



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ADRIANO COSTA RAMOS

**ESTUDO DO EFEITO PROTETOR DO TIROSOL EM MODELO EXPERIMENTAL  
DA GENGVITE**

Recife  
2021

ADRIANO COSTA RAMOS

**ESTUDO DO EFEITO PROTETOR DO TIROSOL EM MODELO EXPERIMENTAL  
DA GENGIVITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Coorientador (a): Profa. Dra. Adriana Maria da Silva Telles

Recife

2021

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

R175e Ramos, Adriano Costa  
Estudo do efeito protetor do tirosol em modelo experimental da gengivite / Adriano Costa Ramos. – 2021.  
84 f. : il.

Orientador: Gustavo Pina Godoy.  
Coorientadora: Adriana Maria da Silva Telles.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2021.  
Inclui referências e anexos.

1. Tirosol. 2. Gengivite. 3. Anti-inflamatórios. 4. Produtos Biológicos. 5. Genotoxicidade. 6. Azeite de oliva. I. Godoy, Gustavo Pina (orientador). II. Telles, Adriana Maria da Silva. (coorientadora)  
Título.

617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2021 - 198)

ADRIANO COSTA RAMOS

**ESTUDO DO EFEITO PROTETOR DO TIROSOL EM MODELO  
EXPERIMENTAL DA GENGIVITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Integrada

Aprovado em: 27/08/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> RUTHINEIA DIÓGENES ALVES UCHÔA  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO GALVÃO BARBOZA  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> KEILA MARTHA AMORIM BARROSO  
Universidade Federal da Paraíba

---

Prof. Dr. FELIPE BRAVO MACHADO DE ANDRADE  
Faculdade de Odontologia do Recife – FOR

---

Prof. Dr. ARNALDO DE FRANÇA CALDAS JÚNIOR  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho ao meu Pai MOACYR CUNHA RAMOS (*in Memoriam*) que sempre disse que a dignidade de um homem NÃO se dá pela força que ele tem, mas SIM pelo poder de transformar o mundo com o conhecimento e sabedoria que adquire.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e, ACIMA de tudo, eu agradeço a Deus por me dar condições suficientes para chegar até aqui. Faço das minhas palavras a do salmista que no salmo 126: *“Quando o Senhor libertou seus filhos do cativo e os trouxe de volta a Sião, nossa vida parecia como um sonho. A nossa boca se encheu de riso e nossos lábios de cânticos de alegria. Grandes coisas fez o Senhor por nós, por isto estamos alegres”*.

Lembrar de toda a minha trajetória no programa de doutorado me faz reconhecer que sem Ele (Deus) eu jamais conseguiria chegar onde cheguei. Ele que colocou pessoas maravilhosas em meu caminho. E são estas pessoas que irei dedicar os meus agradecimentos.

Agradeço a minha querida professora Adriana Telles. Ela que, em uma conversa casual num balcão de farmácia me encorajou a prestar a seleção para o doutorado. Foi ela que com muito carinho me direcionou a um dos meus melhores presentes acadêmicos. Meu orientador Gustavo Godoy. Quero agradecer de maneira muito especial por todo ensinamento dado. Todas as orientações, que sem sombra de dúvidas, eu levo para meus alunos. Seu jeito empático, carinhoso com seus orientandos, sua dedicação nas atividades extracurriculares. Isto de fato, me chamou muita atenção.

Quero agradecer a todos meus amigos, colegas do programa, por todos momentos bons que vivemos juntos. Toda a parceria nesta caminhada foi indispensável. Agradeço aos meus amigos de trabalho e de estudo que me deram muita força nos artigos, nas produções acadêmicas. Agradeço a minha Família, minha mãe, minha avó, meu avô (*in memoriam*) que partiu sem ver o fim do doutorado, mas que, em vida, e com lágrimas nos olhos falava para todo mundo que tinha um neto Doutor de verdade. Agradeço a minha irmã por todo suporte.

Enfim agradeço a você que está lendo este texto. Porque o motivo maior da ciência é mostrar para mundo o que é produzido e pesquisado. Espero que este trabalho possa te encorajar a fazer mais pela ciência como fez a mim. A todos o meu OBRIGADO!!!

“Sobre tudo o que se deve guardar, guarda o teu coração, porque dele procedem as fontes da vida.” - Provérbios 4:23.  
(ALMEIDA, 2013, p. 918)

## RESUMO

A gengivite é uma inflamação autolimitante localizada nos tecidos gengivais que não acomete o periodonto de sustentação. Várias formas de tratar a gengivite são conhecidas. Desde a remoção mecânica do biofilme dentário até a utilização de medicamentos para controle da infecção e inflamação. O tirosol, conhecido como álcool p-hidroxifenético, é um composto fenólico que possui muitas propriedades positivas, principalmente associadas ao seu potencial de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Diante do que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi demonstrar o efeito protetor do tirosol em modelo experimental da gengivite. Para avaliação deste efeito protetor foram analisados desde aspectos toxicológicos até anti-inflamatória, antimicrobiana e enzimática. O Tirosol foi extraído do azeite de oliva (*Olea Europaea L.*) a partir de um extrato seco liofilizado e ultra processado. A atividade antioxidante da espécie vegetal foi determinada através do ensaio de captura de radicais DPPH\*. Para a avaliação da toxicidade aguda o composto tirosol foi testado de acordo com o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2016). Foram utilizados 20 camundongos Swiss. Nos testes histológicos e enzimáticos foram utilizados 25 ratos winstar machos. Estes foram divididos em animais saudáveis, animais com a gengivite e animais com gengivite tratados com tirosol nas concentrações de 3, 15 e 30mg/kg. Após o tratamento dos animais, as amostras coletadas foram processadas e analisadas. O tirosol foi avaliado segundo a atividade antimicrobiana através da análise de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Biocida (CMB) utilizando cepa de *Streptococcus mutans* UFPEDA 766. O tirosol apresentou-se seguro nos testes de toxicidade. Histologicamente os animais tratados com a concentração de 30mg/kg não apresentaram elevada concentração de infiltrado inflamatório e seu reparo tecidual se assemelhou ao grupo controle. Nos animais tratados com o tirosol houve aumento das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em relação ao grupo com gengivite. Não houve resposta antimicrobiana do tirosol frente a cepa analisada. Conclui-se que o tirosol possui segurança toxicológica podendo ser promissor antioxidante e anti-inflamatório em terapias gengivais.

**Palavras-chave:** tirosol; gengivite; anti-inflamatório; produtos naturais; Genotoxicidade; azeite de oliva;

## ABSTRACT

Gingivitis is a self-limiting inflammation located in the gingival tissues that does not affect the supporting periodontium. Several ways to treat gingivitis are known. From the mechanical removal of dental biofilm to the use of drugs to control infection and inflammation. Tyrosol, known as p-hydroxyphenethyl alcohol, is a phenolic compound that has many positive properties, mainly associated with its potential for scavenging reactive oxygen species (ROS). Given the above, the objective of this work was to demonstrate the protective effect of tyrosol in an experimental model of gingivitis. To evaluate this protective effect, from toxicological to anti-inflammatory, antimicrobial and enzymatic aspects were analyzed. Tyrosol was extracted from olive oil (*Olea Europaea* L.) from a freeze-dried and ultra-processed dry extract. The antioxidant activity of the plant species was determined through the DPPH<sup>•</sup> radical scavenging assay. For the assessment of acute toxicity the tyrosol compound was tested according to the experimental protocol Guideline 423 (OECD 423; 2016). Twenty Swiss mice were used. In the histological and enzymatic tests, 25 male winstar rats were used. These were divided into healthy animals, animals with gingivitis and animals with gingivitis treated with tyrosol at concentrations of 3, 15 and 30mg/kg. After the treatment of the animals, the collected samples were processed and analyzed. Tyrosol was evaluated according to antimicrobial activity through the analysis of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Biocidal Concentration (CMB) using a strain of *Streptococcus mutans* UFPEDA 766. Tyrosol was shown to be safe in toxicity tests. Histologically, the animals treated with a concentration of 30mg/kg did not show a high concentration of inflammatory infiltrate and their tissue repair was similar to the control group. In animals treated with tyrosol there was an increase in the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in relation to the group with gingivitis. There was no antimicrobial response of tyrosol against the analyzed strain. It is concluded that tyrosol has toxicological safety and may be a promising antioxidant and anti-inflammatory in gingival therapies.

**Keywords:** tyrosol; gingiviti; anti-inflammatory; natural products; genotoxicity; olive oil;

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### TESE

<b>Figura 1 –</b>	Componentes das respostas inflamatórias, aguda e crônica, e suas principais funções.	17
<b>Figura 2-</b>	Resumo dos principais mediadores inflamatórios.	19
<b>Figura 3 –</b>	Cascata Inflamatória do Ácido Araquidônico	20
<b>Figura 4 –</b>	Processo intracelular para formação de ERO's.	21
<b>Figura 5 -</b>	Vias Extrínseca e Intrínseca da Apoptose Celular	22
<b>Figura 6 -</b>	Representação da Gengivite	23
<b>Figura 7 -</b>	Representação Esquemática dos Complexos Microbianos que atuam na patogênese das D.P.	26
<b>Figura 8 -</b>	Representação Molecular do Tirosol	30
<b>Figura 9 -</b>	Esquema representativo dos benefícios do Tirosol e sua Possível Ação na Cascata Inflamatória	31
<b>ARTIGO 1 – ESTUDO DO EFEITO PROTETOR DO TIROSOL EM MODELO EXPERIMENTAL DA GENGIVITE</b>		
<b>Quadro 1 -</b>	Análise comparativa dos animais tratados e não tratados com o Tirosol segundo o peso.	51
<b>Quadro 2 -</b>	Análise comparativa de intensidade de infiltrado inflamatório, densidade de fibras colágenas e recuperação epitelial	52

<b>Figura 1 -</b>	Imagem ilustrativa da eletroforese em gel de agarose mostrando em (A, B, C, D) as fases do experimento ensaio cometa	50
<b>Figura 2 -</b>	Análise Histológica do efeito Anti-inflamatório do Tirosol	52
<b>Figura 3 -</b>	CMI do Tirosol Frente a Cepa de <i>Streptococcus mutans</i> UFPEDA 766.	55
<b>Gráfico 1 -</b>	Ensaio Cometa	49
<b>Gráfico 2 -</b>	Teste do Micronúcleo	50
<b>Gráfico 3 -</b>	Avaliação da atividade da Catalase sob o efeito protetor do Tirosol em modelo experimental da Gengivite	53
<b>Gráfico 4 -</b>	Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) sob o efeito protetor do Tirosol em modelo experimental da Gengivite	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BHI</b>	(Brain Heart Infusion ) – Infusão de Sangue e Coração
<b>BHT</b>	Di-terc-butil metil fenol
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética Animal
<b>CMB</b>	Concentração Mínima Biocida
<b>CMi</b>	Concentração Mínima Inibitória
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase 2
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DP</b>	Doença periodontal
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>EROs</b>	Espécies reativas do oxigênio
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HCl:</b>	Ácido clorídrico
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>I.P</b>	Intraperitoneal
<b>IPC</b>	Índice Periodontal Comunitário
<b>IPIP</b>	Índice de Perda de Inserção Periodontal
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio

<b>ON</b>	Óxido Nítrico
<b>ONSI</b>	Óxido Nítrico Sintase Induzível
<b>PBS</b>	Solução salina com tampão fosfato (Sigla padronizada - Inglês)
<b>PCR</b>	Proteína C Reativa
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico (Sigla padronizada – inglês)
<b>SBBrazil</b>	Saúde Bucal Brasil
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<b>V.O</b>	Via oral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>17</b>
2.1	Processo inflamatório	17
2.1.1	<i>Mediadores químicos da inflamação</i>	18
2.1.2	<i>Estresse oxidativo</i>	20
2.1.3	<i>Mecanismo de apoptose</i>	21
2.2	Gengivite	23
2.2.1	<i>Epidemiologia da gengivite</i>	24
2.2.2	<i>Patogênese da gengivite</i>	25
2.2.3	<i>Principais estratégias para o tratamento da gengivite</i>	27
2.3	Estratégia antioxidante dos produtos naturais	28
2.4	Tirosol	29
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
3.1	Aspectos éticos	32
3.2	Obtenção do composto isolado	32
3.3	Avaliação da atividade antioxidante “in vitro” do tirosol	32
3.4	Avaliação da toxicidade aguda do tirosol	33
3.5	Avaliação da mutagênicidade e genotoxicidade do tirosol	33
3.5.1	<i>Ensaio cometa</i>	33
3.5.2	<i>Teste do micronúcleo</i>	34
3.6	Grupos experimentais	35
3.6.1	<i>Processamento histológico</i>	36

3.7	Dissecações da área periodontal e homogeneização das amostras teciduais do periodonto para dosagens bioquímicas	36
3.7.1	<i>Determinação da atividade da catalase</i>	36
3.7.2	<i>Determinação da atividade da superóxido dismutase</i>	36
3.8	Análise da atividade antimicrobiana do tirosol	37
3.9	Análise estatística	38
<b>4</b>	<b>ARTIGOS</b>	<b>39</b>
4.1	<b>Artigo:</b> Estudo Do Efeito Protetor Do Tirosol (Composto Isolado Da <i>Olea Europaea L.</i> ) Em Modelo Experimental Da Gengivite	39
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXP A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO B – NORMAS DA REVISTA</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Doenças Periodontais (DP) são desordens inflamatórias de origem infecciosa que acometem o periodonto de proteção (Gengiva Marginal Livre, Gengiva Inserida e Gengiva Papilar) e o periodonto de sustentação (Cemento, Ligamento Periodontal e Osso Alveolar). Elas são consequências de reações imunoinflamatórias geradas pelo hospedeiro como resposta ao processo infeccioso originado pelo microrganismo patógeno (STEFFENS; MARCANTONIO, 2018). Cientes de que os periodontopatógenos são essenciais para o desencadeamento da doença e que, a evolução, assim como a gravidade estão relacionadas com a susceptibilidade do hospedeiro, a coexistência de comorbidades e a presença de aspectos comportamentais e de higiene podem interferir diretamente no desenvolvimento das periodontopatias (VIEIRA; PÉRET FILHO, 2010).

As DP estão associadas a diversas condições patológicas, desde inflamação do tecido gengival, passando por degeneração do ligamento periodontal, do cemento radicular e até da destruição do osso alveolar (TARIQ *et al.*, 2012). De acordo com Dahlen, Basic e Bylund Diante da complexidade destas doenças, foi estabelecido um guia com a nova classificação das DP. Em consenso com os principais grupos de pesquisa foi elencado as principais condições no processo saúde/doença periodontal. São elas: 1- Saúde Periodontal, Condições e Doenças Gengivais; 2- Periodontite; 3 – Outras condições que afetam o periodonto. Dentre estas desordens se destaca a gengivite, que mesmo sendo uma condição autolimitante, é uma das doenças mais frequentes no periodonto, e quando não tratada pode evoluir para as demais desordens periodontais (STEFFENS; MARCANTONIO 2018).

Quando destacamos a susceptibilidade do hospedeiro na patogenia das DP, fatores individuais (predisposição genética, presença de comorbidades) e ambientais (interferência do tabagismo, etilismo e alguns medicamentos) aumentam a severidade da doença. Além destes, estudos mais atualizados sobre o tema correlacionou as DP com problemas cardiovasculares, doenças neurodegenerativas (como o Alzheimer) e artrite reumatoide, seja como uma das consequências ou como fator predisponente para tais desordens (ZIEBOLZ *et al.*, 2017; HASHIMOTO&HASHIMOTO, SHIMAZAKI, 2020).

O tecido gengival possui características estruturais e funcionais naturalmente sensíveis à ação de diversos agentes agressores. Estes agentes não somente interferem no metabolismo

celular como podem induzir apoptose. Dentre estes agentes se destaca as espécies reativas de oxigênio (ERO's), que além de danificar estruturalmente componentes celulares, favorece no mecanismo de resposta inflamatória do hospedeiro (ANAND, 2017).

Visando estratégias terapêuticas que modulem estes agentes agressores, muitas pesquisas tem proposto alternativas naturais para combater as ERO's. Desde o uso de óleos essenciais, como compostos antioxidantes isolados de espécimes vegetais (AVOLA et al, 2018). O Tirosol (- 2 - (4- hidroxifenil) -etanol) é um dos maiores representantes dos compostos fenólicos encontrados nas azeitonas e no azeite de oliva. Este produto isolado sob a forma de ésteres do ácido fenólico também é encontrado nas uvas e no vinho. Por possuir a funcionalidade do grupamento fenólico, o Tirosol possui grande reatividade e atua como potente antioxidante (SUN; ZHOU & SHANDI, 2017).

Postula-se que o Tirosol possui eficácia na inibição da oxidação do colesterol em lipoproteínas de baixa densidade, na inibição da 5-lipooxigenase leucocitária, exibindo também papel protetor contra os efeitos citostáticos produzidos pelas lipoproteínas oxidadas de baixa densidade nas células da mucosa intestinal Caco-2 (PAULO & SANTOS, 2020).

Além disto, o tirosol e o hidroxitirosol possuem ação antimicrobiana para certos grupos de fungos, como no caso dos pertencentes ao gênero *Cunninghamella* (em especial a espécie *C. Elegans*) e ao gênero *Candida*, especialmente *Candida. albicans spp.* Através de mecanismos de ação, que podem ser o “up regulation” ou por sistema de *quorum sensing*, o tirosol apresenta inibição significativa destes organismos supracitados. (RODRIGUES & ČERNÁKOVÁ, 2020 ; KHAN, SALEEM & MURPHY, 2021).

A partir deste pressuposto, o presente trabalho busca associar o Tirosol como agente protetor e como terapia farmacológica para o tratamento da gengivite.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

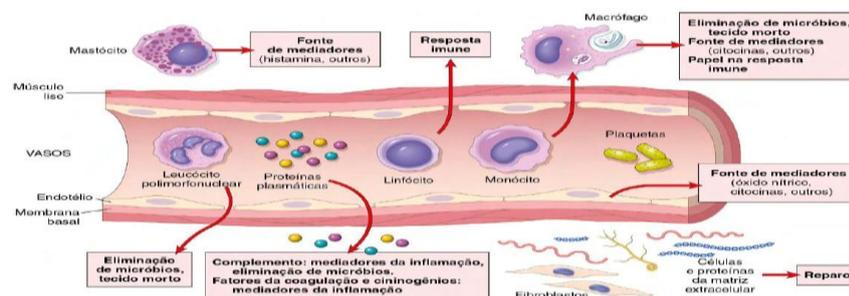
### 2.1 Processo Inflamatório

Para que todos os seres humanos permaneçam vivos e saudáveis, a defesa do sistema imune é fundamental. A inflamação (Latim - *inflamare*; colocar fogo) faz parte de uma complexa resposta biológica dos tecidos vasculares para estimular a defesa do organismo contra agentes patógenos invasores. O processo inflamatório exerce sua função minimizando, destruindo e/ou neutralizando os agentes nocivos. Sem a inflamação, as infecções avançariam e qualquer tipo de injúria não seria regenerada ou mesmo cicatrizada (KUMAWAT et al, 2012).

O problema encontrado no processo inflamatório é que, por muitas vezes, e dependendo do grau de intensidade, pode-se lesionar células e tecidos saudáveis. A inflamação por si, não é o verdadeiro problema. O agente complicador seria o descontrole deste processo e suas consequências nos tecidos sadios (LIMA et al, 2007).

A capacidade de montar uma resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência do organismo. Seja no enfrentamento contra patógenos do meio ambiente ou contra algumas doenças ou situações inespecíficas, a resposta inflamatória pode ser exagerada e sustentada sem benefício aparente e até mesmo com consequências adversas graves. Não importa qual é o estímulo inicial, os sintomas inflamatórios clássicos incluem calor, dor, rubor e tumor. A resposta inflamatória é caracterizada mecanicamente por uma vasodilatação local transitória seguida de aumento da permeabilidade capilar, infiltração de leucócitos e células fagocíticas, degeneração tecidual e fibrose (GOODMAN & GUILMAN, 2016).

**Figura 01** – Componentes das respostas inflamatórias, aguda e crônica e suas principais funções.



(Fonte: RBBINS et al, 2018)

A inflamação é induzida por mediadores químicos produzidos pelas células do hospedeiro em resposta a um estímulo nocivo. Muitas moléculas participam da promoção e da resolução deste processo. Um exemplo disto é a histamina, uma das primeiras moléculas descobertas e identificadas na inflamação. Além desta, podemos citar prostaglandinas, interleucinas, fatores de necrose tumoral, bradichininas, leucotrienos dentre tantas outras.

Compreender como a bioquímica da inflamação conduz todo o processo é, de todo, importante para se propor alternativas terapêuticas para minimizar seus efeitos (GONZÁLES-MENEZES et al, 2020).

A inflamação pode ser classificada em processo inflamatório agudo e crônico. Na inflamação aguda ocorre uma resposta rápida e intensa que levam as células polimorfonucleares (PMN) e as proteínas plasmáticas para os locais da lesão. Uma vez sitiados, os leucócitos removem os agentes invasores e dão início ao processo de fagocitose dos tecidos necróticos. Há uma grande participação de biomoléculas sintetizadas pela cascata inflamatória juntamente com um potencial fator destrutivo de células e tecidos sadios (ROBBINS et al, 2018).

Já na inflamação crônica existe um tempo de duração mais prolongado (podendo intercorrer entre semanas, meses ou anos) podendo resultar tanto na destruição tecidual quanto em uma reparação por fibrose. Vale destacar que estas respostas ocorrem simultaneamente. Ao contrário da inflamação aguda, que é caracterizada pelas alterações vasculares, edema e infiltrado predominantemente de neutrófilos, a inflamação crônica caracteriza-se por um conjunto de alterações fundamentais. Estas mudanças vão desde modificação dos tipos celulares envolvidos (ex. Macrófagos e Linfócitos); destruição tecidual francamente reduzida e reparo tecidual fibrótico envolvendo a proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) (GOODMAN & GUILMAN, 2016).

### 2.1.1 *Mediadores Químicos Da Inflamação*

O recrutamento de células inflamatórias para os locais da lesão também envolve as interações combinadas de vários tipos de mediadores solúveis. Eles podem agir como agentes quimiotáticos, fatores de crescimento e adesão, indutores de expressão gênica e proteica dentre outras que orquestram o processo inflamatório (POLUHA & GROSSMANN, 2018).

Os mediadores inflamatórios (Figura 02) podem ser classificados de acordo com a sua etiologia. Ou são de origem celular (ex. macrófagos, mastócitos, neutrófilos) ou são moléculas quimicamente ativas (ex. eicosanoides, óxido nítrico, histamina, cininas, serotonina, produtos das ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases, fator de ativação plaquetário, citocinas pró-inflamatórias, Fator de necrose tumoral, interleucinas) (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JÚNIOR; COHEN, 2016).

**Figura 02** - Resumo dos principais mediadores inflamatórios.

MEDIADORES	FONTES	AÇÕES
Histamina	Mastócitos, basófilos, plaquetas, células da epiderme e neurônios do sistema nervoso central.	Vasodilatação; aumento da permeabilidade vascular; ativação endotelial e estimulação da liberação de serotonina.
Serotonina (5-HT)	Neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central e nas células enterocromafins. Plaquetas (que captam 5-TH da circulação)	Vasodilatação; aumento da permeabilidade vascular e nocicepção.
Cininas (Brdicnina)	Substrato plasmático, através da metabolização do cininogênio pela calicreína.	Vasodilatação; aumento de permeabilidade vascular; promoção da síntese de IL-1 e TNF e ativação de fosfolipase A2 e C
Prostaciclina (PGI 2)	Mastócitos dos fosfolípidios de membrana.	Potencialização dos efeitos da histamina e cininas.
Prostaglandinas (PGE 2; PGF 2)	Mastócitos dos fosfolípidios de membrana.	Potencialização dos efeitos da histamina e cininas; hiperalgesia das terminações nervosas.
Tromboxanos (TXA 2)	Mastócitos dos fosfolípidios de membrana.	Coagulante intravascular; mantenedor da normalidade intravascular.
Leucotrienos (LTB 4)	Leucócitos.	Quimiotaxia; agregação e degranulação de leucócitos polimorfonucleares.
Fator de Ativação Plaquetário (PAF)	Leucócitos, mastócitos e plaquetas.	Vasodilatação; aumento da permeabilidade vascular; quimiotaxia, agregação e degranulação de leucócitos polimorfonucleares.
Óxido Nítrico	Macrófagos e células endoteliais.	Vasodilatação; redução da agregação plaquetária.
Fator de Necrose Tumoral (TNF - $\alpha$ )	Monócitos, macrófagos e linfócitos- T	Ativação da coagulação; estimulação da expressão de moléculas de adesão, PGE, PAF, glicocorticoides, eicosanoides, além de influenciar a apoptose celular.
Interleucinas - 1 (IL-1)	Macrófagos, monócitos, fibroblastos, células dendríticas, linfócitos B, células NK e células epiteliais.	Importante marcador de indução da resposta inflamatória, associada à infecção aguda.
Interleucinas -1 (IL-6)	Monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais.	Regulação de reações imunológicas, inflamação, hematopoiese e oncogênese; maturação e ativação de diversas células inflamatórias

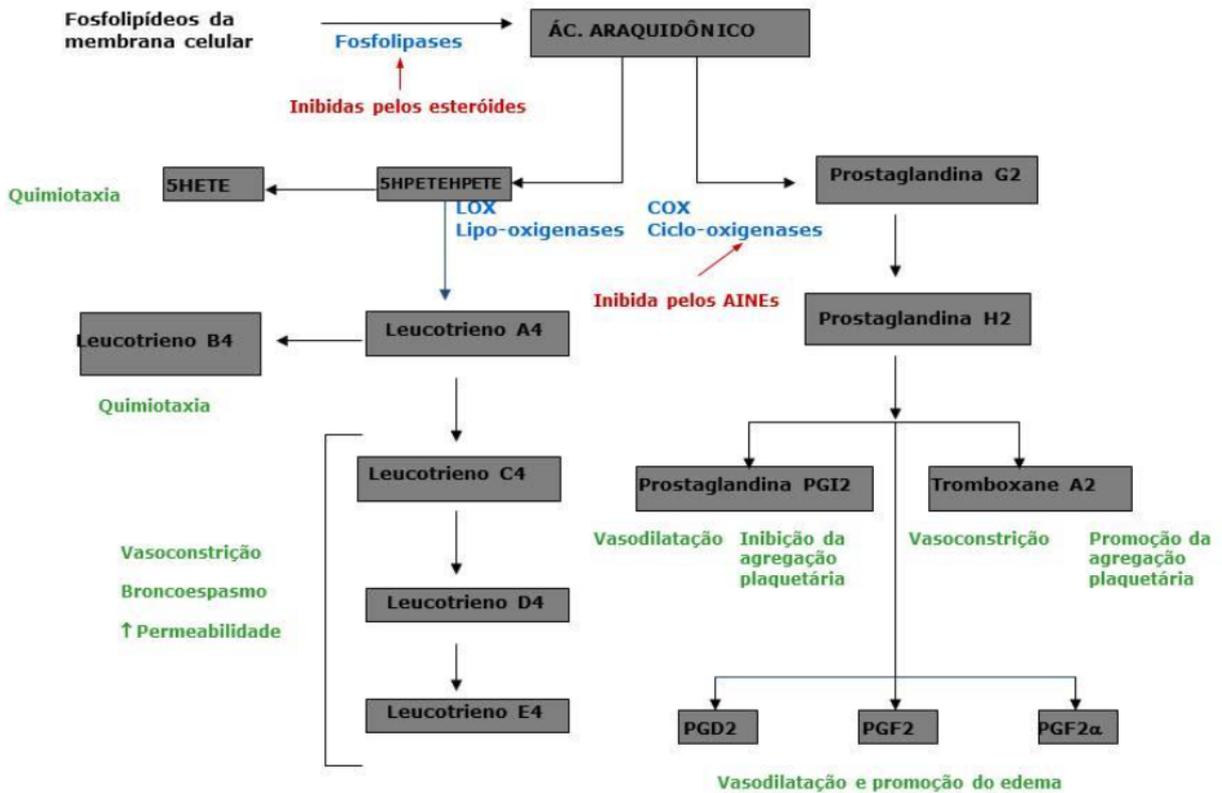
(Fonte: POLUHA &amp; GROSSMANN. 2018)

Qualquer indivíduo que tenha sido acometido de algum episódio severo de doença viral (como a COVID-19) experimentou dos efeitos sistêmicos da inflamação, coletivamente chamados de *reação da fase aguda* ou síndrome da resposta inflamatória sistêmica. As citocinas *TNF*, *IL-1* e *IL-6* são os mediadores mais importantes da reação da fase aguda. Estas citocinas são produzidas pelos leucócitos (e outros tipos celulares) em resposta à infecção ou em reações imunes, sendo liberadas na circulação. Estes mediadores citados por exemplo, não só fazem parte do processo desencadeador da inflamação como, também, são participantes dos efeitos agravantes gerados por ela (ROBBINS et al, 2018).

Na cascata inflamatória (Figura 03), os mediadores que são produzidos têm o poder de modificar o metabolismo das células situadas no local da lesão. O poder quimiotático e regulador dos mediadores faz com que subprodutos da reação inflamatória sejam armazenados no citoplasma das células doentes

e sadias. Ao se elevar os níveis destes subprodutos metabólicos, eles desencadeiam uma resposta danosa conhecida como estresse oxidativo (ALEKSANDROVA; KOELMAN & RODRIGUES, 2021).

**Figura 03** - Cascata Inflamatória do Ácido Araquidônico



(Fonte: <https://universoracionalista.org/a-inflamacao-e-a-biossintese-dos-eicosanoides/>.)

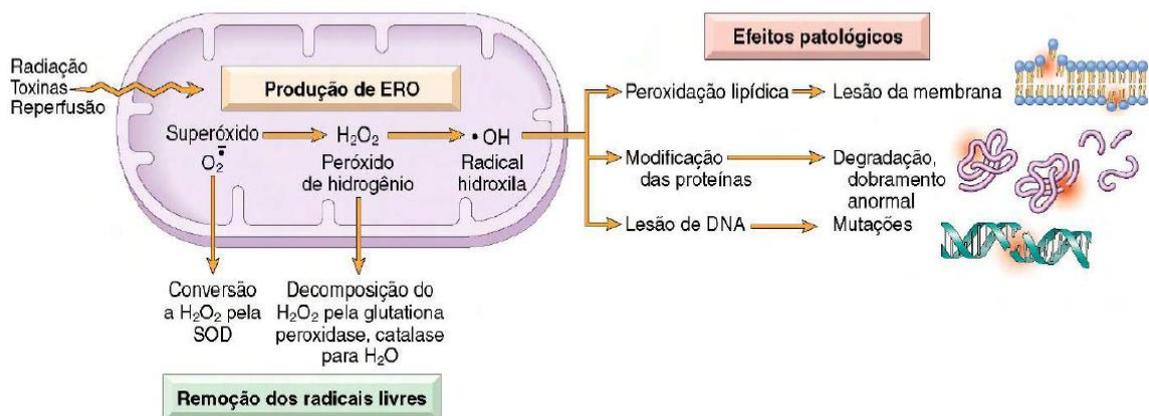
### 2.1.2 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado como um desbalanço entre a produção e acumulação das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's). As células e tecidos possuem a habilidade natural de detoxificar as ERO's minimizando seus efeitos danosos. No entanto, nem sempre esta capacidade de detoxificar acontece em sua totalidade. O estresse oxidativo e a inflamação estão intimamente relacionados. Isto porque, de um lado, as ERO's iniciam um processo de sinalização que aumenta a expressão gênica de agentes pró inflamatórios, e por outro lado, células inflamadas secretam ERO's e mediadores imunológicos que juntos induzem o estresse oxidativo no tecido lesionado pela inflamação (ALEKSANDROVA; KOELMAN & RODRIGUES, 2021).

Na respiração aeróbica há uma série de reações de oxirredução, principalmente para síntese de adenosina trifosfato (ATP), a maior fonte de energia celular. Nesta cadeia respiratória, a produção de ERO's (Figura 04) acontece naturalmente e, produtos como o superóxido agredem tanto o DNA, lipídios e proteínas. Para se adaptar a estas agressões, as células produzem substâncias antioxidantes e enzimas, como a superóxido dismutase, para neutralizar as ERO's. Existem condições intrínsecas e extrínsecas do organismo que podem aumentar a concentração das ERO's. E quando os antioxidantes autólogos não são suficientes para debelar as altas concentrações, o estresse oxidativo é gerado (GREBE; THOMPOSON; GANGESTAD, 2021).

O estresse oxidativo é o responsável pela maioria das condições patológicas, sejam condições agudas ou crônicas. O acúmulo de ERO's pode desencadear desde doenças como as cardiovasculares, insuficiência renal aguda e crônica, diabetes, doenças neurodegenerativas, doenças biliares, câncer, como também, os processos de envelhecimento (ZAKERI et al, 2021). Em relação ao processo de envelhecimento, as principais desordens relacionadas a idade estão relacionadas as ERO's. Com o passar do tempo, a velocidade do corpo em reverter as ações relacionadas ao estresse oxidativo são diminuídas e, como consequência, os sinais de enfraquecimento e morte tecidual se tornam mais evidentes (MEHDI; SOLANKI; SINGH, 2021).

**Figura 04** - Processo intracelular para formação de ERO's.



(Fonte: ROBBINS et al; 2018)

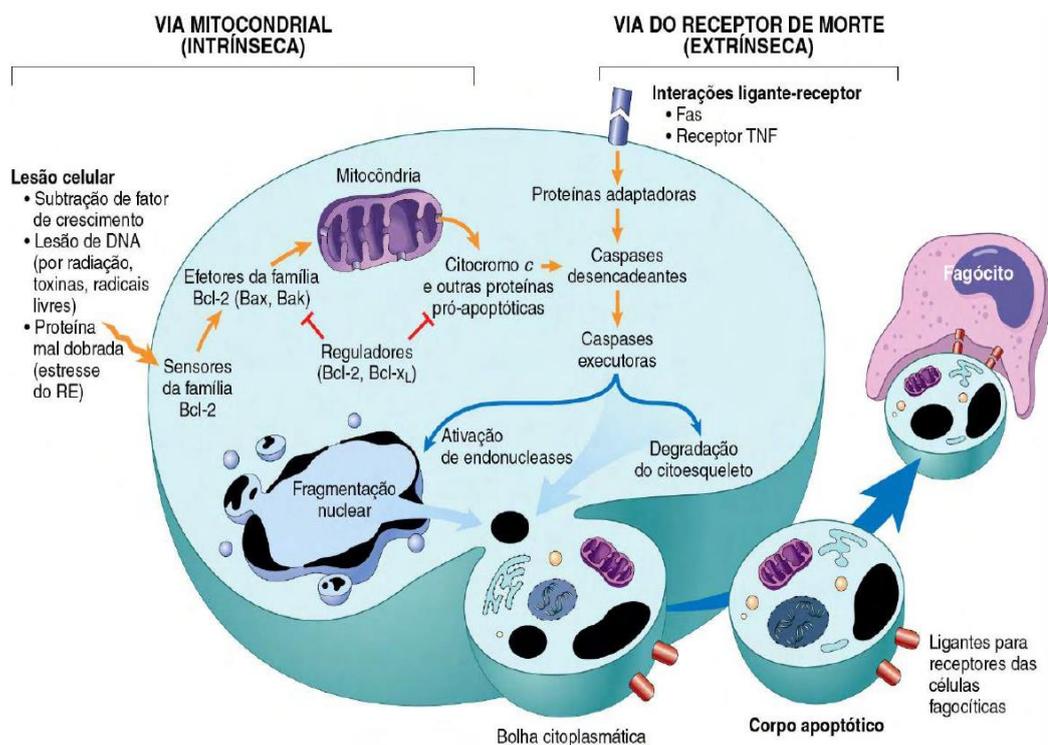
### 2.1.3 Mecanismo De Apoptose

O desenvolvimento biológico e a manutenção da população celular de um tecido são regulados por um processo de morte programada denominado apoptose, responsável pela eliminação de células senescentes ou indesejáveis. Este fenômeno foi primeiramente descrito por Kerr et al. (1972). Ele é

essencial na proliferação e na diferenciação, bem como na sobrevivência de células em processos de organogênese, hematopoiese, reposição tecidual, atrofia de órgãos, resposta inflamatória e eliminação de células após dano por agentes genotóxicos (FERREIRA et al, 2010).

A morte celular apoptótica (Figura 05) é um mecanismo geneticamente programado que permite que a célula cometa suicídio. A apoptose é criticamente importante para a sobrevivência de organismos multicelulares, livrando de células danificadas ou infectadas que podem interferir com a fisiologia habitual. As vias extrínsecas e intrínsecas representam os dois principais processos apoptóticos existentes. A via extrínseca é mediada por um subgrupo de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), superfamília que inclui TNFR, Fas/CD95 e TRAIL. Ativação desses chamados receptores de morte levam ao recrutamento e ativação de caspases iniciadoras, como caspases 8 e 10 (MEHDI; SOLANKI; SINGH, 2021).

**Figura 05 - Vias Extrínseca e Intrínseca da Apoptose Celular**



(Fonte: ROBBINS et al; 2018)

Por outro lado, este processo pode ser inibido pela ativação de moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2, FLIP) que bloqueiam o surgimento e a evolução destas alterações celulares. Assim, a homeostase (equilíbrio estrutural e funcional essencial para sobrevivência de uma população celular) depende do balanço entre a ativação de moléculas pró e anti-apoptóticas. Quando desregulada, a apoptose pode contribuir para o aparecimento de várias doenças neoplásicas, autoimunes, neurodegenerativas e inflamatórias (CHOI et al, 2002).

Em relação as doenças inflamatórias periodontais, quando a lesão já está em fase crônica, as citocinas pró-inflamatórias iniciam a desregulação do processo de defesa e a cascata apoptótica é acionada. Em gengivites crônicas o processo é semelhante (KUMAR et al, 2018).

## 2.2 Gengivite

A gengivite é uma inflamação autolimitante localizada nos tecidos gengivais (gengiva marginal livre, gengiva inserida e gengiva papilar), a qual não acomete o periodonto de sustentação. A origem da gengivite pode estar associada a vários fatores. Dentre os principais fatores que determinam o surgimento da doença está o acúmulo de biofilme dental. Além deste fator, agentes modificadores e predisponentes podem facilitar o surgimento da inflamação. A exemplo dos agentes modificadores estão a má adaptação de materiais restauradores, aparelhos ortodônticos, e a própria má oclusão dentária. Já os fatores predisponentes podemos citar as comorbidades como a diabetes, doenças neurodegenerativas e inflamatórias, além dos hábitos deletérios como a má higiene, o tabagismo e o etilismo (CIRKEL et al, 2021).

**Figura 06** - Representação da Gengivite



(Fonte: <https://www.sbodontologiaespecializada.com.br/tratamentos-2/gengivite-periodontite/>)

De acordo com a nova classificação das doenças periodontais, as gengivites podem ser divididas em dois grupos: As doenças gengivais induzidas por biofilme e as doenças gengivais não induzidas por biofilme. A gengivite induzida por biofilme dental ainda foi subclassificada em três condições que são: *A. Associada somente ao biofilme dental*, *B. Mediada por fatores de risco sistêmicos ou locais*, e *C. Associada a medicamento para aumento de tecido gengival* (STEFFENS & MARCANTÔNIO, 2018).

As gengivites não induzidas por biofilme dental estão relacionadas, por exemplo, a desordens genéticas e de desenvolvimento; infecções bacterianas, fúngicas e virais; condições

inflamatórias e imunes; processos inflamatórios reacionais; doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas e, por fim, a condições relacionadas à mudança de pigmentação (BABAY; ALSHEHRI; ROWIS, 2019).

### 2.2.1 Epidemiologia Da Gengivite

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que, a prevalência da Doença Periodontal (D.P), inclusive a gengivite, aumenta diretamente com a idade. A incidência da D.P é de cerca de 15% aos 10 anos de idade, 38% aos 20 anos, 46% aos 35 anos e 54% aos 50 anos. Como um todo, os homens apresentam maior prevalência e gravidade da D.P do que as mulheres. Com relação a gengivite, que é identificada clinicamente por sangramento à sondagem e aumento de exsudatos gengivais, é uma das doenças mais comuns, e afeta 20% -50% da população dentada, com seus sinais clínicos se desenvolvendo desde os cinco anos de idade (PIZZORNO; MURRAY, 2020).

Estudos realizados por Nazir *et al.*, (2020) têm mostrado que a desigualdade periodontal existe em diferentes populações ao redor do mundo, sendo verificado que a D.P é mais comum entre os idosos. Os adolescentes em alguns países sangram com mais frequência durante a exploração do que os adultos e idosos. As bolsas periodontais ( $\pm 4 - 5$  mm e  $6 +$  mm) são mais desproporcionais e estão amplamente distribuídas na população mais velha. Os países de baixa e média rendas têm uma incidência calculada mais alta do que os países de alto poder aquisitivo. Em países de alta renda, a prevalência de desordens inflamatórias, bolsas periodontais e perda de estruturas de suporte é maior.

De acordo com os dados gerados pelo levantamento epidemiológico do perfil de Saúde Bucal Brasileiro (SBBrasil - 2010) e analisados por Vettore, Marques e Peres (2013) foi verificado que a prevalência nacional de D.P leve/moderada (classificada quando o IPIP –Índice de Perda de Inserção Periodontal for maior que 0 e o IPC –Índice Periodontal Comunitário maior que 2) foi de 15,3%, sendo mais verificada em Macapá (34,9%) e exibindo menor prevalência em Maceió (5,7%). Para D.P grave, quando seus achados clínicos mostram que o resultado do PIP é maior do que 1 e CPI é maior que 2, Manaus foi a mais prevalente (15,5%) e Belém com a menor prevalência (0,9%).

Os motivos das diferenças encontradas nos estudos epidemiológicos relacionados às D.P podem ser atribuídos diretamente à expansão do território brasileiro, sua diversidade socioeconômica e regional, bem como ao meio ambiente e aos comportamentos que

influenciam no aparecimento desse fenômeno patológico em algumas áreas, principalmente em áreas populacionais vulneráveis (DA SILVA et al., 2020).

### 2.2.2 Patogênese Da Gengivite

A cavidade oral do corpo humano é composta de tecidos duros e moles, o que favorece na formação de biofilmes polimicrobianos. As espécies microbianas interagem entre si podendo aumentar sua resistência e chances de sobrevivência. Neste sentido, quando há desequilíbrios entre as populações bacterianas residentes na cavidade oral, a probabilidade de espécies patogênicas se desenvolverem e, posteriormente, gerar patologias relacionadas ao biofilme é muito maior (ARIAS et al, 2016).

As bactérias do biofilme têm um método de comunicação denominado *quórum sensing*, o qual o acúmulo de um metabólito desencadeia mudanças na expressão gênica em toda a comunidade. Esta serve para produzir respostas coordenadas, por exemplo, na motilidade ou virulência. No biofilme, existem vários microambientes, e tanto o pH quanto as concentrações de várias substâncias químicas e metabólitos são diferentes. Estas mudanças permitem que espécies com necessidades metabólicas diversas se desenvolvam em microambientes do ecossistema, promovendo assim, uma maior diversidade entre a população bacteriana. Esta diversidade garante que as infecções mistas causadas pelo biofilme dentário sejam mais difíceis de controlar (HARVEY, 2017).

A patogênese da gengivite é caracterizada por relações complexas entre os microrganismos do biofilme dental e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, que pode ser influenciada por fatores genéticos, condições ambientais e fatores predisponentes como o tabagismo e doenças sistêmicas (FERREIRA et al, 2017). De acordo com Kornman (2008), as observações histopatológicas de tecidos humanos doentes foram usadas para explorar as causas das periodontopatias e descrever seus modelos de patogênese. Algumas evidências experimentais mostraram que a permanência do biofilme é o principal fator para o aparecimento da gengivite e da periodontite. Ao mesmo tempo, a presença de bactérias específicas (microrganismos periodonto patogênicos do complexo azul – *Gênero Actinomyces* – e vermelho – *Porphyromonas gingivalis*, *Tanarella forsythia*, *Treponema denticola*-) potencializam a infecção e agravam a doença.

A condição de patogenicidade dos microrganismos bucais está relacionada a um processo inflamatório que é uma resposta do corpo humano para uma urgência ou infecção

(MACHADO; FREITAS; SALES-PERES, 2016). A inflamação envolve uma série de eventos contínuos dentro do tecido gengival inflamado, gerando uma série de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) -1 $\beta$ , prostaglandina E 2 (PGE 2), e a produção de interferon gama (IFN-Y); eles entram na corrente sanguínea e causam a carga geral de inflamação. Portanto, a exposição sistêmica a patógenos periodontais, suas toxinas e mediadores inflamatórios derivados / induzidos pela gengivite podem determinar consequências patológicas em diferentes órgãos ou sistemas (PIZZO *et al.*, 2010).

**Figura 07** - Representação Esquemática dos Complexos Microbianos que atuam na patogênese das D.P.



(Fonte: SOCRANSKY, S.S et al; 1998)

O acúmulo do biofilme dentário permite o crescimento de bactérias anaeróbias, o que acaba levando à ativação e recrutamento de neutrófilos. Isto resulta na regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, e também leva à liberação de enzimas neutrofílicas e ERO's. A exposição prolongada do tecido conjuntivo a essas lesões pode levar à degradação ligamentar e perda do suporte ósseo alveolar do tecido periodontal de suporte caracterizando não mais uma gengivite, mas sim, uma periodontite. Este avanço gradativo da doença, se não tratado, acarretará nas perdas dentárias (ANAND,2017).

### *2.2.3 Principais Estratégias Para O Tratamento Da Gengivite*

Como fora dito, a gengivite é caracterizada clinicamente como uma inflamação do tecido periodontal de proteção. Este processo inflamatório causa no tecido eritemas, edemas, sangramento à sondagem além de uma ulceração do epitélio no sulco gengival com infiltração de células inflamórias. A principal estratégia de tratamento e cuidado deste periodonto é inibir o processo inflamatório e destruir os agentes agressores que desencaderam tal processo (GARLET et al, 2004).

Várias formas de tratar a gengivite e a periodontite são conhecidas. Desde tratamentos locais, como a remoção mecânica do biofilme dental e o alisamento radicular, passando pelo uso de colutórios, cremes dentais terapêuticos, até a utilização de medicamentos sistêmicos para controle da infecção e diminuição da inflamação. Mesmo assim, se o paciente não for colaborativo, os avanços ocasionados por estes modelos tradicionais são minimizados (MADERAL et al, 2017 ; CARRANZA et al, 2018).

As terapias farmacológicas antioxidantes e o uso dos produtos naturais fazem parte destas estratégias terapêuticas e vieram na tentativa de potencializar os tratamentos existentes. Ampliá-las em clínica pode favorecer um tratamento específico, com maior sensibilidade e menores custos ao paciente. Estas estratégias visam eliminar os efeitos nocivos das ERO's e com isto, cessar os efeitos danosos da inflamação (DOS SANTOS, 2018).

### 2.3 Estratégia Antioxidante Dos Produtos Naturais

A quimioprevenção é definida como o uso de substâncias naturais, sintéticas ou biológicas para reverter, suprimir ou prevenir as fases iniciais de qualquer reação patológica. Os compostos que inibem a iniciação do processo inflamatório são tradicionalmente conhecidos como "agentes bloqueadores". Estes podem agir evitando a interação entre produtos químicos pró-inflamatórios ou dos ERO's com o DNA, reduzindo assim o nível de dano e mutações resultantes que contribuem não apenas para o aparecimento de lesões, mas também para a instabilidade genômica e destruição de tecidos (MAYACANO; ARANGO-VARELA; SANTANA-GONZALES, 2021).

Para evitar que as ERO's prejudiquem o funcionamento normal das células e, conseqüentemente, do nosso corpo, existem alguns agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres, os chamados antioxidantes. Os antioxidantes podem ser considerados como "aquelas substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, em comparação com as de um substrato oxidável, irão atrasar significativamente ou inibir a oxidação de esse substrato". Eles funcionam eliminando os radicais livres à medida que se formam e, assim, evitando estresse oxidativo (ANAND, 2017).

Antioxidantes sintéticos têm demonstrado serem prejudiciais à saúde humana, aumentando reações de hipersensibilidade e depósito a longo prazo de substâncias cancerígenas. Isto levou a necessidade de pesquisas na busca de antioxidantes naturais (RAMOS et al., 2020). Nos últimos anos, cada vez mais tem sido evidenciado que o consumo regular de alimentos ricos em agentes antioxidantes pode diminuir o risco de desenvolver doenças crônicas degenerativas causadas e/ou agravadas por agentes oxidantes. Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de frutas e verduras é inversamente associado com doenças cardiovasculares e câncer (AVOLA et al, 2018).

Os agentes antioxidantes podem ser divididos em enzimáticos e não-enzimáticos. Os não-enzimáticos ainda podem ser subdivididos em duas classes: os associados a membrana lipossolúvel ( $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno), e redutores solúveis em água (glutationa, ascorbato e fenólicos). Entre os agentes enzimáticos estão a catalase e a glutatona peroxidase (GPx), que atuam no controle de peróxidos. Esta segunda enzima é formada por um tripeptídio, a glutatona (ácido glutâmico, cisteína (parte ativa) e glicina) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018)

A parte ativa se deve à capacidade redutora do grupamento -SH. A presença de riboflavina (B2) aumenta a atividade da GPx. Estudo dos eritrócitos mostrou que tanto a catalase quanto a glutatona peroxidase são importantes na proteção de efeitos mediados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Segundo Palma e Colaboradores (2020), outra enzima antioxidante é a superóxido dismutase (SOD), a qual corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição, existindo duas formas em sistemas eucariontes. Uma citoplasmática que necessita de cobre e zinco para agir (SOD-cobre-zinco) e uma mitocondrial que necessita de manganês (SODmanganês). Já a catalase, a qual atua no peróxido de hidrogênio, age apenas na presença de ferro. Uma característica comum a várias enzimas antioxidantes é conter traço de minerais, por isso são chamadas de metaloenzimas.

Entre os agentes não-enzimáticos estão as vitaminas A (retinol), E (tocoferóis) e C (ácido ascórbico), carotenóides e polifenóis como flavonóides e taninos, podendo estes serem associados a atividades antidiabéticas, antineoplásicas e anti-inflamatórias e cardioprotetoras (BARTEKOVÁ et al, 2021).

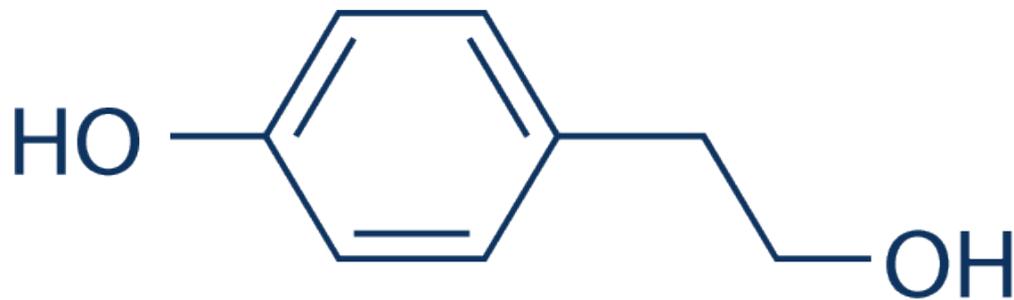
Metabólitos secundários, como compostos fenólicos, encontrados nas plantas também estão diretamente relacionados a essas ações antioxidantes. Os compostos fenólicos estão envolvidos tanto no sequestro de radicais livres como também, quelando metais. Isto dá a estes compostos, por exemplo, uma ação efetiva na quimioproteção celular com agentes agressores (SIMÕES,2016).

Segundo Sallucci e colaboradores (2015), os compostos fenólicos, maior grupo de antioxidantes naturais, têm atraído muita atenção por suas conhecidas e abrangentes atividades biológicas, bem como por seus efeitos na saúde. Em particular, independentemente de sua atividade antioxidante, eles desempenham um papel fundamental no controle de vários processos associados à inflamação, bem como na melhoria do sistema de defesa antioxidante. Um excelente exemplo deste grupo de compostos fenólicos encontramos o tirosol.

## 2.4 Tirosol

O Tirosol (2- (4-hidroxifenil) etanol) é um conhecido composto fenólico encontrado principalmente no azeite extravirgem e nos vinhos tinto e branco (LU *et al.*, 2013). Do ponto de vista estrutural, o tirosol compartilha um grupo funcional fenólico na posição “para” do anel aromático com uma cadeia de hidroxietil aumentando sua funcionalidade. Isoladamente, o tirosol é um sólido incolor à temperatura ambiente, com ponto de fusão entre 91-92° C, e ebulição a 158 °C. Possui maior solubilidade em solventes orgânicos e ligeiramente solúvel em água (RAMOS *et al.*, 2020). Além disso, esses compostos apresentam forte atividade antioxidante em experimentos *in vitro*, e capacidade de inibir os processos de pró oxidação em partículas de Lipoproteínas de Baixa Densidade (LDL) humana (CAÑUELO *et al.*, 2012).

**Figura 08** - Representação Molecular do Tirosol



(Fonte: <https://www.selleckchem.com/products/tyrosol.html>)

O composto Tirosol tem um efeito protetor contra o dano oxidativo em modelos celulares e melhora os sistemas de defesa antioxidante na célula. Em particular, o Tirosol mostra atividade antígeno-tóxica contra danos induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e é caracterizado como um eliminador de radical hidroxila eficaz (SALLUCCI et al, 2015).

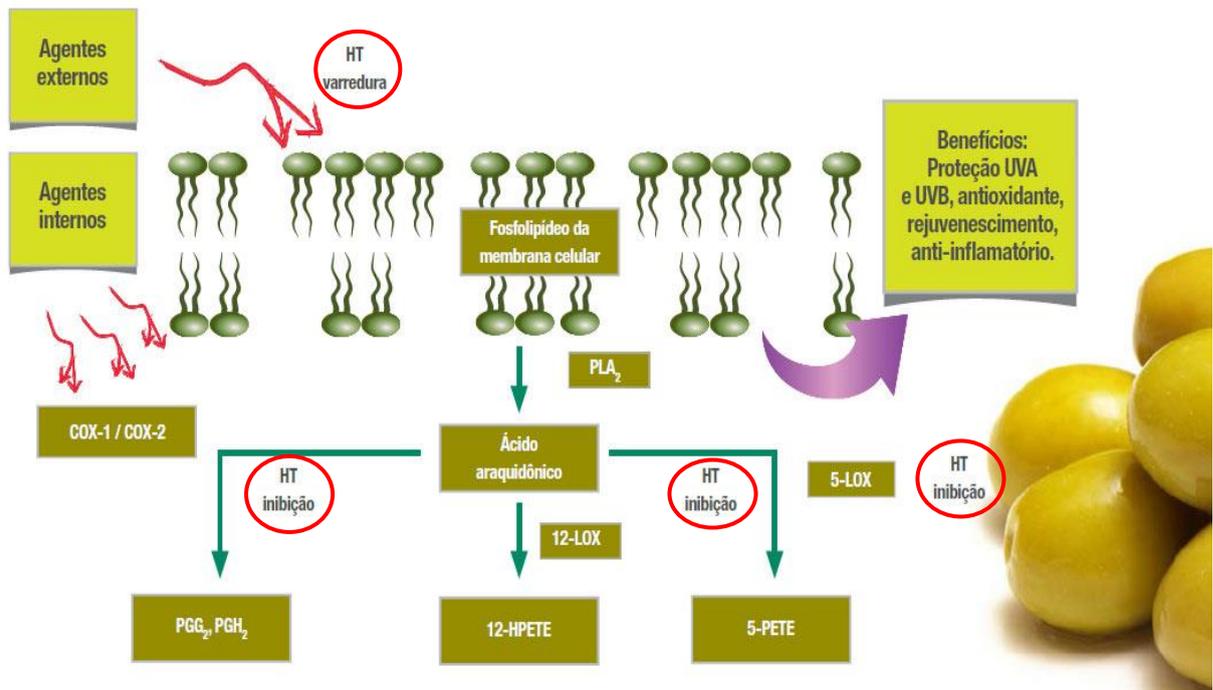
O tirosol exibe bioatividade potente em sistemas vivos devido à sua alta biodisponibilidade. Apresenta efeito antioxidante por eliminar o peroxinitrito e ânion superóxido. O Tirosol melhora significativamente a atividade da glutatona-s-transferase, bem como a concentração de vitamina C e vitamina E em tecidos animais (CHANDROMOHAN; PARI, 2016).

Quanto ao processo inflamatório, foi verificado que o tirosol inibe o lipopolissacarídeo induzido por citocinas. Muitos estudos têm levantado a possibilidade de que a ação cardioprotetora do azeite de oliva está ligada a constituição dos ácidos graxos e compostos fenólicos, em especial o tirosol (RAMOS et al, 2020).

Foi relatado que o tirosol induz a ativação da proteína quinase B (Akt) e aumenta a expressão de agentes reguladores da nocicepção e da inflamação em processos degenerativos. Esta ação do tirosol nesta via farmacológica é inibitória e, por isto, a percepção dolorosa é diminuída (WEI QUI et al, 2021).

Ainda foi visto que o Tirosol possui *quorum sensing* em muitos microrganismos, desta forma, novas estratégias têm sido estudadas a fim de controlar biofilmes patogênicos. Este fenômeno é bem conhecido para as bactérias podendo ser usada como uma terapia alternativa como prevenção do biofilme e controle de doenças bucais infecciosas (WEBER; SCHLZ; RUHNKE, 2010).

**Figura 09** - Esquema representativo dos benefícios do Tirozol e sua Possível Ação na Cascata Inflamatória



(Fonte: Adaptado de <http://www.viapharma.com.br/1876-uniformizacao-firmeza-e-protcao-para-a-pel>)

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito protetor do composto tirozol em modelo experimental da gengivite. Para isto, foram feitas avaliações da atividade antioxidante “in vitro” do tirozol; foi verificada a toxicidade aguda e o controle de peso dos animais tratados com o composto; foi analisado o efeito protetor do tirozol sob parâmetros histológicos; foi observado o grau de atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) sob o tratamento do tirozol; foi analisada a atividade antimicrobiana do tirozol frente ao patógeno *Streptococcus mutans* (UFPEDA766

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Aspectos Éticos

Este trabalho foi submetido ao devido Conselho de Ética Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre responsabilidade no uso de animais (CONCEA, 2015), sob número de registro 0015/2019.

#### 3.2 Obtenção Do Composto Isolado

O Tirosool foi extraído de azeite de oliva (*Olea Europaea L.*) a partir de um extrato seco liofilizado e isolado por métodos de cromatografia de alta eficiência (HPLC). Este produto acabado foi fornecido e obtido pela Sigma Aldrich ®.

#### 3.3 Avaliação Da Atividade Antioxidante “In Vitro” Do Tirosool

A atividade antioxidante da espécie vegetal foi determinada através do ensaio de captura de radicais DPPH<sup>·</sup>, desenvolvido por Blois (1958) e adaptado por Brand- Williams (1995). Esse ensaio tem por base a redução do radical [1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH<sup>·</sup>)]. Este radical ao fixar-se em um H<sup>·</sup> (removido do antioxidante em estudo), levou à uma diminuição da absorvância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante necessária para reduzir o radical DPPH<sup>·</sup>.

Para avaliação da atividade antioxidante do composto, alíquotas de 1 mL de solução etanólica de DPPH<sup>·</sup> ( $3 \times 10^{-2} \text{M}$ ) foram adicionadas a 2,5 mL de solução contendo diferentes concentrações de tirosool. Para realização da curva padrão foram utilizadas concentrações crescentes de ácido Tiobarbitúrico (BHT). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 515nm, após 30 minutos do início da reação. As determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem o antioxidante). A queda na leitura da densidade ótica das amostras e do BHT foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ proteção} = (\text{Abscontrole} - \text{Absamostra}) / \text{Abscontrole}$$

Foi calculado o valor da IC<sub>50</sub> (concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical).

### 3.4 Avaliação Da Toxicidade Aguda Do Tirosol

Para a avaliação da toxicidade aguda o composto tirosol foi testado de acordo com o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2016). Este protocolo seguiu a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os 10 camundongos Swiss (n=10/grupo) machos, em jejum de 12 horas com acesso a água *ad libitum*, foram tratados por via oral (v.o) com uma dose de 2000mg/kg de peso corporal da solução com o composto ou igual volume do veículo. Após os tratamentos, os animais foram observados durante 30, 60, 120, 180 e 240 minutos em campo aberto, e após este período, ficaram sob a observação em suas gaiolas durante 14 dias para verificação de possíveis sinais e sintomas de toxicidade e/ou envenenamento, como perda de peso, letargia, comportamentos habituais (grunhido, pilo ereção, caminhadas explorativas) respectivamente.

### 3.5 Avaliação Da Mutagênicidade E Genotoxicidade Do Tirosol

Os 10 camundongos foram distribuídos em três grupos: um grupo recebeu a solução com tirosol 2000mg/kg, outro grupo recebeu apenas água destilada e serviu de controle negativo; O último grupo foi o controle positivo que recebeu ciclofosfamida, por via intraperitoneal, um agente mutagênico bem estabelecido na literatura científica. Todos os grupos supracitados receberam seus respectivos tratamentos por gavagem. Após 48 horas de tratamento, os camundongos foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal, e 1mL de sangue periférico foi coletado de cada animal por punção retro-orbital. Logo depois, os animais sofreram eutanásia com uma injeção letal contendo uma superdosagem de quetamina e xilasina.

#### 3.5.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa, também conhecido por eletroforese de célula única, vem sendo proposto para avaliar genotoxicidade em diversos tecidos e células, assim como reparo no DNA (UMBUZEIRO & ROUBICEK et al., 2006). Foi necessário que todo procedimento após a coleta do material fosse feito em uma sala com luz vermelha (sem a presença da luz branca), pois o experimento é fotossensível. O sangue coletado foi homogeneizado com agarose de baixo ponto de fusão (LM) e depositado nas lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão; estas lâminas foram cobertas com lamínulas e foram para o refrigerador. Depois da refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas depositadas em cubas (sempre protegidas da luz) com solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM TRIS, 1% Triton

X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após o tempo necessário para a lise (48 horas a uma semana), seguiram-se o processo de eletroforese, em que as células lisadas foram submetidas a uma corrente de  $\pm 300\text{mA}$ , com diferença de potencial de 32V, por 20 minutos, em uma cuba contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200 mM EDTA, pH 13). Logo depois, as lâminas foram neutralizadas com tampão (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) e coradas com 30 $\mu\text{L}$  de brometo de etídio (0, 0002%, p/v) por lâmina. A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência com filtro Alexa flúor 546.

Foram analisados 100 nucleoides por animal com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleoide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo). Desta forma, os valores obtidos para cada indivíduo puderam variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor damos o nome de índice de dano (ID) por animal. A frequência de danos (FD) também foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 a classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS, 2008).

### 3.5.2 *Teste Do Micronúcleo*

O teste de micronúcleo que foi inicialmente desenvolvido por Schimid (1975), tem a capacidade de detectar efeitos mutagênicos provocados por vários agentes químicos e físicos. Para esse teste, foi utilizada a técnica descrita por Hayashi e colaboradores (1990). Foram colocados 5 $\mu\text{L}$  de sangue periférico sobre lâminas previamente preparadas com laranja de acridina, cobrindo-se com uma lamínula para espalhar uniformemente o material. Foi estabelecida a proporção de eritrócitos policromáticos (PEC) em relação ao total de eritrócitos da seguinte maneira:  $\text{PEC} / (\text{PEC} + \text{NEC})$ , onde NEC significa eritrócitos normocromáticos. Uma comparação entre a proporção de PEC de cada animal tratado foi feita com a do grupo controle. Se a proporção de PEC em um dado animal seja menor do que 20% em relação ao PEC do grupo controle, o animal será descartado do estudo. 2000 PEC foram contados por animal para se quantificar a presença de PEC micronucleados (PECMn) (OCDE, 2009). Os eritrócitos policromáticos foram analisados em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse 80i).

### 3.6 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram formados por 25 ratos subdivididos em pequenos grupos de 5 animais seguindo o cálculo de amostragem estabelecido por Ilyas *et al.*, (2017). O cálculo baseia-se no número mínimo necessário de animais para realização do experimento. Ele é formulado a partir do número total de animais menos o número total de grupos ( $(E=(5 \times 5) - 5 = 20$ , estando dentro dos padrões). As doses de Tirosol foram estabelecidas na concentração de 3, 15 e 30 mg, pois segundo Costa e colaboradores (2014) em concentrações maiores o Tirosol tornou-se tóxico para os animais, não produzindo o efeito desejado. Houve um grupo sadio, um doente e demais grupos doentes que foram tratados com concentrações do tirosol.

- Grupo 1: Os animais foram tratados com NaCl 0,9% I.P e com água destilada (V.O) durante 8 dias;
- Grupo 2 – Os animais foram condicionados com fio de sutura em algodão dentro do sulco gengival dos incisivos centrais inferiores para a indução da gengivite e tratados com NaCl 0,9% I.P e com água destilada V.O por 8 dias;
- Grupo 3 – Os animais com a indução da gengivite foram tratados simultaneamente pelo método de gavagem com o tirosol na dose de 3mg/kg de peso por V.O durante 8 dias;
- Grupo 4 – Os animais com a indução da gengivite foram tratados simultaneamente pelo método de gavagem com o tirosol na dose de 15mg/kg de peso por V.O durante 8 dias;
- Grupo 5 – Os animais com a indução da gengivite foram tratados simultaneamente pelo método de gavagem com o tirosol na dose de 30mg/kg de peso por V.O durante 8 dias;

Neste trabalho foi utilizado um modelo animal de indução da gengivite em ratos adaptado de AKASHI (2016). Após a anestesia, foram posicionados para a aplicação do protocolo de colocação da ligadura utilizando um fio de seda preta 3.0 (Ethicon), o qual foi colocado na região cervical dos incisivos centrais inferiores, tomando-se o cuidado de penetrar o fio no sulco gengival. O fio foi colocado na região subgengival e o nó posicionado na região mesial e retido com o auxílio de um sistema adesivo a base de etil-2-cianoacrilato (GYÖRFI *et al.*, 1994; LOHINAI *et al.*, 1998; RAMOS *et al.*, 2020).

#### 3.6.1 *Processamento Histológico*

Decorridos 1, 7 e 14 dias após o ato cirúrgico, dois animais de cada grupo (teste e controle) foram escolhidos aleatoriamente e eutanasiados pela superdosagem em via intraperitoneal de solução anestésica (Ketamina e Xilazina). Após a aplicação imediata desta solução anestésica, um fragmento da gengiva marginal e inserida em toda sua extensão e profundidade foi retirada através de um bisturi número 15. O material foi processado e as imagens histológicas das lâminas realizadas foram capturadas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Nikon E-100), tendo sido obtidos 20 campos por lâmina com aumento final de 40X. Por fim, após a eutanásia, os animais foram acondicionados em um freezer por no máximo 48h e foram recolhidos por uma empresa responsável pela incineração.

### **3.7 Dissecções Da Área Periodontal E Homogeneização Das Amostras Teciduais Do Periodonto Para Dosagens Bioquímicas**

Após o experimento, os animais foram anestesiados, eutanasiados, e as amostras foram removidas. O tecido periodontal (gengiva marginal livre e inserida das regiões vestibular e lingual respectivamente) foi dissecado rapidamente sobre placa de gelo, pesado e homogeneizado (10% p/v) em PBS 1% com adição de BHT 0,004%. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, e os sobrenadantes foram congelados em freezer à -80 °C. Posteriormente foi realizada a avaliação das atividades enzimáticas.

#### *3.7.1 Determinação Da Atividade Da Catalase*

A atividade da Catalase nas regiões do periodonto foi analisada segundo o método descrito por Sinha (1972) usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato. A mistura reacional (1,5 mL) consistiu de 1.0 ml de tampão fosfato (0,01 M, pH7.0), 0.4 ml de água destilada e 0.1 ml do sobrenadante. A reação foi iniciada pela adição de 0.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incubada a 37°C por 1 min e finalizada pela adição de 2.0 ml de dicromato/ácido acético reagente (Dicromato de potássio (5%) e ácido acético na relação de 1:3) e analisada espectrofotometricamente a 480 nm.

#### *3.7.2 Determinação Da Atividade Da Superóxido Dismutase*

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método Misra e Fridovich (1972). Cem micro litros do sobrenadante foram adicionados a 880 µL (0.05 M, pH 10,2; 0,1 mM EDTA) de tampão carbonato. Foram adicionados 20 µL de epinefrina 30 mM (em 0,05% ácido acético) à mistura e analisada espectrofotometricamente a

480 nm. A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que inibe a oxidação da epinefrina em 50%, o qual é igual a 1 unidade.

### 3.8 Análise Da Atividade Antimicrobiana Do Tirosol

Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI e CMB), inicialmente foram preparadas suspensões das bactérias em solução salina a 0,9%, com densidade de 0,5 de acordo com a escala de McFarland, as quais foram aferidas com o auxílio de espectrofotômetro no comprimento de 625 nm para bactérias, para atingir a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC.

Foi utilizado o micro-organismo *Streptococcus mutans* UFPEDA 766 pertencente a Coleção de Micro-organismos UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Para a confecção da placa foram distribuídos 180  $\mu$ L de meio de cultura líquido (caldo BHI) em cada poço da primeira coluna e 100  $\mu$ L nos demais poços até a nona coluna. Em seguida, foram adicionados 20  $\mu$ L da amostra nos poços da coluna 1 a partir da qual foi realizada a microdiluição sucessivamente até a coluna 9, obtendo-se concentrações decrescentes (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9  $\mu$ g/mL).

Após diluição, foi adicionado a cada poço 10  $\mu$ L do inóculo microbiano padronizado ( $1,5 \times 10^5$ ). As colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas como controle. Na coluna 10 foi realizado o controle positivo do inóculo, contendo o meio de cultura adicionado do inóculo. Na coluna 11 foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultivo e na coluna 12 foi realizado o controle do antibiótico, sendo utilizada a gentamicina para as bactérias.

As microplacas foram depositadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Finalizado o tempo de cultivo, as microplacas foram observadas em lupa, e uma alíquota do conteúdo dos poços que não apresentaram turvação foi semeada em placa de Petri contendo meio BHI sólido, para determinação da concentração mínima bactericida (CMB).

As placas de Petri semeadas foram incubadas em estufa a 37° C por 24 h. Em seguida, as microplacas foram reveladas com a adição de 20  $\mu$ L de resazurina (corante indicador de oxido-redução) a 0,01% e incubadas por 1-4 horas para observar a mudança de coloração nos poços. Após o tempo de revelação, a manutenção da cor azul foi interpretada como inibição do crescimento microbiano, enquanto o desenvolvimento da cor rosa, indicou a ocorrência de crescimento. Foi estabelecido que a CMI verifica a menor concentração da substância teste capaz de inibir parcialmente o crescimento do micro-organismo, e a CMB a menor

concentração da substância com atividade bactericida de até 99,9% em determinado intervalo de tempo (CLSI, 2017). Os valores da CMI e CMB foram obtidos pela observação conjunta dos resultados obtidos da microplaca e da placa de Petri. Cada ensaio foi realizado em duplicata

### **3.9 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prisma 5.1. A diferença entre os grupos foi verificada através do teste “t” de Student e da análise de variância (ANOVA), seguida, quando necessário, pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **4 ARTIGO CIENTÍFICO – Estudo Do Efeito Protetor Do Tirosol (Composto Isolado Da *Olea Europaea L.*) Em Modelo Experimental Da Gengivite.**

### **ESTUDO DO EFEITO PROTETOR DO TIROSOL (COMPOSTO ISOLADO DA *OLEA EUROPAEA L.*) EM MODELO EXPERIMENTAL DA GENGIVITE**

#### **RESUMO**

O tirosol, também conhecido como álcool p-hidroxifenético, é um composto fenólico que possui muitas propriedades para a saúde, principalmente pelo seu potencial de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO's). A gengivite é uma inflamação autolimitante localizada nos tecidos gengivais que não acomete o periodonto de sustentação. Diante do que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi demonstrar o efeito protetor do tirosol em modelo experimental da gengivite. Para avaliação deste efeito protetor foram analisados desde aspectos toxicológicos até análise anti-inflamatória, antimicrobiana e enzimática. O Tirosol foi extraído do azeite de oliva (*Olea Europaea L.*) a partir de um extrato seco liofilizado e ultra processado. A atividade antioxidante da espécie vegetal foi determinada através do ensaio de captura de radicais DPPH<sup>•</sup>. Para a avaliação da toxicidade aguda o composto tirosol foi testado de acordo com o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2016). Foram utilizados 20 camundongos Swiss. Nos testes histológicos e enzimáticos foram utilizados 25 ratos winstar machos. Estes foram divididos em animais saudáveis, animais com a gengivite e animais com gengivite tratados com tirosol nas concentrações de 3, 15 e 30mg/kg. Após o tratamento dos animais, as amostras coletadas foram processadas e analisadas. O tirosol foi avaliado segundo a atividade antimicrobiana através da análise de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Biocida (CMB) utilizando cepa de *Streptococcus mutans* UFPEDA 766. O tirosol apresentou-se seguro nos testes de toxicidade. Histologicamente os animais tratados com a concentração de 30mg/kg não apresentaram elevada concentração de infiltrado inflamatório e seu reparo tecidual se assemelhou ao grupo controle. Nos animais tratados com o tirosol houve aumento das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em relação ao grupo com gengivite. Não houve resposta antimicrobiana do tirosol frente a cepa analisada. Conclui-se que o tirosol possui segurança toxicológica podendo ser promissor antioxidante e anti-inflamatório em terapias gengivais.

**PALAVRAS-CHAVE:** tirosol; gengivite; produtos naturais; antioxidante; anti-inflamatório;

## ABSTRACT

Tyrosol, also known as p-hydroxyphenethyl alcohol, is a phenolic compound that has many health properties, mainly due to its potential for scavenging reactive oxygen species (ERO's). Gingivitis is a self-limiting inflammation located in the gingival tissues that does not affect the supporting periodontium. Given the above, the objective of this work was to demonstrate the protective effect of tyrosol in an experimental model of gingivitis. To evaluate this protective effect, from toxicological aspects to anti-inflammatory, antimicrobial and enzymatic analysis were analyzed. Tyrosol was extracted from olive oil (*Olea Europaea L.*) from a freeze-dried and ultra-processed dry extract. The antioxidant activity of the plant species was determined through the DPPH<sup>·</sup> radical scavenging assay. For the assessment of acute toxicity the tyrosol compound was tested according to the experimental protocol Guideline 423 (OECD 423; 2016). Twenty Swiss mice were used. In the histological and enzymatic tests, 25 male winstar rats were used. These were divided into healthy animals, animals with gingivitis and animals with gingivitis treated with tyrosol at concentrations of 3, 15 and 30mg/kg. After the treatment of the animals, the collected samples were processed and analyzed. Tyrosol was evaluated according to antimicrobial activity through the analysis of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Biocidal Concentration (CMB) using a strain of *Streptococcus mutans* UFPEDA 766. Tyrosol was shown to be safe in toxicity tests. Histologically, the animals treated with a concentration of 30mg/kg did not show a high concentration of inflammatory infiltrate and their tissue repair was similar to the control group. In animals treated with tyrosol there was an increase in the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in relation to the group with gingivitis. There was no antimicrobial response of tyrosol against the analyzed strain. It is concluded that tyrosol has toxicological safety and may be a promising antioxidant and anti-inflammatory in gingival therapies.

**KEYWORDS:** tyrosol; gingivitis; natural products; antioxidant; anti-inflammatory;

## 1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea L.*) é uma importante árvore encontrada nos países mediterrâneos. Pertencente a família das Oleaceas, ela é uma das árvores frutíferas mais importantes de mundo, seja pelo seu potencial comercial ou por sua participação histórica e cultural na humanidade (MECHRI et al., 2021).

O extrato da azeitona é comercializado como um medicamento natural com diversos benefícios para a saúde. Sabe-se que este extrato possui grande atividade antioxidante e anti-inflamatória. São vários os benefícios que o óleo de oliva trás para a saúde. Desde os efeitos cardioprotetores e quimiopreventivos, até atividades hipotensoras e hipoglicêmicas. Estas últimas são mediadas pelos metabólitos secundários olacina e oleuropeína (ELNAHAS et al., 2021).

Dentre os metabólitos secundários produzidos pela oliveira destacam-se os compostos fenólicos, estruturas químicas que possuem uma ação antioxidante potente no vegetal. Esta ação antioxidante protege a planta contra agressores e a previne contra doenças. Existem vários compostos fenólicos oriundos da oliveira mas, sem dúvidas, o tirosol e o hidroxitirosol são os mais importantes (MOUGIOU et al., 2018).

O tirosol, também conhecido como álcool p-hidroxifenético, é um composto fenólico que possui muitas propriedades positivas para a saúde, principalmente associadas ao seu potencial de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Postula-se sua eficácia na inibição da oxidação do colesterol em lipoproteínas de baixa densidade, na inibição da 5-lipooxigenase leucocitária, exibindo também papel protetor contra os efeitos citostáticos produzidos pelas lipoproteínas oxidadas de baixa densidade nas células da mucosa intestinal Caco-2 (PAULO & SANTOS, 2020).

Já existem vários modelos de estudo no qual empregam o tirosol como alternativa terapêutica. No entanto, no que diz respeito a área odontológica, este composto não é utilizado, ou mesmo associado. Diante das suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, o composto poderia ser utilizado como alternativa terapêutica em casos de gengivite se devidamente estudado (RAMOS et al, 2020).

A gengivite é uma inflamação autolimitante localizada nos tecidos gengivais (gengiva marginal livre, gengiva inserida e gengiva papilar). Esta inflamação não acomete o periodonto de sustentação. A origem da gengivite pode estar associada a vários fatores, e dentre os principais, destaca-se o biofilme dental. A patogênese da gengivite é caracterizada por relações complexas entre os microrganismos do biofilme dental e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, que pode ser influenciado por fatores genéticos, condições ambientais e fatores predisponentes como o tabagismo e doenças sistêmicas (FERREIRA et al, 2017, CIRKEL et al, 2021).

Várias formas de tratar a gengivite e a periodontite são conhecidas. Desde tratamentos locais, como a remoção mecânica do biofilme dental e o alisamento radicular, passando pelo uso de colutórios, cremes dentais terapêuticos até a utilização de medicamentos sistêmicos para controle da infecção e diminuição da inflamação. Mesmo assim, se o paciente não for colaborativo, os avanços ocasionados por estes modelos tradicionais são minimizados (MADERAL et al, 2017 ; CARRANZA et al, 2018).

Visando facilitar o tratamento das gengivites, terapias farmacológicas antioxidantes e o uso dos produtos naturais fazem parte destas estratégias terapêuticas e vieram na tentativa de potencializar os tratamentos existentes. Ampliá-las em clínica pode favorecer em um tratamento específico, com maior sensibilidade e menores custos ao paciente. Estas estratégias visam eliminar os efeitos nocivos das ERO's e com isto, cessar os efeitos danosos da inflamação (DOS SANTOS, 2018).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade do efeito protetor do tirosol em modelo experimental da doença gengivite. Para avaliação deste efeito protetor foram analisados desde aspectos toxicológicos, genotóxicos e mutagênicos até análise anti-inflamatória, antimicrobiana e enzimática.

## **2 MATERIAIS E MÉTODO**

### **2.1 Aspectos Éticos**

Este trabalho foi submetido ao Conselho de Ética Animal (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre responsabilidade no uso de animais (CONCEA, 2015), sob número de registro 0015/2019.

### **2.2 Obtenção Do Composto Isolado**

O Tirosol foi extraído de azeite de oliva (*Olea Europaea L.*) a partir de um extrato seco liofilizado e isolado por métodos de cromatografia de alta eficiência (HPLC). Este produto acabado foi fornecido e obtido pela Sigma Aldrich ®.

### **2.3 Avaliação Da Atividade Antioxidante “In Vitro” Do Tirosol**

A atividade antioxidante da espécie vegetal foi determinada através do ensaio de captura de radicais DPPH', desenvolvido por Blois (1958) e adaptado por Brand- Williams (1995). Esse ensaio tem por base a redução do radical [1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH')]. Este radical

ao fixar-se em um H<sup>·</sup> (removido do antioxidante em estudo), levou à uma diminuição da absorvância, permitindo calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante necessária para reduzir o radical DPPH<sup>·</sup>.

Para avaliação da atividade antioxidante do composto, alíquotas de 1 mL de solução etanólica de DPPH<sup>·</sup> ( $3 \times 10^{-2} \text{M}$ ) foram adicionadas a 2,5 mL de solução contendo diferentes concentrações de tirosol. Para realização da curva padrão foram utilizadas concentrações crescentes de ácido Tiobarbitúrico (BHT). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 515nm, após 30 minutos do início da reação. As determinações foram realizadas em triplicata e acompanhadas de um controle (sem o antioxidante). A queda na leitura da densidade ótica das amostras e do BHT foi correlacionada com o controle, estabelecendo-se a porcentagem de descoloração do radical DPPH<sup>·</sup>, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ proteção} = (\text{Abscontrole} - \text{Absamostra}) / \text{Abscontrole}$$

Foi calculado o valor da IC<sub>50</sub> (concentração da amostra necessária para inibir 50% do radical).

#### 2.4 Avaliação Da Toxicidade Aguda Do Tirosol

Para a avaliação da toxicidade aguda, o composto tirosol foi testado de acordo com o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423; 2016). Este protocolo seguiu a proposta da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os 10 camundongos Swiss (n=10/grupo) machos, em jejum de 12 horas com acesso a água *ad libitum*, foram tratados por via oral (v.o) com uma dose de 2000mg/kg de peso corporal da solução com o composto ou igual volume do veículo. Após os tratamentos, os animais foram observados durante 30, 60, 120, 180 e 240 minutos em campo aberto, e após este período, ficaram sob a observação em suas gaiolas durante 14 dias para verificação de possíveis sinais e sintomas de toxicidade e/ou envenenamento, como perda de peso, letargia, comportamentos habituais (grunhido, pilo ereção, caminhadas explorativas).

#### 2.5 Avaliação Da Mutagênicidade E Genotoxicidade Do Tirosol

Os 10 camundongos foram distribuídos em três grupos: um grupo recebeu a solução com tirosol 2000mg/kg (n=4), outro grupo recebeu apenas água destilada e serviu de controle

negativo (n=2); O último grupo foi o controle positivo que recebeu ciclofosfamida, por via intraperitoneal, um agente mutagênico bem estabelecido na literatura científica (n=4). Todos os grupos supracitados receberam seus respectivos tratamentos por gavagem. Após 48 horas de tratamento, os camundongos foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal, e 1mL de sangue periférico foi coletado de cada animal por punção retro-orbital. Logo depois, os animais sofreram eutanásia com uma injeção letal contendo uma superdosagem de quetamina e xilasina.

### 2.5.1 *Ensaio Cometa*

O ensaio cometa, também conhecido por eletroforese de célula única, é o estudo proposto para avaliar genotoxicidade em diversos tecidos e células, assim como reparo no DNA (UMBUZEIRO & ROUBICEK et al., 2006). O procedimento após a coleta do material foi realizado em uma sala com luz vermelha (sem a presença da luz branca), pois o experimento é fotossensível. O sangue coletado foi homogeneizado com agarose de baixo ponto de fusão (LM) e depositado nas lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão; estas lâminas foram cobertas com lamínulas e seguiram para o refrigerador. Depois da refrigeração, as lamínulas foram retiradas e as lâminas depositadas em cubas (sempre protegidas da luz) com solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10). Após o tempo necessário para a lise (48 horas a uma semana), segue-se o processo de eletroforese, em que as células lisadas foram submetidas a uma corrente de  $\pm 300\text{mA}$ , com diferença de potencial de 32V, por 20 minutos, em uma cuba contendo solução tampão alcalino (1M NaOH e 200 mM EDTA, pH 13). Logo depois, as lâminas foram neutralizadas com tampão (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) e coradas com 30 $\mu\text{L}$  de brometo de etídio (0, 0002%, p/v) por lâmina. A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência com filtro Alexa flúor 546.

Foram analisados 100 nucleoides por animal com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. Cada nucleoide analisado foi classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano aparente); 1 (com pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo). Desta forma, os valores obtidos para cada indivíduo puderam variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor damos o nome de índice de dano (ID) por animal. A frequência de danos (FD) também foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 a classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (COLLINS, 2008).

### 2.5.2 Teste Do Micronúcleo

O teste de micronúcleo que foi inicialmente desenvolvido por Schimid (1975), tem a capacidade de detectar efeitos mutagênicos provocados por vários agentes químicos e físicos. Para esse teste, foi utilizada a técnica descrita por Hayashi e colaboradores (1990). Foram colocados 5 $\mu$ l de sangue periférico sobre lâminas previamente preparadas com laranja de acridina, cobrindo-se com uma lamínula para espalhar uniformemente o material. Foi estabelecida a proporção de eritrócitos policromáticos (PEC) em relação ao total de eritrócitos da seguinte maneira:  $PEC / (PEC + NEC)$ , onde NEC significa eritrócitos normocromáticos. Uma comparação entre a proporção de PEC de cada animal tratado foi feita com a do grupo controle. Se a proporção de PEC em um dado animal fosse menor do que 20% em relação ao PEC do grupo controle, o animal seria descartado do estudo. Os 2000 PEC foram contados por animal para se quantificar a presença de PEC micronucleados (PECMn) (OCDE, 2009). Os eritrócitos policromáticos foram analisados em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse 80i).

### 2.6 Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram formados por 25 ratos subdivididos em pequenos grupos de 5 animais seguindo o cálculo de amostragem estabelecido por Ilyas *et al.*, (2017). O cálculo baseia-se no número mínimo necessário de animais para realização do experimento. Ele é formulado a partir do número total de animais menos o número total de grupos ( $(E = (5 \times 5) - 5 = 20$ , estando dentro dos padrões). As doses de Tirosol foram estabelecidas na concentração de 3, 15 e 30 mg, pois segundo Costa e colaboradores (2014) em concentrações maiores o Tirosol tornou-se tóxico para os animais, não produzindo o efeito desejado. Houve um grupo sadio, um doente e demais grupos doentes que foram tratados com concentrações do tirosol.

- Grupo 1: Os animais foram tratados com NaCl 0,9% I.P e com água destilada (V.O) durante 8 dias;
- Grupo 2 – Os animais foram condicionados com fio de sutura em algodão dentro do sulco gengival dos incisivos centrais inferiores para a indução da gengivite e tratados com NaCl 0,9% I.P e com água destilada V.O por 8 dias;
- Grupo 3 – Os animais com a indução da gengivite foram tratados simultaneamente pelo método de gavagem com o tirosol na dose de 3mg/kg de peso por V.O durante 8 dias;

- Grupo 4 – Os animais com a indução da gengivite foram tratados simultaneamente pelo método de gavagem com o tirosol na dose de 15mg/kg de peso por V.O durante 8 dias;
- Grupo 5 – Os animais com a indução da gengivite foram tratados simultaneamente pelo método de gavagem com o tirosol na dose de 30mg/kg de peso por V.O durante 8 dias;

Neste trabalho foi utilizado um modelo animal de indução da gengivite em ratos adaptado de AKASHI (2016). Após a anestesia, foram posicionados para a aplicação do protocolo de colocação da ligadura utilizando um fio de seda preta 3.0 (Ethicon), o qual foi colocado na região cervical dos incisivos centrais inferiores, tomando-se o cuidado de penetrar o fio no sulco gengival. O fio foi colocado na região subgengival e o nó posicionado na região mesial e retido com o auxílio de um sistema adesivo a base de etil-2-cianoacrilato (GYÖRFI et al., 1994; LOHINAI et al., 1998; RAMOS et al, 2020).

#### 2.6.1 *Processamento Histológico*

Decorridos 1, 7 e 14 dias, dois animais de cada grupo (teste e controle) foram escolhidos aleatoriamente e eutanasiados pela superdosagem em via intraperitoneal de solução anestésica (Ketamina e Xilazina). Após a aplicação imediata desta solução anestésica, um fragmento da gengiva marginal e inserida em toda sua extensão e profundidade foi retirada através de um bisturi número 15. O material foi processado e as imagens histológicas das lâminas foram capturadas por meio de câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Nikon E-100), tendo sido obtidos 20 campos por lâmina com aumento final de 40X.

#### **2.7 Dissecções Da Área Periodontal E Homogeneização Das Amostras Teciduais Do Periodonto Para Dosagens Bioquímicas**

Após o experimento, os animais foram anestesiados, eutanasiados, e as amostras foram removidas. O tecido periodontal (gengiva marginal livre e inserida das regiões vestibular e lingual respectivamente) foi dissecado rapidamente sobre placa de gelo, pesado e homogeneizado (10% p/v) em PBS 1% com adição de BHT 0,004%. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, e os sobrenadantes foram congelados em freezer à -80 °C. Posteriormente foi realizada a avaliação das atividades enzimáticas.

### 2.7.1 Determinação Da Atividade Da Catalase

A atividade da Catalase nas regiões do periodonto foi analisada segundo o método descrito por Sinha (1972) usando  $H_2O_2$  como substrato. A mistura reacional (1,5 mL) consistiu de 1.0 ml de tampão fosfato (0,01 M, pH7.0), 0.4 ml de água destilada e 0.1 ml do sobrenadante. A reação foi iniciada pela adição de 0.5 ml de  $H_2O_2$ , incubada a 37°C por 1 min e finalizada pela adição de 2.0 ml de dicromato/ácido acético reagente (Dicromato de potássio (5%) e ácido acético na relação de 1:3) e analisada espectrofotometricamente a 480 nm.

### 2.7.2 Determinação Da Atividade Da Superóxido Dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método Misra e Fridovich (1972). Cem micro litros do sobrenadante foram adicionados a 880  $\mu$ L (0.05 M, pH 10,2; 0,1 mM EDTA) de tampão carbonato. Foram adicionados 20  $\mu$ L de epinefrina 30 mM (em 0,05% ácido acético) à mistura e analisada espectrofotometricamente a 480 nm. A atividade enzimática foi expressa como a quantidade de enzima que inibe a oxidação da epinefrina em 50%, o qual é igual a 1 unidade. Por fim, após a eutanásia, os animais foram acondicionados em um freezer por no máximo 48h e foram recolhidos por uma empresa responsável pela incineração.

## 2.8 Análise Da Atividade Antimicrobiana Do Tirosol

Para a determinação da concentração mínima inibitória e (CMI e CMB), inicialmente foram preparadas suspensões das bactérias em solução salina a 0,9%, com densidade de 0,5 de acordo com a escala de McFarland, as quais foram aferidas com o auxílio de espectrofotômetro no comprimento de 625 nm para bactérias, para atingir a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC.

Foi utilizado o *Streptococcus mutans* UFPEDA 766 pertencente a Coleção de Microorganismos UFPEDA do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Para a confecção da placa foram distribuídos 180  $\mu$ L de meio de cultura líquido (caldo BHI) em cada poço da primeira coluna e 100  $\mu$ L nos demais poços até a nona coluna. Em seguida, foram adicionados 20  $\mu$ L da amostra nos poços da coluna 1 a partir da qual foi realizada a microdiluição sucessivamente até a coluna 9, obtendo-se concentrações decrescentes (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9  $\mu$ g/mL).

Após diluição, foi adicionado a cada poço 10  $\mu$ L do inóculo microbiano padronizado ( $1,5 \times 10^5$ ). As colunas 10,11 e 12 foram utilizadas como controle. Na coluna 10 foi realizado o

controle positivo do inóculo, contendo o meio de cultura adicionado do inóculo. Na coluna 11 foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultivo e na coluna 12 foi realizado o controle do antibiótico, sendo utilizada a gentamicina para as bactérias.

As microplacas foram depositadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas. Finalizado o tempo de cultivo, as microplacas foram observadas em lupa, e uma alíquota do conteúdo dos poços que não apresentaram turvação foi semeada em placa de Petri contendo meio BHI sólido, para determinação da concentração mínima bactericida (CMB).

As placas de Petri semeadas foram incubadas em estufa a 37° C por 24 h. Em seguida, as microplacas foram reveladas com a adição de 20 µL de resazurina (corante indicador de oxido-redução) a 0,01% e incubadas por 1-4 horas para observar a mudança de coloração nos poços. Após o tempo de revelação, a manutenção da cor azul foi interpretada como inibição do crescimento microbiano, enquanto o desenvolvimento da cor rosa, indicou a ocorrência de crescimento. Foi estabelecido que a CMI verifica a menor concentração da substância teste capaz de inibir parcialmente o crescimento do micro-organismo, e a CMB a menor concentração da substância com atividade bactericida de até 99,9% em determinado intervalo de tempo (CLSI, 2017). Os valores da CMI e CMB foram obtidos pela observação conjunta dos resultados obtidos da microplaca e da placa de Petri. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

## 2.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prisma 5.1. A diferença entre os grupos foi verificada através do teste “t” de Student e da análise de variância (ANOVA), seguida, quando necessário, pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Avaliação Da Atividade Antioxidante “In Vitro” Do Tirosool

A atividade de eliminação do radical DPPH foi significativamente evidente em todas as concentrações testadas. A preparação foi capaz de reduzir o radical livre DPPH estável ao 1,1-difenil-2-picrilhidrazil de cor amarela com um IC50 de 8,51  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . O antioxidante sintético BHT em condições semelhantes apresentou um IC50 de 62,71  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

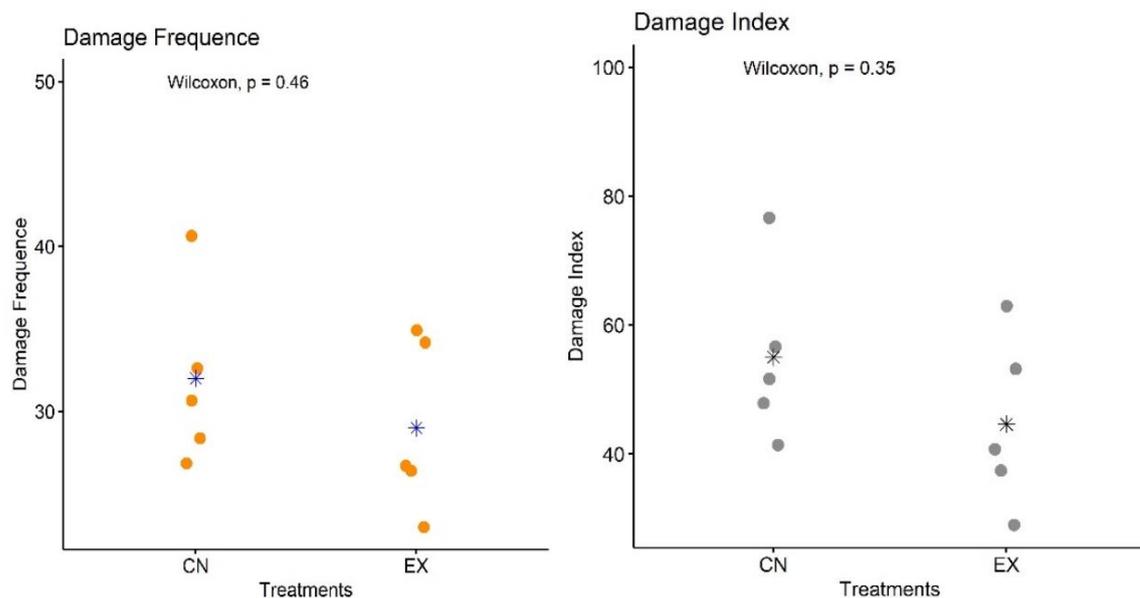
### 3.2 Avaliação Da Toxicidade Aguda Do Tirosol

Observou-se que, durante o experimento de 14 dias, o tirosol não produziu morte, bem como não apresentou sinais tóxicos ou sintomas negativos em qualquer animal. Não houve mudanças no peso corporal e todos os animais apresentaram ganho de peso. No dia a dia, não houve alterações em ambos os sexos do consumo de água e alimentos,. Portanto, a dose aguda mínima fatal do tirosol para camundongos *swiss* é superior a 2.000 mg / kg.

### 3.3 Avaliação Da Mutagênicidade E Genotoxicidade Do Tirosol

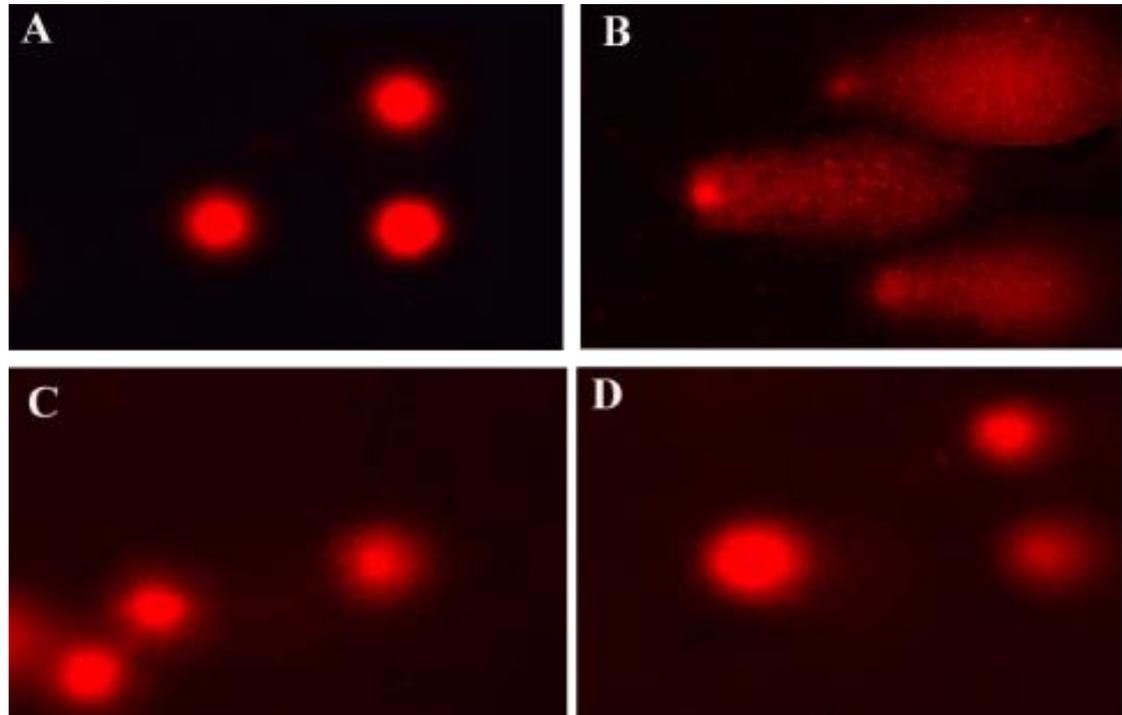
#### 3.3.1 Ensaio Cometa

**Gráfico 01** – Ensaio Cometa



**Gráfico 01:** Resultados do ensaio do cometa. PEC: eritrócitos policromáticos; CN: controle negativo (água destilada); EX: controle positivo (cy- clofosfamida - 25 mg / kg); Tirosol (2000 mg / kg). As estrelas representam os meios; As bolinhas representam a frequência do dano (amarelo) e a cinza (risco do dano); Os valores de p são mostrados em barras apenas quando a comparação foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). (Fonte: Próprio Autor, 2021)

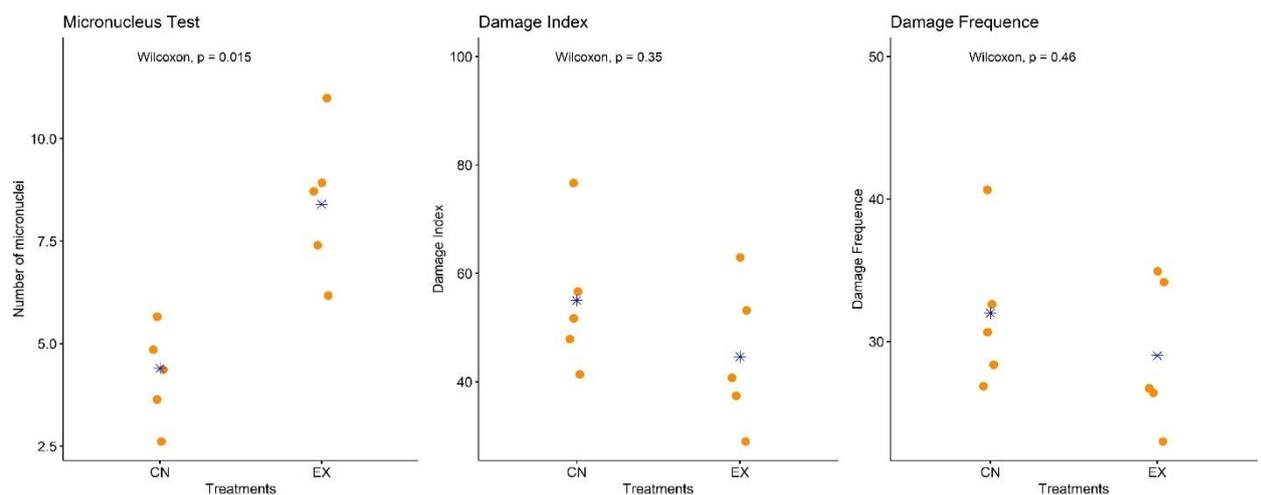
**Figura 1** – Imagem ilustrativa da eletroforese em gel de agarose mostrando em (A, B, C, D) as fases do experimento ensaio cometa.



(Fonte: Próprio Autor, 2021)

### 3.3.2 Teste do Micronúcleo

**Gráfico 02** – Teste do Micronúcleo



**Gráfico 02:** Resultados do teste micronúcleo. PCE: eritrócitos policromáticos; CN: controle negativo (água destilada); EX: controle positivo (cy- clofosfamida - 25 mg / kg); Tirosol (2000 mg / kg). As estrelas representam os meios; Os valores de p são mostrados em barras apenas quando a comparação foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). (Fonte: Próprio Autor, 2021)

### 3.1 Avaliação Do Ganho De Peso Dos Animais

Após a administração do Tirosol nos animais, foi observado que não houve alteração de peso nos grupos analisados. Foi comprovado que o composto fenólico Tirosol (nas concentrações estudadas) não apresenta toxicidade nos animais, e que houve ganho de peso dos mesmos.

**Quadro 01** - Análise Comparativa dos animais tratados e não tratados com o Tirosol segundo o peso.

	GAIOLA 01		GAIOLA 02		GAIOLA 03		GAIOLA 04		GAIOLA 05	
ANIMAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
Controle	306g	309g	322g	321g	315g	318g	310g	315g	302g	307g
D.P	258g	202g *	255g	222g *	270g	198g*	242g	210g*	266g	179g
Tirosol 3mg	295g	312g *	301g	314g	254g	260g	298g	330g*	271g	292g*
Tirosol 15mg	276g	290g	282g	298g	248g	277g*	252g	277g*	258g	286g
Tirosol 30mg	287g	320g *	305g	338g *	302g	305g	260g	275g	247g	261g*

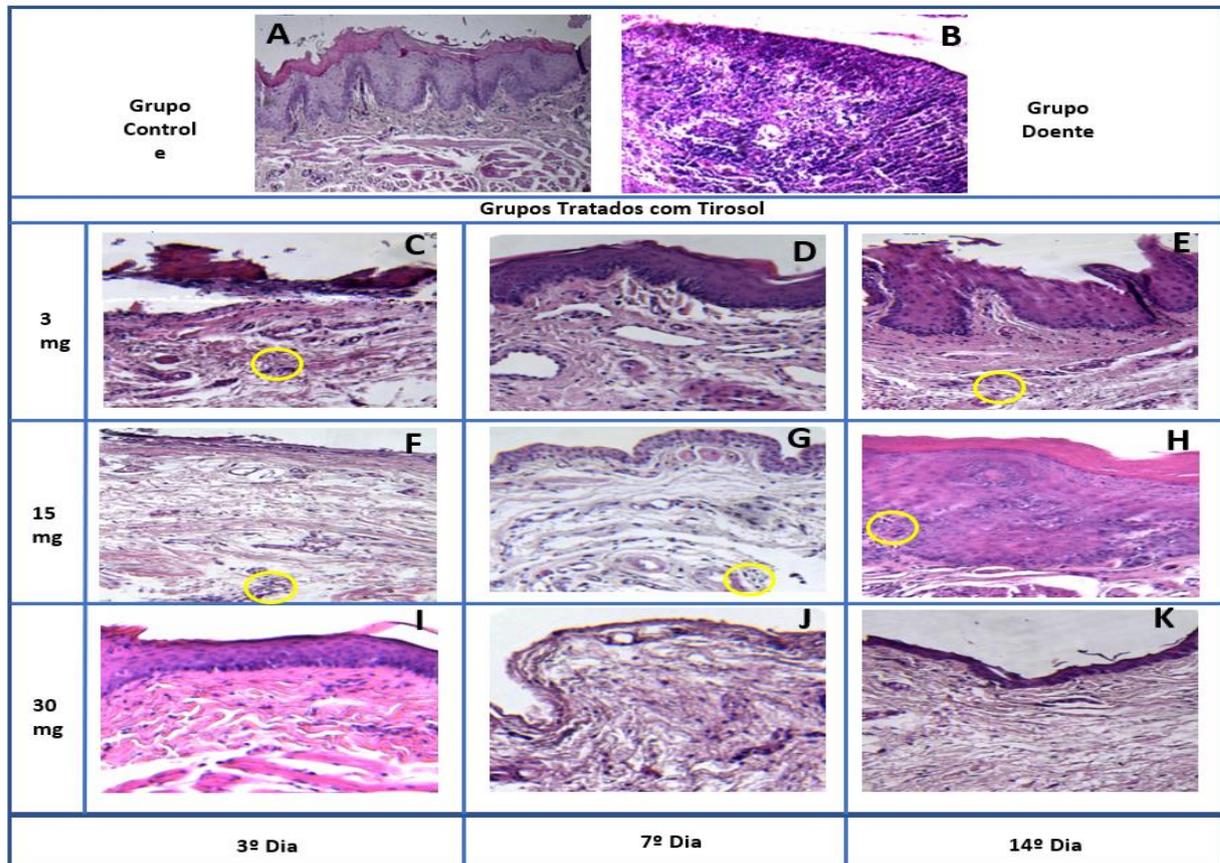
**Quadro 01.** A análise comparativa do peso corporal dos animais foi realizada no início e no fim do tratamento (Quando os animais eram eutanasiados). Cada animal foi pesado separadamente e comparado com o grupo controle. Os resultados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) onde o (\*) valor =  $p \leq 0,05$ . (Fonte: Próprio Autor, 2021)

### 3.3 Análise Histológica Dos Animais

Após a leitura das lâminas histológicas das amostras pertencentes aos dias 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> foi visto que os animais tratados com o Tirosol, e em especial, na dosagem de 30mg/Kg de peso obtiveram melhores resultados. No que diz respeito à diminuição da intensidade do infiltrado inflamatório, o grupo tratado com tirosol 30mg/Kg se assemelhou com o grupo controle negativo (com ausência da doença). Os grupos 3 e 15mg/Kg obtiveram resultados inferiores em relação

ao de 30mg/kg. No entanto, após o 7º dia de análise, houve diminuição gradativa do infiltrado inflamatório.

**Figura 2** – Análise Histológica do efeito Anti-inflamatório do Tirosol



Imagens histológicas: Controle – A; Doença Periodontal (D.P) – B; Tirosol 3 mg/kg D3 – C, D7 – D, D14 –E; Tirosol 15 mg/kg D3 – F, D7 – G, D14– H; Tirosol 30 mg/kg D3 – I, D7-J, D14-K. Os círculos amarelos evidenciam presença de infiltrado inflamatório. Na imagem B há infiltrado inflamatório difuso. As imagens E, G, H, I, J, K apresentam infiltrado inflamatório localizado. (Fonte: Próprio Autor, 2021)

**Quadro 02** - Análise comparativa de intensidade de infiltrado inflamatório.

	<b>Intensidade de Infiltrado Inflamatório</b>	<b>Densidade de Fibras de Colágeno</b>	<b>Recuperação de Epitélio</b>
<b>Controle</b>		<b>+++</b>	<b>+++</b>
<b>D.P</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	
<b>Tirosol 3mg</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>
<b>Tirosol 15mg</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>
<b>Tirosol 30mg</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>

Grau de intensidade pouco (+), moderado (++) e abundante (+++). Análise comparativa realizada através do programa ImageJ com utilização de campo visual. Foi realizada uma média dos valores obtidos no programa pela contagem dos campos selecionados. Análise estatística realizada por ANOVA com significância para 5% ( $p \leq 0,05$ ) (Fonte: Próprio Autor, 2021)

### 3.4 Determinação Da Catalase

A administração do tirosol, em especial nas concentrações de 30mg/kg inibiu o processo inflamatório segundo os parâmetros bioquímicos correlacionados. A enzima catalase em um animal doente é liberada mais rapidamente para inibição do processo oxidativo aumentado. No grupo D.P a catalase foi quantificada em  $58,61 \mu\text{Mols}/\text{min}/\text{mg}$   $p < 0,05$  de proteína testada, enquanto no grupo tratado com tirosol de 30mg/kg a catalase foi quantificada em  $32,09 \mu\text{Mols}/\text{min}/\text{mg}$   $p < 0,05$  de proteína testada, se assemelhando ao grupo controle ( $21,10 \mu\text{Mols}/\text{min}/\text{mg}$   $p < 0,05$ ).

**Gráfico 03** – Avaliação da atividade da Catalase sob o efeito protetor do Tirosol em modelo experimental da Gengivite

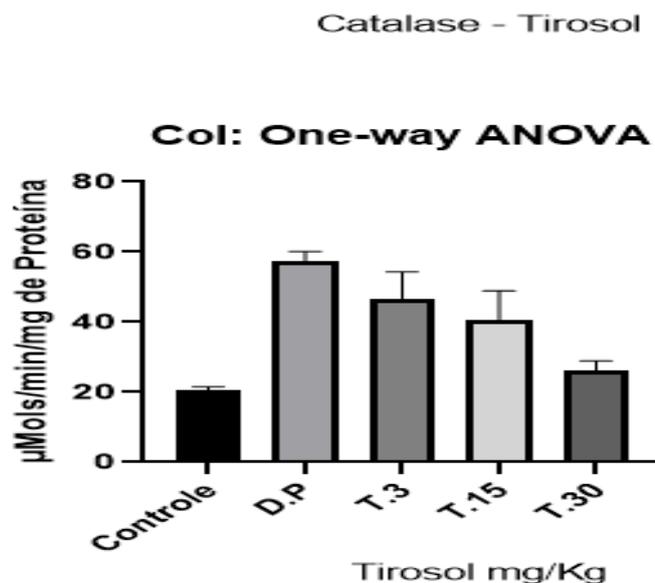


Imagem produzida pelo programa Prism Blot 9.0® sob o método estatístico da análise de variância (ANOVA) onde a comparação das amostras testadas e o resultado obtido estava em concordância com o valor de  $p < 0,05$ . (Fonte: Próprio Autor, 2021)

### 3.5 Determinação Da Superóxido Dismutase

Assim como a catalase, a Superóxido Dismutase (SOD) precisa ser produzida em meio ao processo inflamatório para agir como agente antioxidante inibindo agressão celular e protegendo-as contra a sinalização apoptótica. Foi visto que os animais tratados com tirosol 30mg/kg foram significativamente semelhantes ao controle ( $12,10 \text{ U de SOD}/\text{mg de Proteína}$  e  $14,65 \text{ U de SOD}/\text{mg de Proteína}$   $p < 0,05$  respectivamente) em relação a concentração de SOD.

Já o grupo 3mg/kg não conseguiu aumentar a atividade da enzima se assemelhando a expressão do grupo doente (4,71 U de SOD/mg de Proteína e 2,89 U de SOD/mg de Proteína respectivamente).

**Gráfico 04** - Avaliação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) sob o efeito protetor do Tirosol em modelo experimental da Gengivite

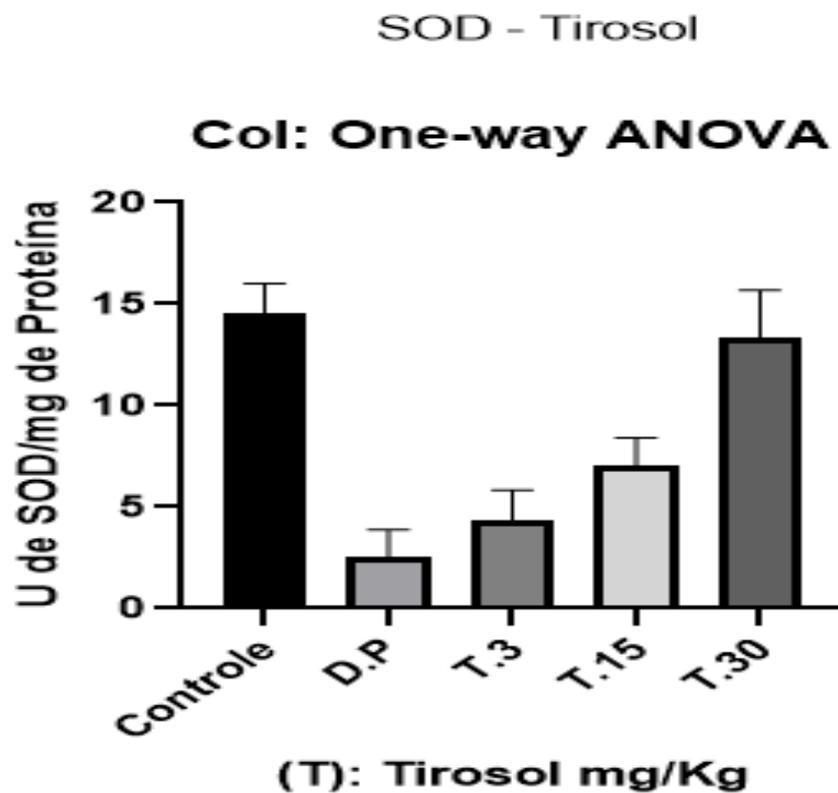


Imagem produzida pelo programa Prism Blot 9.00® sob o método estatístico da análise de variância (ANOVA) onde a comparação das amostras testadas e o resultado obtido estava em concordância com o valor de  $p < 0,05$ . (Fonte: Próprio Autor, 2021)

### 3.6 Análise Da Atividade Antimicrobiana Do Tirosol

Em relação a atividade antimicrobiana com a cultura de *Streptococcus mutans* UFPEDA 766 foi visto que o tirosol não obteve ação significativa no que diz respeito a diminuição das colônias bacterianas analisadas. Não foi visto inibição do crescimento do microrganismo em nenhuma das concentrações empregadas nos 96 micropoços da placa.

**Figura 3** – CMI do Tirosol Frente a Cepa de *Streptococcus mutans* UFPEDA 766.

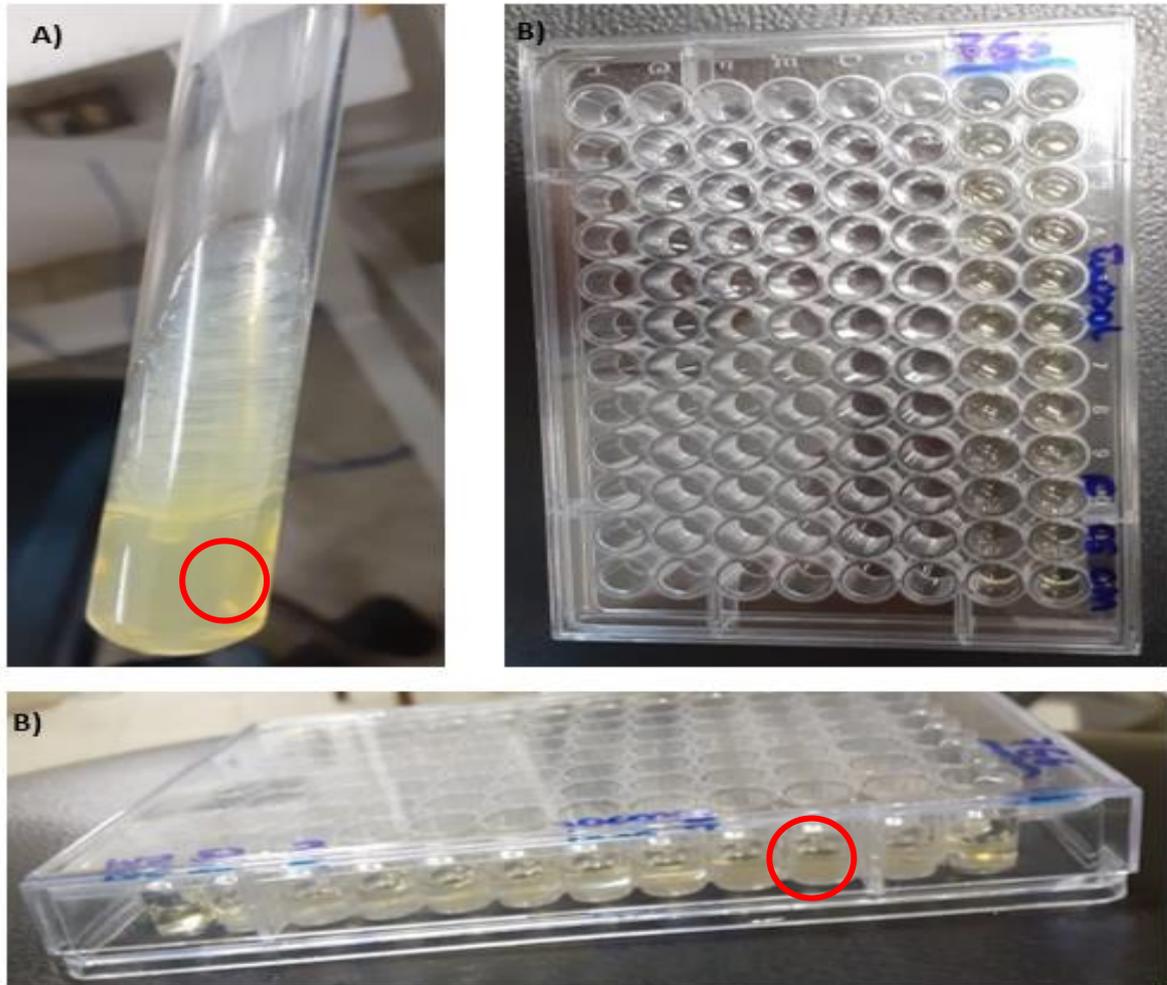


Imagem do processo de inoculação do microrganismo (A) e resultado da avaliação do CMI do tirosol em (B). Não houve inibição em nenhum dos 96 poços testados. A turbidez permaneceu presente em cada poço, evidência de colônias bacterianas ativas (círculo em vermelho). (Fonte: Próprio Autor, 2021)

#### 4 DISCUSSÃO

Após os resultados obtidos foi visto que o tirosol apresenta atividade protetiva sobre os tecidos gengivais avaliados. Isto corrobora com o que a literatura afirma sobre o composto. Autores como Anand (2017) e Kim e colaboradores (2017) já afirmavam que os compostos fenólicos assim como o tirosol, melhoravam o tecido periodontal lesionado por aumentar a atividade antioxidante intracelular diminuindo a ação de citocinas pró inflamatórias como a NF-KB respectivamente.

Pelo estudo apresentado, o tirosol possui excelente atividade antioxidante e não causa danos ao DNA. Mesmo em altas doses, o tirosol não se mostrou genotóxico. Ao mesmo tempo, o teste do micronúcleo indicou uma ligeira tendência mutagênica para o composto testado. Isto

vai de encontro com que a literatura diz a respeito das substâncias antioxidantes (SOUZA et al.,2020). Geralmente, os agentes antioxidantes são antimutagênicos. Pode ser que a alta concentração do composto ativou mecanismos de defesa dos animais induzindo possível mutagênese.

Também vale salientar que, as concentrações terapêuticas habituais do tirosol estão bem abaixo da dosagem testada neste presente estudo. Acreditamos que ainda sim, o tirosol permaneça seguro para utilização terapêutica, já que tanto no teste “in vitro” com o DPPH e a toxicidade aguda com os animais, o tirosol se mostrou ser potente antioxidante e trouxe saudabilidade para os animais testados, sem comprometimentos clínicos ou debilidades respectivamente.

Esta ação antioxidante do tirosol favorece a resposta metabólica celular aumentando os efeitos positivos do composto. Clinicamente o aumento do peso dos animais tratados com o tirosol exemplifica este mecanismo ação, no qual as ERO's inibidas geram saúde para os tecidos (MAYA-CANO; ARANGO-VARELA; SANTANA-GONZALES, 2021).

Os achados histológicos evidenciam que o tirosol também possui atividade anti-inflamatória. Segundo Kim *et al.*, (2017) o Tirosol inibe NF-KB. Esta molécula regula ativamente muitas citocinas pró-inflamatórias durante a fase aguda da inflamação. Essas citocinas pró-inflamatórias iniciam uma cascata e promovem a migração celular de neutrófilos. Sugere-se pelo nosso estudo a administração do Tirosol provavelmente reduziu a cascata inflamatória dos animais, ativou o sistema imunológico, assim como, acelerou o metabolismo gerando apetite, corroborando com o que Barbaro *et al.*, (2014) disseram.

Nos estudos conduzidos por Luo *et al.*, (2018) o Tirosol foi capaz de reduzir várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que são os principais moduladores de inflamação no tecido periodontal. Enquanto inibe o Óxido Nítrico Sintase Induzível (ONSI) e a Ciclooxygenase 2 (COX-2), o tirosol modula o processo de angiogênese com a formação de novos capilares. Este processo se dá pela germinação de microvasos pré-existentes (FORTES *et al.*, 2012). Este estudos citados corroboraram com os achados histológicos encontrados no experimento. Os tecidos gengivais tratados com o tirosol, principalmente na concentração de 30mg/kg, diminuíram o infiltrado inflamatório semelhantes ao grupo controle (sem gengivite).

Sabe-se que a atividade antioxidante endógena, através das enzimas, é muito importante para manutenção da vida celular. Esta atividade auxilia no sistema de defesa no que diz respeito ao enfrentamento contra as ERO's. Se uma terapia farmacológica aumentar a

atividade destas enzimas, o ganho clínico se torna mais evidente e a recuperação de um tecido lesado acontece mais rapidamente (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Nos nossos estudos foi visto que o tirosol aumentou a atividade enzimática de duas das principais enzimas antioxidantes de maneira significativa. Tanto os níveis da CAT quanto da SOD aumentaram em relação ao tecido lesado pelo processo inflamatório da gengivite. Na gengivite, a inflamação interfere no equilíbrio oxidativo, com o aumento das ERO's e a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (GARLET et al, 2004).

Embora não tenha apresentado um efeito antimicrobiano sobre a cepa testada, o tirosol modifica a interrelação entre as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) modulando sua manutenção e atividade. Estudos de Arias e colaboradores (2016) assim como o de Rodrigues e Černáková (2020) apontaram que o tirosol apresenta efeitos antimicrobianos em outras cepas bacterianas e em culturas fúngicas como as de *Candida albicans*. Nestes trabalhos foi visto que o tirosol não só inibiu o crescimento como modificou o mecanismo de sinalização molecular das colônias bacterianas e fúngicas chamado de “Quorum sensing”. Podemos sugerir a necessidade de mais estudos para total compreensão desta atividade, ora antimicrobiana ora estimuladora do crescimento de microrganismos.

Tudo isso sinaliza que a utilização do tirosol pode ser uma alternativa terapêutica por não causar efeitos nocivos à saúde e pode ser uma alternativa farmacológica em diversas terapias odontológicas. Este trabalho contribui para o conhecimento das propriedades terapêuticas do tirosol, bem como estimula sua utilização em tratamentos relacionados à gengivite.

## 5 CONCLUSÃO

O tirosol administrado por via oral em camundongos e em ratos provou ser uma alternativa terapêutica quando avaliado por parâmetros toxicológicos, histológicos e enzimáticos. Foi visto que possui atividade anti-inflamatória e antioxidante reduzindo o processo de gengivite induzido e que nas concentrações de 30mg/kg estes efeitos foram mais destacados. Além disto melhorou o desempenho dos animais com aumento do peso e saudabilidade se mostrando seguro tanto nas doses terapêuticas quanto em altas doses, não sendo genotóxico

## 6 FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

## 7 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao laboratório de biotecnologia do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão – UFPE e ao Biotério de Nutrição da UFPE pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho. Também agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro envolvidos deste trabalho.

## 8 REFERÊNCIAS

- AKASHI, A. (2016). **Efeitos do Ramipril sobre a Doença Periodontal Induzida Experimentalmente em Ratos**. Tese (Doutorado em Estomatologia e Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru. <https://doi.org/10.11606/T.25.2016.tde-17052016-162345>. Acesso em: 2021-07-14.
- ANAND, B. (2017). Herbal therapy in periodontics: a Review. **J Res Pharm Sci, Índia**, v.3, nº5, p. 1-7, nov/jan.
- ARIAS, L. S. et al. (2016). Activity of tyrosol against single and mixed-species oral biofilms. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 5, p. 1240-1249, jan.
- BARBARO, B. et al. (2014). Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 10, p. 18508-18524.
- BLOIS, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical. *Nature*. Vol. 181. p- p.1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E & BERSE, M.E. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. Vol. 28, Issue 1, p.25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- CARRANZA JR., F.A.; NEWMANN, M.G & TAKEI, H.H. (2018). **Periodontia Clínica**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- CIRKEL, L. L. et al. (2021). Relationship between chronic gingivitis and subsequent depression in 13,088 patients followed in general practices. **Journal of Psychiatric Research**. Vol. 138. p. 103-106. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.03.059>.

CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27 th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2017.

COLLINS, A.R., et al. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143–151. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.

CONCEA, (2015). Resolução nº 21: instalação e funcionamento da CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animal) para experiências científicas. **CONCEA**.

COSTA, R. A. et al. (2014). Study the neuroprotective effect of tyrosol in an experimental model of huntington's disease as a subsidy for the development of new medicines. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 4, p. 78, out./dez.

DOS SANTOS, E. P. et al. (2019). Punica Granatum L.(Romã) e Atividade Antimicrobiana Contra o Biofilme Dental: uma Revisão Bibliográfica. **Ensaio e Ciência**, v. 23, nº 2, p. 88-93, jun.

ELNAHAS, R. A. et al. (2021). Egyptian Olea europaea leaves bioactive extract: Antibacterial and wound healing activity in normal and diabetic rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.02.008>.

FERREIRA, C. S. et al. (2010). Melatonina: modulador de morte celular. **Rev Assoc Med Bras**. Vol.56 nº6. p.715-718.

FORTES, C. et al. (2012). Evaluation of the anti-angiogenic potential of hydroxytyrosol and tyrosol, two bio-active phenolic compounds of extra virgin olive oil, in endothelial cell cultures. **Food chemistry**, v. 134, n. 1, p. 134-140, set.

GARLET, G. P, et al. (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**. Vol 31. Issue 8. p. 671-679. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X-2004.00545.x>

GYORFI, A. et al. (1994). Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. **Journal of Clinical Periodontology**. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1994.tb00750.x>.

HAYASHI, M. et al. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res. Lett.* 245, 245–249. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-B](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-B).

IGHODARO, O & AKINLOYE, O. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**. Vol. 09. Issue 01. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.

ILYAS, M. N. et al. (2017). Sample size calculation for animal studies using degree of freedom (E); an easy and statistically defined approach for metabolomics and genetic research. **ILAR Journal**, v. 43, n. 4, p. 207-213, dez.

KHAN, M. F.; SALEEM, D; MURPHY, C. D. (2021). Regulation of *Cunninghamella* spp. biofilm growth by tryptophol and tyrosol. **Biofilm**. 2590-2075. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2021.100046>

KIM, Y. Y. et al. (2017). Tyrosol attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the inflammatory response and maintaining the alveolar capillary barrier. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 526-533, nov.

KORNMAN, K. S. (2008). Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. **Journal of Periodontology**. Vol.79 Issue.85. p.1560-1568. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080213>

LOHINAI, Z et al. (1998). Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **Br. J. Pharmacol**. Vol.123. Issue (3). p-353-60. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701604>.

LU, J. et al. (2013). Tyrosol exhibits negative regulatory effects on LPS response and endotoxemia. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 172-178, dez.

LUO, G. et al. (2018). Tyrosol attenuates pro-inflammatory cytokines from cultured astrocytes and NF- $\kappa$ B activation in in vitro oxygen glucose deprivation. **Neurochemistry international**, v. 121, p. 140-145, dez.

MADERAL, A. D. et al. (2020). Desquamative gingivitis: diagnosis and treatment. **American Academy of Dermatology**.2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.04.114>.

MAYA-CANO, D. A; ARANGO-VARELA; S.; SANTA-GONZALES, G. (2021). Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium* spp) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity. **Heliyon**. Vol. 7. Issue 2. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06297>.

MECHRI, B. et al.; Effects of drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown olive trees (*Olea europaea*). **Biochemical Systematics and Ecology**, Vol. 92, Issue 01. 104112. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104112>.

MISRA, H.P; FRIDOVICH I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**. May 25;247(10). p.3170-5. PMID: 4623845.

MOUGIOU, N. et al. (2018). Expression of hydroxytyrosol and oleuropein biosynthetic genes are correlated with metabolite accumulation during fruit development in olive, *Olea europaea*, cv. Koroneiki. **Plant Physiol Biochemn**. Vol. 128. p.41-49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.004>.

OECD (2009). Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, França.

OECD, (2002). Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method.

OECD, (2016a). Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.

OECD, (2016b). Test No. 489: in Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.

PAULO, F.; SANTOS, L. (2020). New insights in the *in vitro* release of phenolic antioxidants: The case study of the release behavior of tyrosol from tyrosol-loaded ethylcellulose microparticles during the *in vitro* gastrointestinal digestion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** **196**. 0927-7765. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111339>.

RAMOS, A. C. et al. (2020). A aplicabilidade terapêutica do tirosol e hidroxitirosol para a Odontologia. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e830986420-e830986420.

REBOUÇAS, S. O et al. (2013). Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of Hima tanthus articulatus bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. **J. Ethnopharmacol**. 147, 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.041>.

ROCHA, T.A et al. (2019). Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis*. **J. Toxicol. Environ. Health** **82**, 216–231. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1576563>.

RODRIGUES, C. F.; ČERNÁKOVÁ, L (2020). Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 444, mar./abr.

SALUCCI, S. et al. (2015). Tyrosol prevents apoptosis in irradiated keratinocytes. **Journal of dermatological science**, v. 80, n. 1, p. 61-68.

SHIMID, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. Volume 31, Issue 1. p. 9-15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058).

SIMÕES, C. M. O. *et al.* (2016). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora

SINHA, A.K. (1972). Colorimetric assay of catalase. **Anal Biochem**. Jun;47(2). p.389-94. doi: 10.1016/0003-2697(72)90132-7. PMID: 4556490.

SOUZA, T. G. S et. al. (2021). Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **J. Ethnopharm acol**. 113941. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113941>

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A. (2006). Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia Aquática**. 1 ed. São Carlos: RiMa. p. 327-344

WEBER, K.; SCHLZ, B.; RUHNKE, M. (2010). The quorum-sensing molecule E,Efarnesol - its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species, v.27, p. 727-739, fev./set.

WEI QUI et al. (2020). Upregulation of Sirt1 by tyrosol suppresses apoptosis and inflammation and modulates extracellular matrix remodeling in interleukin-1 $\beta$ -stimulated human nucleus pulposus cells through activation of PI3K/Akt pathway. **Int Immunopharmacol**. Nov; 88:106904. PMID: 32866785. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106904>.

## 5 CONCLUSÃO

Baseado no desenho do estudo proposto foi possível chegar as seguintes conclusões:

- O Tirosool possui promissora atividade antioxidante;
- O Tirosool é um composto seguro. Não é genotóxico e é levemente mutagênico apenas em grandes doses;
- Houve aumento do ganho de peso dos animais tratados com o composto mostrando ser clinicamente favorável;
- O Tirosool mostrou ação Anti-inflamatória por diminuir o infiltrado inflamatório e por modular a expressão de enzimas antioxidantes (Catalase e SOD);
- O Tirosool não apresentou atividade antimicrobiana frente a cepa UFPEDA766;
- Pelos estudos apresentados, o Tirosool pode ser uma alternativa farmacológica segura para o tratamento da gengivite e outras afecções de origem inflamatória.

## REFERÊNCIAS

AKASHI, A. (2016). **Efeitos do Ramipril sobre a Doença Periodontal Induzida Experimentalmente em Ratos**. Tese (Doutorado em Estomatologia e Biologia Oral) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru. <https://doi.org/10.11606/T.25.2016.tde-17052016-162345>. Acesso em: 2021-07-14.

ANAND, B. Herbal therapy in periodontics: a Review. **J Res Pharm Sci, Índia**, v.3, nº5, p. 1-7, nov. 2016/ jan. 2017

ARIAS, L. S. *et al.* Activity of tyrosol against single and mixed-species oral biofilms. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 5, p. 1240-1249, jan. 2016.

BLOIS, Marsden S.; Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**. Vol. 181, 1958. p.1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E ; BERSE, M.E. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**. Vol. 28, Issue 1, 1995, p.25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

CARRANZA Jr., F.A.; NEWMANN, M.G & TAKEI, H.H. **Periodontia Clínica**. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan. 2018.

CHANDRAMOHAN, R.; PARI, L. Anti-inflammatory effects of tyrosol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Journal of Functional Foods**. Vol. 27. 2016. p-17-28. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.043>.

CIRKEL, Lisa L. et al.; Relationship between chronic gingivitis and subsequent depression in 13,088 patients followed in general practices. **Journal of Psychiatric Research**. Vol. 138. 2021. p. 103-106. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.03.059>.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27 th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2017.

COLLINS, A.R., et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143–151. . 2008. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.

CONCEA, Resolução nº 21: instalação e funcionamento da CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animal) para experiências científicas. **CONCEA**, 2015

CONCEA, Resolução nº 21: instalação e funcionamento da CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animal) para experiências científicas. **CONCEA**, 2015

COSTA, R. A. *et al.* Study the neuroprotective effect of tyrosol in an experimental model of huntington's disease as a subsidy for the development of new medicines. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 4, p. 78, out./dez. 2014.

DOS SANTOS, E. P. *et al.* Punica Granatum L.(Romã) e Atividade Antimicrobiana Contra o Biofilme Dental: uma Revisão Bibliográfica. **Ensaio e Ciência**, v. 23, nº 2, p. 88-93, jun. 2019.

ELNAHAS, Reem A. et al.; Egyptian Olea europaea leaves bioactive extract: Antibacterial and wound healing activity in normal and diabetic rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2021.02.008>.

FERREIRA, Cecília S. et al.; Melatonina: modulador de morte celular. **Rev Assoc Med Bras**. Vol.56 nº6. 2010. p.715-718.

GARLET, Gustavo P, et al. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**. Vol 31. Issue 8. 2004. p. 671-679. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X-2004.00545.x>

GYORFI, A. et al; Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. **Journal of Clinical Periodontology**. **October/1994**. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1994.tb00750.x>.

HARVEY, J. D. Periodontal Microbiology. **Review Dent Clin North**, v. 61, p. 253–269, abr. 2017.

HAYASHI, M. et al., The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res. Lett.* 245, 245–249. 1990. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-B](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-B).

IGHODARO, O & AKINLOYE, O. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**. Vol. 09. Issue 01. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.

ILYAS, M. N. *et al.* Sample size calculation for animal studies using degree of freedom(E); an easy and statistically defined approach for metabolomics and genetic research. **ILAR Journal**, v. 43, n. 4, p. 207-213, dez. 2017.

KHAN, Mohd F.; SALEEM, Dua; MURPHY, Cormac D. Regulation of *Cunninghamella* spp. biofilm growth by tryptophol and tyrosol. **Biofilm**. 2590-2075. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2021.100046>

KIM, Yeon-Yong *et al.* Tyrosol attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting the inflammatory response and maintaining the alveolar capillary barrier. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 526-533, nov. 2017.

KORNMAN, Kenneth S. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. **Journal of Periodontology**. Vol.79 Issue.85.2008. p.1560-1568. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080213>

KUMAR, A, et al. *Daughter-cell-specific modulation of nuclear pore complexes controls cell cycle entry during asymmetric division*. **Nat Cell Biol**. Vol.20. Issue 4. 2018. p.432-442.

LOHINAI, Z et al.; Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **Br. J. Pharmacol**. Vol.123. Issue (3). 1998. p-353-60. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701604>.

LU, J. *et al.*, Tyrosol exhibits negative regulatory effects on LPS response and endotoxemia. **Food and chemical toxicology**, v. 62, p. 172-178, dez. 2013.

MADERAL, Andreia D. et al; Desquamative gingivitis: diagnosis and treatment. **American Academy of Dermatology**.2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.04.114>.

MAYA-CANO, Daniela A; ARANGO-VARELA; Sandra, SANTA-GONZALES, Gloria Phenolic compounds of blueberries (*Vaccinium* spp) as a protective strategy against skin cell damage induced by ROS: A review of antioxidant potential and antiproliferative capacity. **Heliyon**. Vol. 7. Issue 2. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06297>.

MECHRI, Beligh et al.; Effects of drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown olive trees (*Olea europaea*). **Biochemical Systematics and Ecology**, Vol. 92, Issue 01. 2020. 104112. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104112>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. **SB Brasil 2010**: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília, DF: SVS; 2012.

MISRA, H.P; FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**. May 25;247(10). 1972.p.3170-5. PMID: 4623845.

MOUGIOU, Niki et al.; Expression of hydroxytyrosol and oleuropein biosynthetic genes are correlated with metabolite accumulation during fruit development in olive, *Olea europaea*, cv. Koroneiki. **Plant Physiol Biochemn**. Vol. 128. 2018. p.41-49. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.004>.

NAZIR, M. *et al.* Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. **The Scientific World Journal**, v.1. 2020.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, França, 2009.

OECD, 2002. Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method.

OECD, 2016a. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.

OECD, 2016b. Test No. 489: in Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.

PAULO, Filipa; SANTOS, Lúcia; New insights in the *in vitro* release of phenolic antioxidants: The case study of the release behavior of tyrosol from tyrosol-loaded ethylcellulose microparticles during the *in vitro* gastrointestinal digestion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** **196**. 0927-7765. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111339>.

PIZZO, G. *et al.* Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. **European journal of internal medicine**, v.21, n. 6, p. 496-502, dez. 2010

PIZZORNO, J. E.; MURRAY, M. T. Textbook of Natural Medicine. 5 ed. Churchill Livingstone, 2020

POLUHA, Rodrigo L; GROSSMANN, Eduardo. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. **Br J Pain**. São Paulo, 2018 jan-mar;1(1):60-5

RAMOS, A. C. *et al.* A aplicabilidade terapêutica do tirosol e hidroxitirosol para a Odontologia. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e830986420-e830986420, 2020.

REBOUÇAS, S. O *et al.* Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of Hima tanthus articulatus bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. **J. Ethnopharmacol.** 147, 474–480. 2013 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.041>.

ROBBINS *et al.*; **Patologia básica**; Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

ROCHA, T.A *et al.* Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis*. **J. Toxicol. Environ. Health** 82, 216–231. 2019 <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1576563>.

RODRIGUES, C. F.; ČERNÁKOVÁ, L. Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 444, mar./abr. 2020

RODRIGUES, C. F.; ČERNÁKOVÁ, L. Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 444, mar./abr. 2020.

SALUCCI, S. *et al.* Tyrosol prevents apoptosis in irradiated keratinocytes. **Journal of dermatological science**, v. 80, n. 1, p. 61-68, out. 2015.

SHIMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**. Volume 31, Issue 1. 1975. p. 9-15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058).

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Artmed Editora, 2016

SINHA, A.K. Colorimetric assay of catalase. **Anal Biochem.** Jun;47(2). 1972. p.389-94. doi: 10.1016/0003-2697(72)90132-7. PMID: 4556490.

SOCRANSKY, S.S *et al.*; Microbial Complexes In Subgingival Plaque. **Journal of Periodontology**. Vol.25 Issue 2. 1998. p- 134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>

SOUZA, Talita. G. S et. al; Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **J. Ethnopharmacol.** 113941. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113941>

STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Revista de Odontologia da UNESP**. Araraquara, v. 47, n. 4, p. 189- 197, jul./ago. 2018

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P.; BERTOLETTI, E. (Org.). **Ecotoxicologia Aquática**. 1 ed. São Carlos: RiMa, 2006, p. 327-344

VETTORE, M. V.; MARQUES, R. A. A.; PERES, M. A. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrasil 2010: abordagem multinível. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, p. 29-39, dez. 2013.

WEBER, K.; SCHLZ, B.; RUHNKE, M. The quorum-sensing molecule E,Efarnesol - its variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species, v.27, p. 727-739, fev./set. 2010.

WEI QUI et al.; Upregulation of Sirt1 by tyrosol suppresses apoptosis and inflammation and modulates extracellular matrix remodeling in interleukin-1 $\beta$ -stimulated human nucleus pulposus cells through activation of PI3K/Akt pathway. **Int Immunopharmacol.** Nov; 88:106904. 2020. PMID: 32866785. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106904>.

ZAKERI, M. A. et al.. Chronic Patients' Activation and Its Association with Stress, Anxiety, Depression, and Quality of Life: A Survey in Southeast Iran. **BioMed research international**, 2021, 6614566. <https://doi.org/10.1155/2021/6614566>

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMA



Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Biociências  
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife – PE – Brasil  
 Fones: 2126 8842  
 ceua@ufpe.br

Recife, 15 de julho de 2019

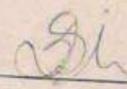
Ofício nº 39/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
 Para: **Prof. Gustavo Pina Godoy**  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Processo nº 0015/2019

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo do Efeito Protetor do Tirosol em Modelo Experimental da Doença Periodontal**”, registrado com o nº 0015/2019 sob a responsabilidade de **Prof. Gustavo Pina Godoy** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/07/2019

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Setembro /2019 a outubro/ 2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico e Camundongo heterogênico
Nº de animais	55
Peso/Idade	variados
Sexo	Macho ( 40) e Femea ( 15)
Origem: Biotério de Criação	Ratos- Bioterio do Departamento de Nutrição e Camundongos - Bioterio do Laboratorio de Imunopatologia Keiso Asami - Lika - UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Bioterio do Departamento de Nutrição

Atenciosamente,

  
 Prof. Sebastião R. F. Silva  
 Vice-Presidente CEUA/UFPE  
 SIAPE 2345691

## ANEXO B – ORMAS DA REVISTA



## JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Audience</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0378-8741

#### DESCRIPTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their **biological** and **pharmacological effects** based on the principles established through international conventions. Early people confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful **therapeutic agents** in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these **medicinal substances** and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of **indigenous remedies**. Chemists continue to use **plant-derived drugs** (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the:

- documentation of **indigenous medical knowledge**,
- scientific study of **indigenous medicines** in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as
- search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. Clinical studies on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems. The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only.

## AUDIENCE

---

Ethnopharmacologists, Medicinal Chemists, Pharmacologists, Toxicologists, Anthropologists, Pharmacognosists, Ethnobotanists, Economic Botanists, Ethnobiologists

## IMPACT FACTOR

---

2020: 4.360 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

AGRICOLA  
 BIOSIS Citation Index  
 CAB International  
 Cambridge Scientific Abstracts  
 Chemical Abstracts  
 Current Contents - Life Sciences  
 Embase  
 International Pharmaceutical Abstracts  
 NAPRALERT (Natural Products Alert)  
 Science Citation Index  
 PubMed/Medline  
 EMBiology  
 Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**A.M. Viljoen**, Tshwane University of Technology Department of Pharmaceutical Sciences, Private Bag X680, 0001, Pretoria, South Africa

If you want to suggest a review, please provide a structured abstract and include an annotated table of contents and a short CV of the lead author(s).

### *Associate Editor*

**P. Dias Fernandes**, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

**T. Efferth**, Johannes Gutenberg University, Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Mainz, Germany

**L.D. Kong**, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing, Jiangsu, China

**V. Kuete**, University of Dschang, Dschang, Cameroon

**M. Leonti**, University of Cagliari, Cagliari, Italy

**J. Liu**, Beijing University of Chinese Medicine Center for Evidence-Based Chinese Medicine, Beijing, China

**P. K. Mukherjee**, Institute of Bioresources and Sustainable Development, Imphal, India

**K. Shaari**, Universiti Putra Malaysia Institute of Bioscience, Serdang, Malaysia

**A. Shikov**, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, Sankt Peterburg, Russian Federation

**M. Ye**, Peking University, Beijing, China

**E. Yesilada**, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

### *Managing Editors*

**I. Vermaak**, Tshwane University of Technology Department of Pharmaceutical Sciences, Pretoria, South Africa

**M. Sandasi**, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa

**S. Combrinck**, Tshwane University of Technology Department of Pharmaceutical Sciences, Pretoria, South Africa

**G. Fouche**, University of Pretoria Department of Paraclinical Sciences, Onderstepoort, South Africa

### *Editorial Board*

**S. Alban**, Kiel, Germany

**A. Andrade-Cetto**, Ciudad de México, Mexico

**M.J. Balick**, Bronx, New York, United States of America

**R. Bauer**, Graz, Austria

**G. Bourdy**, Cayenne, French Guiana

**T. Brendler**, Collingswood, New Jersey, United States of America

**J.B. Calixto**, Florianópolis, Brazil

**D. C. Chattopadhyay**, Indian Council of Medical Research, Kolkata, India

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

**Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited.** It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

### Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords ([here](#)). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

#### The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

**Authors are encouraged to submit video material or animation sequences** to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

#### Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Short Communications - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge @pharmacy.ac.uk are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and

natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor [jepreviews@tut.ac.za](mailto:jepreviews@tut.ac.za) with an outline.

7. Conference announcements and news.

### **Submission checklist**

Please click [here](#) to download the Submission **Checklist**. This is a mandatory file during submission. Upload the completed checklist and choose the file type as "Checklist".

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)*

*Supplemental files (where applicable)*

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

## **BEFORE YOU BEGIN**

### **Ethics in publishing**

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

### **Policy and ethics**

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

**Animal and clinical studies** - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

**Biodiversity rights** - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

#### *Author contributions*

For each author the contribution to the publication should be mentioned.

#### **Declaration of competing interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. **Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.** If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. [More information.](#)

#### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

#### *Preprints*

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

#### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

#### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

#### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

#### *Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

#### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

#### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

#### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### **Open access**

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

#### *Elsevier Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

### Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P, Vlietinck A.J., Berghe D.V., et al. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.

Matteucci, E., Giampietro, O. (2008) Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 163-172.

Froede, T.S.A. and Y.S. Medeiros, Y.S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 173-183. Gertsch J. (2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 177-183.

Chan K., et al. (2012) Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese Materia Medica. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 469-475.

Heinrich, M., Edwards. S., Moerman. D.E.. and Leonti. M. (2009), Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol*, 124: 1-17.

## PREPARATION

### Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

### Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

### Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see

also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### Article structure

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Glossary*

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

• **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the **headings Ethnopharmacological relevance, Aim of the study, Materials and Methods, Results, and Conclusions**.

Click [here](#) to see an example.

### Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

### Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found [here](#).

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Plant names

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with <http://www.theplantlist.org> mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

*Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

*Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

*Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

**Artwork***Electronic artwork**General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

*Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

##### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

##### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

##### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use

reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-ethnopharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### Reference style

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

#### Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For

more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Data in Brief*

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly

alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

#### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

#### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>