.^{4,6,17} In the present study were not reported or observed

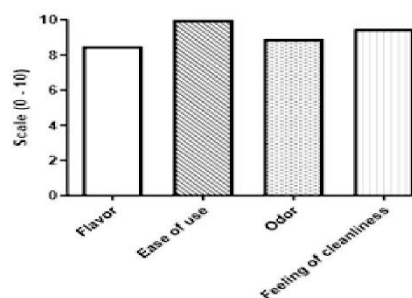


Figure 1: Perception of patients regarding the use of Brazilian red propolis dentifrice at the end of treatment.

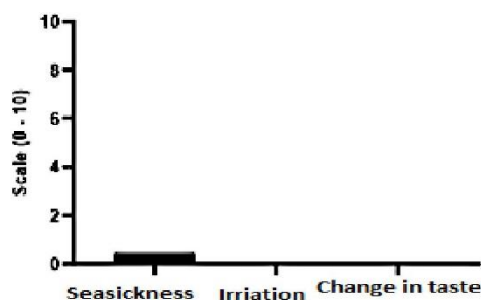


Figure 2: Adverse effects reported by patients following treatment with dentifrice of Brazilian red propolis.

adverse effects and only one patient reported feeling nauseous when using the dentifrice.

A crossover study by Bhat *et al.*¹⁸ showed greater efficiency in reduction of plaque using a dentifrice incorporated with propolis than using the commercial dentifrices tested in the study. Confirming efficacy of this natural compound for its antimicrobial activity.

Skaba *et al.*¹⁹ carried out studies which demonstrate the efficacy of preparations containing up to 3% propolis extract. In such experiments the toothpaste embedded with propolis assisted efficiently in plaque removal and proved to be able to improve the general health state of the marginal periodontium in patients with gingivitis.

Silva *et al.*²⁰ examined the antimicrobial activity of propolis and compared to that of chlorhexidine. In the study propolis showed significant antimicrobial activity, but lower than chlorhexidine.

The consistency of the dentifrice is an important parameter acceptance of the product, since it is responsible for the creep dispensation on the brush, spread the mouth, release rate of the flavoring and active ingredients, should all occur at a relatively brief time.²¹ In this study ease of use practically achieved maximum scores. Parameters as the taste, odor and cleanliness, also obtained high scores.

In Dentistry, the clinical use of natural products still finds acceptance resistance, possibly by the dogma that manufactured drugs have guaranteed effectiveness.²²

Diniz *et al.*²³ evaluated the perception of patients after use of essential oil based and compared with mouthwash rinses of cetylpyridinium chloride. In this study the group treated with essential oils rinses showed higher discomfort and burning. Use of oral rinses increases exposure to the oral mucosa alcohol and is not the preferred location for alcohol degradation, but some amount is absorbed and metabolized at the tissue level during swallowing, thus, dentifrices with antimicrobial properties become an option.²³ In this study there were no reports of irritation, a fact that must be connected to the 1% concentration of propolis used, resulting in a minimal amount of alcohol in the final preparation.

Toothpastes and rinses formulations containing essential oils obtained seal of acceptance of the American Dental Association (ADA) and have shown to possess excellent tolerability and safety, with no change reported in the perception of flavors by users.²⁴

CONCLUSION

After using for 4 weeks of BRP dentifrice, for patients undergoing orthodontic treatment, it caused no adverse effects and had great acceptance by users.

ACKNOWLEDGEMENT

We acknowledge all participants and Federal University of Ceara.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ABBREVIATIONS

INPI: National Institute of Industrial Property; BRP: Brazilian Red Propolis.

REFERENCES

1. Lins R, Vasconcelos FHP, Leite RB, Coelho-Soares RS, Barbosa DN. Avaliação clínica de bochechos com extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e Camo-

2. Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PH, Oliveira FSA. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2007;7(2):187-94.
3. Cagetti MG, Strohmenger L, Basile V, Abati S, Mastroberardino S, Campus G. Effect of a toothpaste containing triclosan, cetylpyridinium chloride and essential oils on gingival status in schoolchildren: A randomized clinical pilot study. *Quintessence International*. 2015;46(5):437-45.
4. Lobo PLD, Fonteles CSR, Marques LARV, Fechine FV, Fonseca SGC, Carvalho CBM *et al.* The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. *Phytomedicine*. 2014;21(9):1043-7.
5. Goes P, Dutra CS, Lisboa MR, Gondim DV, Leitão R, Brito GA, *et al.* Clinical efficacy of a 1% *Matricaria chamomile* L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. *Journal of Oral Science*. 2016;58(4):569-74.
6. Valadas LAR, Gurgel MF, Mororó JM, Fonseca SGC, Fonteles CSR, de Carvalho CBM *et al.* Dose-response evaluation of a copaiba-containing varnish against streptococcus mutans *in vivo*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018.
7. Anauate NC, Marcucci MC, Paulino N, Anido-Anido A, Amore R, De Mendonça S *et al.* Effects of typhoid propolis on mutans streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. *Brazilian Dental Science*. 2013;16(2):31-6.
8. De Araújo YLFM, De Mendonça LS, Orellano SC, De Araújo ED. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Scientia Plena*. 2011;7(4):1-4.
9. Bueno-Silva B, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva GV, Napimoga MH. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(19):4546-50.
10. Paula AMB, Gomes RT, Santiago WK, Dias RS, Cortés ME, Santos VR. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. *Pharmacologyonline*. 2006;3:467-73.
11. Liberio AS, Pereira ALA, Araujo MJAM, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V, *et al.* The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;125(1):1-9.
12. Furtado JH, Valadas LAR, Mendonça KS, de Oliveira FRD, Gadelha LMU, Fiallos NM. A Technological Prospection. *Recent Patents on Biotechnology*. 2018;12(4):288-96.
13. Sunitha J, Ananthakshmi R, Jeeva JS, Jeddy N, Dhakshinamoorthy S, Muthu MRM. Antimicrobial effect of herbal dentifrices: An *in vitro* study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(2):S628-31.
14. Shaheen SS, Reddy P, Ilemalatha SR, Doshi D, Kulkarni S, Kumar M. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(4):ZC42-6.
15. Serbiak B, Fource T, Geonnotti AR, Gambogi RJ. *In vitro* efficacy of essential oil mouth rinse versus dentifrices. *Journal of Dentistry*. 2018;69:49-54.
16. Fosquiera EC, Steffens JP, Reinke SMG, Possagno RC, Kozłowski JVA, Rezende ED, *et al.* Efeito da própolis no crescimento *in vitro* de microrganismos associados à periodontite em pacientes HIV-positivo. *Revista Periodontia*. 2008;18(3):77-82.
17. Pegoraro J, Silvestri L, Cara G, Stefenon L, Mozzini CB. Efeitos adversos do gluconato de clorexidina à 0, 12%. *Journal of Oral Investigations*. 2015;3(1):33-7.
18. Bhat N, Bapat S, Asawa K, Tak M, Chaturvedi P, Gupta VV, *et al.* The antiplaque efficacy of propolis-based herbal toothpaste: A crossover clinical study. *J Nat Sci Biol Med*. 2015;6(2):364-8.
19. Skaba D, Morawiec T, Tanasiewicz M, Mertas A, Bobela E, Szliszka E *et al.* Influence of the Toothpaste with Brazilian Ethanol Extract Propolis on the Oral Cavity Health. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013. ID 215391.
20. Da Silva A, Ferreira FDCA, Capel LMM, Botelho MPJ. Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana de Extrato Alcoólico de Própolis Comparado à Solução de Clorexidina 0, 12%. *Journal of Health Sciences*. 2017;19(2):95-7.
21. Nunes RS, Lira AAM, Lacerda CM, Silva DOB, Silva JA, Santana DP. Obtention and evaluation of odontologic products made with the crude extract of *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) over the dental biofilm. *Rev Odontol UNESP*. 2006;35(4):275-83.
22. Bettega PVC, Człusniak GR, Piva R, Namba EL, Ribas CR, Grégio AMT, Rosa EAR. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. *Archives of Oral Research*. 2011;7(1):89-97.
23. Diniz PA, Lima CF, Fernandes EE, Joias RP, Rode SDM. Percepção dos pacientes em uso de enxaguatórios bucais: óleos essenciais e cloreto de cetilpiridíneo. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*. 2014;68(3):245-9.
24. Charles CH, Sharma NC, Galustians HJ, Qaqish J, McGuire JA, Vincent JW. Comparative efficacy of an CH, antiseptic mouthrinse and an antiplaque/antigingivitis dentifrice: A six-month clinical trial. *J Am Dent Assoc*. 2001;132(5):670-5.

Article History: Submission Date : xx-xx-xxx; Revised Date : xx-xx-xxxx; Acceptance Date : xx-xx-xxxx.

Cite this article: Silva MDA, Valadas IAR, Júnior FJG, Oliveira GALD, Neto EMR, Ponte ED, *et al.* Perception and Adverse Effects of Patients after using Propolis-Containing Dentifrice. *J Young Pharm*. 2019;11(2):x-x.

APÊNDICE I
FICHA DE ANAMNESE
DADOS PESSOAIS E EXAME DENTÁRIO

NOME: _____
 IDADE _____ DATA DE NASCIMENTO _____
 NOME DO PAI _____
 NOME DA MÃE _____
 RESPONSÁVEL LEGAL _____
 ENDEREÇO _____
 TELEFONE PARA CONTATO _____

ESTADO DE SAÚDE GERAL
FAVOR LER E RESPONDER COM ATENÇÃO.

- 1) O seu filho ou filha se encontra sob tratamento médico? SIM NÃO
 Especifique. Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____
- 2) O seu filho ou filha tem alguma doença crônica? SIM NÃO
 Especifique. Caso a sua resposta tenha sido SIM.

- 3) O seu filho ou filha está tomando algum medicamento (remédio)? SIM NÃO
 Especifique. Caso a sua resposta tenha sido SIM.

- 4) O seu filho ou filha tem algum tipo de doença alérgica? SIM NÃO
 Especifique. Caso a sua resposta tenha sido SIM.

- 5) O seu filho ou filha já apresentou alergia a algum tipo de medicamento? SIM NÃO
 Identifique o(s) medicamento(s). Caso sua resposta tenha sido SIM.

- 5) O seu filho ou filha já esteve hospitalizado (a)? SIM NÃO
 Especifique o motivo. Caso a sua resposta tenha sido SIM.

Afirmo que as informações acima são verdadeiras.

Data _____

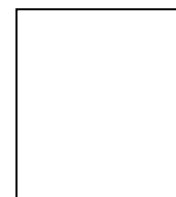
Assinatura _____

RG: _____

Testemunha1: _____

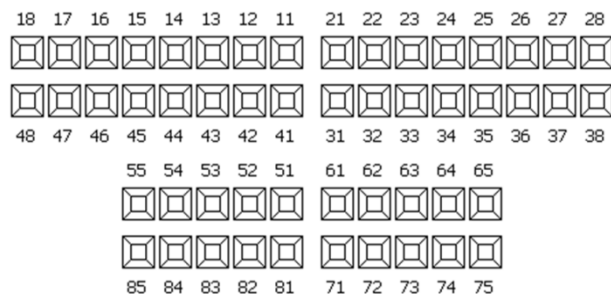
Testemunha2: _____

Pesquisador: _____



EXAME DENTÁRIO

NOME _____

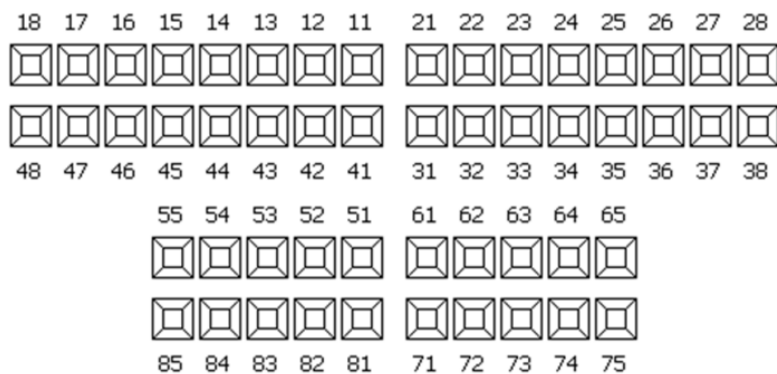


VISITA 01

ÍNDICE DE PLACA

Critérios e códigos adotados para o IPI

Critérios	Códigos
Ausência de placa na região cervical	0
Sem placa visível a olho nu, mas visível na extremidade da sonda após movê-la pela superfície da entrada do sulco gengival	1
A região gengival é revestida por uma camada fina e moderada de placa, sendo que o depósito é visível a olho nu	2
Acúmulo pesado de matéria mole, cuja espessura preenche o nicho produzido pela margem gengival e superfície dental; a região interdentária fica apinhada com partículas moles	3



VISITA 02

Critérios e códigos adotados para o IPI

Critérios	Códigos
Ausência de placa na região cervical	0
Sem placa visível a olho nu, mas visível na extremidade da sonda após movê-la pela superfície da entrada do sulco gengival	1
A região gengival é revestida por uma camada fina e moderada de placa, sendo que o depósito é visível a olho nu	2
Acúmulo pesado de matéria mole, cuja espessura preenche o nicho produzido pela margem gengival e superfície dental; a região interdentária fica apinhada com partículas moles	3

