

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MARIANA PASSOS DE LUCA

EFEITO DE VERNIZ DE PRÓPOLIS EM *Streptococcus mutans* E EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÁRIE

Belo Horizonte
2015

Mariana Passos De Luca

EFEITO DE VERNIZ DE PRÓPOLIS EM *Streptococcus mutans* E EM MODELO EXPERIMENTAL DE CÁRIE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Vagner Rodrigues Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Miriam Pimenta Vale

Belo Horizonte
Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

D278e
2015
T De Luca, Mariana Passos
Efeito de verniz de própolis em *Streptococcus mutans* e em modelo experimental de cárie / Mariana Passos De Luca. – 2015. 72f. : il.

Orientador: Vagner Rodrigues Santos
Coorientadora: Miriam Pimenta Parreira do Vale

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Cárie dentária. 2. Própolis– uso terapêutico.
3. *Streptococcus mutans*. I. Santos, Vagner Rodrigues. II. Vale Miriam Pimenta Parreira do. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK D047

Biblioteca da Faculdade de Odontologia - UFMG

Aos meus pais **Aldo** e **Marilsa**, pelo apoio incondicional e força nos momentos difíceis da minha trajetória.

Ao meu marido **Paulo** por ter sempre me dado condições de seguir os meus sonhos, mesmo sacrificando os nossos! Você é o meu grande exemplo de homem, professor e pesquisador!

À minha filha **Isabela**, por ter me ensinado tantas coisas desde que veio ao mundo! Você é a razão pela qual eu luto para ser uma pessoa melhor todos os dias!

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela oportunidade de aprendizado durante esses anos, pelas conquistas e inspiração para realizar este trabalho;

Agradeço aos meus orientadores **Prof. Dr. Vagner Rodrigues Santos** e **Profa. Dra. Miriam Pimenta Vale** pela amizade, ajuda e suporte no doutorado;

Ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen** por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e permitido que eu desenvolvesse o experimento em animais em seu laboratório;

Ao **Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani** pela amizade e valorosa colaboração no experimento com PCR em tempo real;

Aos amigos que colaboraram em várias fases da pesquisa na UFMG: **Patrícia Corrêa-Faria, Alfonso Gala-García, Elizete Maria Rita Pereira, Suzane Gonçalves Paixão, Marieta Torres Abreu Assis;**

Aos colegas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) que me acolheram e me ajudaram durante a minha passagem por Piracicaba: **Carina, Bruna, Irlan, Laila, Luciana, Livia, Luiz, Marcelo, Jonny, Camila, Ana Paula, Bruno, Luciano, Cleiton, Talita e Juliana;**

Aos demais colegas de doutorado, pela convivência durante esta jornada, em especial à **Maria Luiza da Matta Felisberto Fernandes** (Malú) pela amizade;

À técnica do Laboratório de Microbiologia da FOUFMG, **Silvana Maria de Sousa**, pela ajuda e companheirismo durante todas as fases da pesquisa;

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia da FOP/UNICAMP **Eliane Melo** e **José Carlos** pela paciência e ajuda no experimento com animais;

Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFMG, em especial aos coordenadores **Saul Martins Paiva e Maria Cássia Ferreira Aguiar** por todo o apoio e auxílio durante o doutorado;

Aos **Professores de Odontopediatria da FOUFMG** pelo apoio;

A todos os **pacientes que participaram da pesquisa e às coordenadoras dos abrigos** que permitiram a participação das crianças na pesquisa, minha gratidão pela disponibilidade e pela colaboração;

À todos aqueles que participaram e ajudaram de alguma forma o desenvolvimento desta pesquisa,

Muito Obrigada!

Que eu continue a acreditar no outro mesmo sabendo de alguns valores esquisitos que permeiam o mundo; que eu continue otimista, mesmo sabendo que o futuro que nos espera nem sempre é tão alegre; que eu continue com a vontade de viver, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, uma lição difícil de ser aprendida; que eu permaneça com a vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que com as voltas do mundo, eles vão partindo...

Que eu realmente sempre a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, sentir, ou entender esta ajuda; que eu exteriorize a vontade de amar, entendendo que amar não é sentimento de posse, é sentimento de doação; que eu alimente minha garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são ingredientes tão fortes quanto o sucesso e a alegria; que eu atenda sempre mais à minha intuição, que sinaliza o que de mais autêntico possuo; que eu pratique sempre mais o sentimento de justiça, mesmo em meio à turbulência dos interesses; que eu manifeste o amor por minha família, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exige muito para manter sua harmonia; que eu acalente a vontade de ser grande, mesmo sabendo que minha parcela de contribuição no mundo é pequena; e, acima de tudo...

Que eu lembre sempre que todos nós fazemos parte desta maravilhosa teia chamada vida, criada por alguém bem superior a todos nós!

Chico Xavier

RESUMO

Produtos naturais são fontes de agentes terapêuticos eficazes e inovadores, oferecendo diversos princípios ativos a serem testados, favorecendo a descoberta e desenvolvimento de novos produtos. A própolis tem efeito antimicrobiano comprovado sobre bactérias cariogênicas, atraindo muitos estudos para este fim. Este trabalho avaliou o efeito do verniz experimental de própolis em modelo experimental de cárie dentária e na redução de *Streptococcus mutans* (SM) na saliva e em biofilme de crianças de 8 a 11 anos utilizando uma única aplicação do produto. No experimento em modelo animal de alto desafio cariogênico, 56 ratas wistar foram infectadas com SM e alocadas em quatro grupos (n=14): G1 – verniz de própolis; G2 – verniz de quitosana (veículo); G3 - Duraphat®; e G4 – sem tratamento. Após a aplicação do verniz nos molares, os animais foram submetidos a dieta rica em sacarose (Dieta 2000, 56% sacarose, *ad libitum*) por 4 semanas. Depois desse período, os animais foram eutanaziados e suas mandíbulas removidas para quantificar a microbiota total, SM e lesões de cárie. Os dados foram analisados utilizando-se o teste de Tukey-Kramer HSD. A microbiota total e a porcentagem de SM não foram diferentes entre os grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre o total de lesões de cárie em superfície lisa entre os grupos G1 e G3 ($p < 0,05$). Em lesões de cárie mais severas, G1 não teve diferença estatística com o G4. Em lesões de cárie de sulco, Duraphat® teve melhores resultados, apresentando diferença estatística em todos os índices de severidade entre os grupos ($p < 0,05$). O estudo clínico seguiu o protocolo de aplicação única no início do tratamento (*baseline*), seguindo com coletas diárias até o 5º dia e nos 10º, 15º e 30º dia após a aplicação do verniz. As colônias com morfologia típica foram contadas e o número de CFU/mL foi comparado utilizando-se o teste t para amostras independentes com nível de significância de 5%. Houve diferença estatística significativa entre o *baseline* e o 2º dia, onde foi verificada uma redução drástica nos níveis de SM, e entre o 2º dia e o 30º dia, mas não houve diferença entre o 4º dia de coleta e os dias subsequentes. Conclui-se que o verniz de própolis teve efeito em lesões cariosas superficiais com uma única aplicação em modelo animal e observou-se redução do número de SM em saliva

por um período de 3 dias em crianças. A possibilidade desses resultados terem impacto na incidência de cárie precisa ser confirmada.

Palavras-chave: cárie, própolis, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Natural products are sources of effective and innovative therapeutic agents, offering various active principles to be tested, enabling the discovery and development of new products. Propolis has proven antimicrobial effect on cariogenic bacteria, attracting many studies for this purpose. This work evaluated the effect of the experimental propolis varnish in a caries experimental model and in the reduction of *Streptococcus mutans* (SM) in saliva and in biofilm of children from 8 to 11 years using a single application of the product. In the experiment with animal model under high cariogenic challenge, fifty-six female SPF wistar rats, previously infected with SM, were assigned to 4 groups (n=14) and treated as follows: G1 - propolis varnish; G2 - chitosan varnish/vehicle; G3 - Duraphat® and G4 - no treatment. Animals received a single varnish application on their molars and were then submitted to a high cariogenic challenge (Diet 2000, 56% sucrose, *ad libitum*) for 4 weeks. After this period, animals were euthanized by CO₂ asphyxiation and their jaws removed to quantify the total cultivable microbiota, recovered *S. mutans*, and caries lesions. Data were analyzed using the Tukey-Kramer HSD test. Total microbiota and the percentage of SM were not different between the experimental groups (p<0.05). There was no statistical difference in total smooth surface caries lesions between G1 and G3 (p <0.05). However, in more severe caries lesions, G1 did not differ statistically from G4. In sulcal caries, Duraphat® had better results, showing statistical differences in all severity indexes among all groups (p <0.05). The clinical study followed the single application protocol at the beginning of treatment (baseline), following with daily collections until the 5th day and on the 10th, 15th and 30th day after applying the varnish. The colonies with typical morphology were counted and the number of CFU/ml was compared using the t test for independent samples with 5% significance level. There was no statistically significant difference between the baseline and the 2nd day and between 2nd day and 30th day, but there was no difference from 4th day forward. We conclude that propolis varnish had effect in superficial caries lesions with a single application in animal model and suppressed the number of salivary SM for 3 days in children. The possibility of these results have an impact on the incidence of caries needs to be confirmed.

Keywords: dental caries, propolis, *Streptococcus mutans*.

LISTA DE ABREVIATURAS

FOP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
SWP	Doutorado Sanduíche no País
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
SPF	Specific Pathogen Free
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
CO₂	Gás carbônico
HSD	Honest Standard Deviation
pH	Potencial de hidrogênio
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
SP	São Paulo
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
MI	Michigan
USA	United States of America
MSB	Mitis Salivarius Bacitracin
w/v	Weight/volume
mL	Mililitro
W	Watts
Inc	Incorporation
Ds	Slight dentinal caries
Dm	Moderate dentinal caries
Dx	Extensive dentinal caries
NaCl	Cloreto de Sódio
µL	Microlitros
CFU	Colony Forming Units
ANOVA	Analysis of variance
MG	Minas Gerais
PCR	Polymerase Chain Reaction
s	Segundos
°C	Grau Celsius
h	Horas
IA	Iowa
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SD	Standard Deviation
min	Minutes
Min	Minimum
Max	Maximum

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1 Analysis of the animals' microbiota (mean and standard deviation/M \pm SD) submitted to cariogenic challenge for four weeks with propolis varnish and its controls. **28**

Table 2 Effect of propolis varnish and their controls (mean and standard deviation/M \pm SD) in the development of smooth surface caries and severity (E - enamel caries; Ds - slight dentinal caries; Dm - moderate dentinal caries; Dx - extensive dentinal caries) in rats using classification Keyes' modified by Larson. **29**

Table 3 Effect of propolis varnish and their controls (mean and standard deviation) in the development of sulcal caries and severity (E - enamel caries; Ds - slight dentinal caries; Dm - moderate dentinal caries; Dx - extensive dentinal caries) in rats using classification Keyes' modified by Larson. **29**

Artigo 2

Table 1 Mutans streptococci colony forming units in saliva (Mean; SD: standard deviation), in different collection times. **37**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	17
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivos gerais	19
4.2 Objetivos específicos	19
5. ARTIGOS	21
5.1 Artigo do experimento em modelo animal	21
5.2 Artigo da pesquisa clínica	33
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7. CONCLUSÃO	
8. REFERÊNCIAS GERAIS	48
9. ANEXOS	
Anexo A	51
Anexo B	59
Anexo C	60
Anexo D	65
8. APÊNDICE	68
9. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO	70

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença de alta prevalência (ISMAIL *et al.*, 2013), causada pela presença de um biofilme polimicrobiano maduro na superfície dentária (HESSE *et al.*, 2014). A atividade metabólica deste biofilme confere um processo dinâmico de desmineralização e remineralização do esmalte dentário, iniciando o desenvolvimento desta doença (HESSE *et al.*, 2014).

Múltiplos fatores, incluindo bactéria, açúcar, saliva e flúor, podem afetar o processo de desmineralização, podendo ser manipulados de maneira a pender a balança para a doença (desmineralização) ou para a saúde (remineralização). Durante o desenvolvimento da cárie, bactérias acidúricas e acidogênicas são predominantes no biofilme dental, sendo o *Streptococcus mutans* a mais fortemente associada à cárie dentária. Quando fatores ambientais possibilitam a seleção dessas bactérias no biofilme, o processo da doença começa (TAKAHASHI & NYVAD, 2008; BUENO-SILVA *et al.*, 2013; GUO & SHI, 2013; SEGURA *et al.*, 2014).

Para auxiliar no restabelecimento do equilíbrio saúde-doença na cavidade bucal, suprimindo o número de bactérias cariogênicas e restabelecendo a integridade do esmalte dentário (BORGES *et al.*, 2011), diversos materiais vêm sendo desenvolvidos com diferentes princípios ativos. Além do flúor e da clorexidina (MARECHAL, 1991; FERREIRA *et al.*, 2009; FURIGA *et al.*, 2013), produtos naturais contêm agentes terapêuticos eficazes, oferecendo uma diversidade de princípios ativos a serem testados, favorecendo a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (KOEHN & CARTER, 2005; JEON *et al.*, 2011). Setenta por cento dos agentes terapêuticos descobertos e aprovados entre 1981 e 2010 são de origem natural (NEWMAN & CRAGG, 2012). Muitos destes foram submetidos a pesquisas *in vivo* e a ensaios clínicos (BUTLER, 2005), porém, poucos estudos vêm sendo feitos para avaliar a aplicabilidade destes produtos no tratamento preventivo e terapêutico anti-biofilme e anti-cárie dentária (JEON *et al.*, 2011).

A própolis é um produto natural produzido pelas abelhas, contendo várias atividades biológicas de interesse em saúde, tais como: antimicrobiana,

antifúngica, antitumoral, dentre outras. A própolis tipo 12, derivada predominantemente da *Baccharis dracunculifolia* e também conhecida como própolis verde, é comumente encontrada na região Sudeste do Brasil (PARK *et al.*, 2002; BUENO-SILVA *et al.*, 2008) se destaca por sua propriedade antimicrobiana, atraindo diversas pesquisas na área Odontológica, mais precisamente na prevenção da cárie dentária (HAYACIBARA *et al.*, 2005). Aplicações tópicas de extrato etanólico de própolis foram eficazes na redução da incidência e severidade de lesões de cárie em animais (IKENO *et al.*, 1991; KOO *et al.*, 1999; HAYACIBARA *et al.*, 2005; DUARTE *et al.*, 2006). No entanto, seus efeitos cariostáticos podem variar de acordo com sua composição química e origem geográfica (KOO *et al.*, 1999).

Nesse sentido, foi desenvolvido um verniz experimental à base de quitosana e extrato etanólico de própolis, com o intuito de testar a possibilidade de manter a atividade antimicrobiana da própolis numa base polimérica (quitosana) por um período prolongado.

A quitosana, produto derivado de uma substância encontrada nas cascas de insetos e crustáceos (RINAUDO, 2006), possui propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e antibacterianas (PILLAI *et al.*, 2009), além de sua propriedade biopolimérica permitir a liberação lenta e prolongada de princípios ativos incorporados a ela (LIU *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* demonstraram que o verniz de própolis possui baixa citotoxicidade, atividade antimicrobiana contra diversas bactérias da microbiota bucal e liberação em meio aquoso por 8 semanas (DE LUCA *et al.*, 2014). Este estudo avaliará se estes resultados serão reproduzidos em modelo de lesões de cárie experimental em animais e na redução de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças de 8 a 11 anos.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÁRIE

A cárie é a doença crônica mais comum da infância, afetando 60 a 90% das crianças de 2 a 11 anos no mundo todo (BOYCE *et al.*, 2010).

Apesar do aumento e subsequente declínio desta doença desde 1950 até o começo dos anos 90 na maioria dos países desenvolvidos, observou-se que ela se tornou fortemente polarizada, mostrando uma distribuição desigual em diversas populações (OLIVEIRA *et al.*, 2006; PESSAN *et al.*, 2008).

Informações sobre saúde geral, dieta, higiene oral, exposição ao flúor e experiência de cárie podem ajudar no diagnóstico de fatores de risco para o desenvolvimento da doença num indivíduo (PETERSSON & TWETMAN, 2015), tornando possível o seu manejo e prevenção (SAJJAM *ET AL.*,2013).

As medidas preventivas têm como alvo, direta ou indiretamente, a microbiota bucal (SAJJAM *ET AL.*,2013), já que a cárie dentária está associada ao aumento na frequência de consumo de açúcar e rápida conversão desses carboidratos em produtos ácidos pelas bactérias, numa superfície dentária susceptível (MARSH, 2003; JEON *et al.*, 2011). Condições repetidas de baixo pH no biofilme fazem o número de micro-organismos acidogênicos e acidúricos prevalecer (p.e. estreptococos mutans e lactobacilos) (MARSH *et al.*, 2000), formando uma matriz rica em polissacarídeo extracelular (EPS) na interface dente-biofilme (BOWEN & KOO, 2011; JEON *et al.*, 2011).

Portanto, apesar dos biofilmes serem compostos de flora mista, os *Streptococcus mutans* são reconhecidos como os produtores primários da matriz de EPS e altamente cariogênicos.

2.1.2 *Streptococcus mutans*

Considerado o mais cariogênico de todos os estreptococos, *S. mutans* é o colonizador inicial das superfícies dentárias, produzindo quantidades significativas de EPS, sendo responsável pelo estágio inicial da formação de biofilme e lesões de cárie (FREIRES *et al.*, 2015). Possui uma importante capacidade produção de glucanos na presença de sacarose, contribuindo para a formação de um biofilme rico em polissacarídeos e altamente acidogênico, causando a desmineralização do esmalte dental (BOWEN & KOO, 2011).

Os fatores de virulência do *S. mutans* tem sido intensamente estudados, destacando-se a tolerância ao meio ácido e a síntese de glucanos através das enzimas glucosiltransferases (Gtfs) (BUENO-SILVA *et al.*, 2013; BOWEN & KOO, 2011). Os glucanos são os principais fatores de aderência e acúmulo de estreptococos na superfície dental (SCHILLING & BOWEN 1992). Aliado ao consumo frequente de sacarose, produzem uma matriz extracelular rica em polissacarídeos, formando um biofilme altamente coeso e adesivo, que protege as bactérias ali embebidas (WOLFF *et al.*, 2013). Além disso, o metabolismo dos açúcares levam a acidificação do microambiente do biofilme, contribuindo para o predomínio de bactérias acidúricas. Assim, estreptococos do grupo mutans e glucanos são considerados fatores críticos no desenvolvimento do biofilme dental cariogênico (BUENO-SILVA *et al.*, 2013).

Apesar dos biofilmes ricos em EPS serem microambientes extremamente coesos, agentes bioativos podem penetrar e desorganizar essa estrutura, interrompendo dessa forma a patogênese da cárie dentária de uma maneira eficaz e precisa (NGUYEN *et al.*, 2014).

2.2 PRÓPOLIS

O termo *própolis* deriva do grego *pro*, de “em frente de, na entrada de”, e *polis*, “comunidade ou cidade” (CASTALDO & CAPASSO, 2002; SALATINO *et al.*, 2005). Ela é utilizada pelas abelhas como proteção contra a entrada de microorganismos na colmeia e como um material para vedação, impedindo a entrada

de luz e umidade em seu interior. É utilizada também para forrar os favos, de modo a permitir a deposição de ovos pela rainha, e para embalsamar pequenos animais mortos, evitando sua putrefação (MARCUCCI *et al.*, 1995; BURDOCK *et al.*, 1998; SALATINO *et al.*, 2005).

A própolis é uma substância natural tóxica coletada por abelhas *Apis mellifera* em várias espécies de plantas, determinando a origem botânica predominante de cada tipo de própolis. A classificação da própolis brasileira em treze tipos foi feita de acordo com as propriedades físico-químicas e relatos da localização geográfica (PARK *et al.*, 2002; BUENO-SILVA *et al.*, 2008). A principal origem botânica dos tipos Sul (três), Nordeste (seis) e Sudeste (doze) da própolis brasileira são originadas de resinas de *Populus sp.*, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente.

O Cerrado brasileiro é uma das áreas mais ricas em *Baccharis sp.* Essas plantas são um grupo de arbustos lenhosos perenes, com inflorescências masculinas e femininas que aparecem nas plantas separadamente. Das várias espécies de *Baccharis*, a *Baccharis dracunculifolia* (“alecrim do campo”) é a origem dominante de própolis verde, ou do tipo 12, no sudeste do Brasil (Estado de São Paulo e área de cerrado de Minas Gerais), onde a maioria dos produtos comercializados a base dessa própolis são produzidos (PARK *et al.*, 2004).

Os típicos constituintes da própolis verde são ácido cafeoquínico e derivados prenilatados de ácido cinâmico, tais como artepilin C e baccharina (MOURA *et al.*, 2009). Apesar da composição química da própolis ser muito complexa, pode-se observar atividade antibacteriana conferida pela presença de flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres em sua composição; ação bactericida, decorrente da presença dos ácidos cinâmico e cumarínico; atividade antiviral, *in vitro*, (*herpes simplex*, *influenza*), em função da ação de flavonóides e derivados de ácidos aromáticos; e ação cicatrizante, imunoestimuladora, hipotensiva e citostática (SFORCIN, 2007; SFORCIN & BANKOVA, 2010).

Na Odontologia, tem-se estudado a atividade farmacológica da própolis em gengivites, periodontites, aftas, mumificação pulpar em dentes de cães e

lesões de cárie em animais (GERALDINI *et al.*, 2000). Também vem sendo empregada em curativos pré e pós-cirúrgicos, em tratamentos da candidose, herpes labial, além de produtos de higiene bucal. Dessa forma, a própolis se mostra um produto de grande aplicabilidade para o tratamento de afecções bucais (MANARA *et al.*, 1999).

2.3 QUITOSANA

A quitosana (FIGURA 1) é um polímero biodegradável oriundo da desacetilação da quitina (FIGURA 2), derivada de exoesqueletos de insetos e crustáceos (RODRIGUES *et al.*, 2009). Sua atividade antimicrobiana e antifúngica já foi relatada na literatura, além de suas propriedades biodegradáveis e biocompatíveis. O mecanismo que lhe confere a capacidade antimicrobiana é devido à sua carga positiva que, interagindo com a carga negativa da parede celular bacteriana, destrói os constituintes intracelulares e a permeabilidade de sua membrana. Outra propriedade importante é a sua capacidade de adesão em superfícies bucais e assim, agir como um veículo para a liberação de agentes terapêuticos (DECKER *et al.*, 2005).

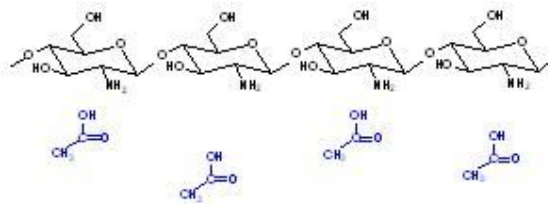


FIG.1: Estrutura molecular da quitosana.

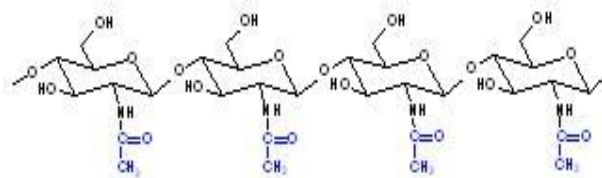


FIG. 2: Estrutura molecular da quitina.

A quitosana tem a capacidade de se aderir tanto aos cristais de hidroxiapatita como à parede celular bacteriana, inibindo a adsorção de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus mitis* à hidroxiapatita, conferindo-lhe ação bacteriostática (SHIBASAKI *et al*, 1995). Além disso, ela tem uma forte tendência de se adsorver a película adquirida, o que impede a colonização bacteriana na superfície dentária e, conseqüentemente a formação do biofilme dental cariogênico (VAN DER MEI *et al*; 2007).

Os derivados de quitosana estão sendo usados para melhorar a biocompatibilidade de superfícies, inibir a proliferação de fibroblastos, estimular a migração de polimorfonucleares, promover o crescimento de células nervosas, angiogênese e melhorar a formação óssea, cartilaginosa e tecidual (HSIEH *et al*, 2005; BUMGARDNER *et al*, 2003; KITTUR *et al.*, 2005).

Na Odontologia, um dentifrício a base de quitosana já foi testado na prevenção da desmineralização ao redor dos *brackets* ortodônticos, demonstrando diferença significativa com os dentifrícios fluoretados de uso comum (UYSAL *et al.*, 2011). A quitosana interfere no processo de desmineralização do esmalte dentário inibindo a perda de fósforo e agindo como uma barreira contra a penetração de ácidos nessa estrutura. Essa proteção depende da concentração de quitosana e do tempo de contato do polímero ao dente (ARNAUD *et al.*, 2010).

Um estudo piloto avaliou o efeito sinérgico de quitosana e clorexidina sobre *S. sanguinis* na forma planctônica e aderida. Essa combinação promoveu uma redução significativa dessas bactérias, melhorando o efeito bactericida e bacteriostático da clorexidina sobre esses micro-organismos (DECKER *et al*, 2005).

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Vernizes contendo flúor ou clorexidina já são empregados na prevenção da cárie dentária, possuindo eficácia comprovada em diversos estudos realizados. No entanto, vernizes de ação antimicrobiana, como o de clorexidina, não são comercializados no Brasil, impedindo o uso destes produtos para esta finalidade.

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis já é cientificamente comprovada contra diversas bactérias da microbiota bucal. A incorporação desta substância a um biopolímero poderia aumentar essa atividade, devido ao maior tempo de permanência na cavidade bucal.

A redução do número de microrganismos é importante, aliada a outras medidas de controle da cárie. Enquanto outros fatores não são controlados, a aplicação do verniz de própolis pode ser uma abordagem interessante por diminuir a microbiota cariogênica.

Os resultados favoráveis dos estudos realizados *in vitro* demonstram o potencial do uso da própolis na forma de verniz (DE LUCA *et al.*, 2014). Esses resultados precisam ser testados na prática clínica, o que possibilitaria o preenchimento da lacuna existente no mercado com a falta de um produto com propriedades antimicrobianas de aplicação profissional e de baixo custo se comparado ao verniz de clorexidina, que é importado.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito do verniz de própolis na incidência e severidade de lesões cariosas em modelo animal. Avaliar o efeito do verniz de própolis a redução de *Streptococcus mutans* em saliva e em biofilme em pacientes com idades variando entre oito e onze anos em um estudo clínico de fase I.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Artigo 1: “Effect of an experimental propolis varnish on caries development in rats”

1. Avaliar o efeito do verniz de própolis sobre o desenvolvimento de lesões cariosas no modelo de alto desafio cariogênico em animais, após única aplicação do produto.
2. Avaliar o efeito do verniz de própolis na microbiota total e em *Streptococcus mutans* no modelo de alto desafio cariogênico em animais.
3. Comparar a eficácia do verniz de própolis com o verniz de flúor e verniz de quitosana (veículo) na incidência e severidade das lesões cariosas em modelo animal.

4.2.2 Artigo 2: “Evaluation of reduction in salivary levels of *Streptococcus mutans* after propolis varnish single application”

1. Avaliar a eficácia do verniz de própolis na redução dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* em crianças por um período de 30 dias após única aplicação do produto.
2. Avaliar a presença de efeitos colaterais nos indivíduos que receberam aplicação tópica do verniz de própolis.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste estudo será abordada nos artigos científicos. A seguir, serão apresentados os artigos relacionados ao experimento em modelo animal e ao estudo clínico de fase I, respondendo aos objetivos específicos propostos.

5.1 ARTIGO 1

Os experimentos em modelo animal foram realizados na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP) sob a orientação do Prof. Dr. Pedro Rosalen, durante o período de Doutorado Sanduíche no país (Bolsa SWP/Cnpq nº 300165/2013-7).

O embasamento para a realização deste experimento, assim como a metodologia completa e resultados, encontram-se no artigo intitulado: "Effect of an experimental propolis varnish on caries development in rats", a ser submetido para a revista Caries Research.

"Effect of an experimental propolis varnish on caries development in rats"

Mariana Passos De Luca^a, Vagner Rodrigues Santos^b, Miriam Pimenta Vale^a,
Pedro Luiz Rosalen^c

^a Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6.627, Pampulha, 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Oral Pathology and Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6.627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Av. Limeira, 901, Areião, 13414-903, Piracicaba, SP, Brazil

Short title: Effect of propolis varnish in rats.

Key words: propolis, *Streptococcus mutans*, dental caries

Corresponding author:

Mariana Passos De Luca

Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG,
Brazil

Tel: +55 31 34092497 / FAX: +55 31 34092430

delucamariana@gmail.com

DECLARATION OF INTERESTS

The authors report no relationships, financial or otherwise, with any entity that may influence the objectivity of this manuscript.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the anti-caries potential of a propolis varnish using high cariogenic challenge experimental model. Fifty-six female SPF wistar rats, previously infected with *Streptococcus mutans* (SM), were assigned to 4 groups (n=14) and treated as follows: G1 - propolis varnish; G2 - chitosan varnish (varnish base); G3 - Duraphat® (gold standard varnish, positive control); and G4 - no treatment (negative control). Animals received a single varnish application on their molars and were then submitted to a high cariogenic challenge (Diet 2000, 56% sucrose, *ad libitum*) for 4 weeks. After this period, animals were euthanized and their jaws removed to quantify the total cultivable microbiota, recovered *S. mutans*, and dental caries. Data were analyzed using the Tukey-Kramer HSD test. Total microbiota and the percentage of SM were not different among treated groups ($p < 0.05$). There was no statistical difference in total smooth surface caries between propolis varnish and Duraphat® ($p < 0.05$). However, as caries lesions became more severe, propolis varnish did not differ from the untreated group. In sulcal caries, Duraphat® had better results, differing in all severity indexes among all groups ($p < 0.05$). We conclude that propolis varnish had no significant anti-caries effect with a single application. Further studies are needed for the development of a protocol that enables the maintenance of a longer antimicrobial activity and possibly, the effective suppression of dental caries.

INTRODUCTION

Dental caries is still a major public health problem worldwide due to its high prevalence and significant social impact [Petersen *et al.*, 2005]. It is the result of a demineralization process in which acidogenic and acidophilic bacteria embedded in a mature and well-arranged biofilm degrade tooth substance, leading to cavitation [Wolff *et al.*, 2013].

Although many recent studies relate the participation of other bacteria in the pathogenesis of dental caries [Beighton, 2005; Choi *et al.*, 2009; Wolff *et al.*, 2013; Head *et al.*, 2014], *Streptococcus mutans* plays an important role in the development of cariogenic biofilm, mainly for its acid tolerant and acidogenic characteristics, using dietary sucrose to synthesize extracellular polysaccharides (EPS). EPS are structures that allows its adherence to the tooth surface, creating a low-pH environment leading to enamel demineralization [Jeon *et al.*, 2011].

Natural products are major sources of research on pharmaceutical agents and new drugs development [Mishra & Tiwari, 2011]. Propolis is one such product that stands out for its pharmaceutical properties, mainly the antimicrobial ones, with direct application in Dentistry [Libério *et al.*, 2009, Bueno-Silva *et al.*, 2013]. It acts decreasing the number of cariogenic microorganisms, and specially *Streptococcus mutans*. It also reduces the synthesis of insoluble glucans, inhibiting glucosyltransferase enzyme. Moreover, the production of acids and the tolerance of microorganisms to acid pH is reduced by fatty acids contained in propolis [Ikeno *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 2006; Kumar, 2014].

Several biological activities are attributed to different types of propolis, among them, antimicrobial, antifungal, antitumor, and others. The propolis type 12 (green propolis) stands out for its antimicrobial property, attracting several studies in the Dentistry, specifically the prevention of dental caries [Hayacibara *et al.*, 2005]. Topical application of propolis ethanolic extract were effective in reducing the incidence and severity of dental caries in animals [Ikeno *et al.*, 1991; Koo *et al.*, 1999; Hayacibara *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2006]. However, the cariostatic effects of propolis may vary according to their geographical origin and chemical composition [Koo *et al.*, 1999].

Varnishes are materials widely used as a professional treatment for the prevention of dental caries [Petersson *et al.*, 2004]. Many therapeutical agents

are incorporated to these formulations in order to promote and prolong their anticaries effect. Fluoride varnish, with remineralizing action [Marinho *et al.*, 2013], and chlorhexidine varnish, with antimicrobial action [Jayabal & Mahesh, 2014], are the most common products used in dental practice.

Propolis varnish was developed as a new product with antimicrobial activity that has the ability to adhere to the tooth, allowing sustained release of propolis. *In vitro* results have shown good antimicrobial activity against cariogenic bacteria, low cytotoxicity and a very satisfactory release of the propolis varnish [De Luca *et al.*, 2014]. These informations have encouraged us to investigate the anti-caries activity of this product using an animal model under a high cariogenic challenge.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Fifty-six specific pathogen-free (SPF) female Wistar rats were obtained from CEMIB (Multidisciplinary Center for Biological Research, University of Campinas, SP, Brazil) and maintained at the animal facility of Piracicaba Dental School. The animal experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA - State University of Campinas, SP, Brazil; protocol #3142-1) (ANEXO A).

Experimental model

Animals were screened for indigenous *Streptococcus mutans* on mitis salivarius agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) and mitis salivarius agar plus bacitracin (MSB/Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A.). At the age 21 days, the rats were infected with an actively growing overnight culture of *Streptococcus mutans* UA159 by cotton swab and they were fed with pellet chow, diet 2000 [Keyes, 1959] and 5% sucrose in drinking water *ad libitum* [Murata, 2010]. Oral infection was confirmed at age 25 days by plating on MSB agar. At the age of 26 days, the rats were randomly assigned to 4 groups (n=14), anesthetized with chloral hydrate (440 mg/Kg) and submitted to the following treatments: G1 - topical application of propolis varnish (propolis ethanolic extract 15% w/v); G2 - topical application of chitosan varnish (varnish base, vehicle control) ; G3 - topical application of a gold standard varnish (Duraphat[®], fluoride

2.26%, w/v – positive control); and G4 - no treatment (negative control). The varnishes were applied on molars using one micro brush per hemi-arcade. After topical application, the animals fasted for 2 hours and were kept in individual cages until the end of the experiment. Cariogenic diet 2000 containing 56% of sucrose and 5% sucrose water were provided *ad libitum*. The animals were weighed weekly, and their behavior and physical appearance was noted daily. The experiment proceeded for 4 weeks, at the end of which the animals were euthanized.

Microbiological analyses

The lower left jaw was aseptically dissected, suspended in 5.0 mL of sterile saline solution (0.9 %, w/v), and sonicated using three 10 second pulses at 5 second intervals, at 30 W (Vibracell, Sonics & Material Inc.); providing the maximum recoverable viable counts. A spiral plater (Whitley Automatic Spiral Plater, DW Scientific®) was used to streak the suspensions obtained (50 µl) on blood agar (5% sheep's blood) and mitis salivarius agar containing 100 µg/mL streptomycin sulfate (MSB, Sigma®) to determine the number of total microorganisms and the *S. mutans* recovered (CFU/mL), respectively. The suspension was plated on MSB to estimate the *S. mutans* UA159 populations and on blood agar to determine the total cultivable microorganisms [Bowen et al., 1988]. The percentage of *S. mutans* with respect to total microorganisms (% *S. mutans*/total microorganisms) was calculated and recorded. The smooth-surface and sulcal caries and their severity (E, enamel lesion; Ds, dentin exposed; Dm, 3/4 of the dentin affected; Dx, all dentin affected) were evaluated according to Larson's modification of Keyes' system [Larson, 1981]. The determination of the caries score was blinded by codification of the jaws and performed by one calibrated examiner.

Statistics

Data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer HSD (Honest Standard Deviation) test for all pairs using JMP Version 3.1 software for statistical visualization at a significance level of 5%. Smooth-surface, sulcal caries scores, and severities were expressed as proportions of their maximum possible values (124 and 56, respectively).

RESULTS

All rats gained weight and remained apparently healthy and active until the end of the experiment. The average weight gains for individual groups of rats were not significantly different from one another ($p > 0.05$, data not shown). Regarding the percentage of *Streptococcus mutans*, there was no statistically significant difference between the tested groups ($p > 0.05$), as shown in Table 1. Caries scoring (Table 2) showed no significant difference ($p > 0.05$) concerning total smooth surface for the positive control (Duraphat®). In slight dentinal caries (Ds), there was no significant difference between propolis varnish and the positive and negative control groups. Regarding moderate dentinal caries (Dm), there was no statistically significant difference between propolis varnish, chitosan varnish (vehicle control) and the untreated group (negative control), as well as between the chitosan varnish and Duraphat®. In extensive dentinal caries (Dx), there was no statistically significant difference between any groups.

With respect to total sulcal caries score, no significant differences were observed. However, regarding the severity, Duraphat® had better results, showing statistically significant difference ($p < 0.05$) between all groups (Table 3). No macroscopic tissue changes or abnormalities in the animals of all groups were observed.

DISCUSSION

Propolis has many biological activities that attracts many researches in Dentistry field. The deepening of scientific research in the chemical composition of various types of propolis helped to envision their potential use and application in dental practice [Libério *et al.*, 2009; Więckiewicz *et al.*, 2013; Kumar, 2014].

Previous studies have demonstrated the antimicrobial activity of propolis on several bacteria of the oral microbiota, including *Streptococcus mutans* (ANAUATE NETO *et al.*, 2013; BARRIENTOS *et al.*, 2013; TULSANI *et al.*, 2014; MOHSIN *et al.*, 2015). In this research, this activity had no difference compared to the other groups. While this result may mean that the propolis varnish had no satisfactory antimicrobial activity, one must take into consideration that this effect was only evaluated at one endpoint, when probably the material was no longer adhered to the animal's tooth. Regularly collections of animal's saliva could give

us informations about the *Streptococcus mutans* recovery levels, how long propolis antimicrobial activity lasted and re-evaluate the need for the product's reapplication.

Propolis varnish had low anti-caries activity in the experiment with high cariogenic challenge in a rodent model. The results of this study diverge from previous research of propolis anti-caries effect in rats [Koo *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 2002; Hayacibara *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2006; Bueno-Silva *et al.*, 2013], which have achieved a significant reduction in caries activity. In these studies, propolis ethanolic extracts, or its bioactive fractions, were applied topically on rats' teeth twice a day for a period of 4 to 5 weeks, resulting in an anti-caries activity similar to Duraphat®. This result suggests that the continuing presence of propolis enabled a more effective antimicrobial activity, leading to the reduction of caries lesions.

Chitosan, which is the vehicle of this product, is a biocompatible and biodegradable polymeric material [Uysal *et al.*, 2011] with non-toxic and antimicrobial properties [Busscher *et al.*, 2008]. In this study, this vehicle was inert as the severity of dental caries increased. This may be due to the medium molecular weight of the chitosan used in this formulation, which is different from the low molecular weight chitosan generally used in other studies that proven the antimicrobial activity in other dental products [No *et al.*, 2002; Decker *et al.*, 2005; Salamat-Miller *et al.*, 2005; Uysal *et al.*, 2011; Chen & Chung, 2012; Costa *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014]. Changes in the molecular weight of chitosan used in the varnish formulation preclude the polymeric film formation, which is the feature that allows the adhesion of product to the teeth.

Fluoride, considered the gold standard in caries prevention, has little antimicrobial effect, acting on the synthesis of glucan and on the acid tolerance of *S. mutans* [Jeon *et al.*, 2011]. Duraphat®, a fluoride varnish used as positive control in this experiment, showed no statistical difference in the decrease of total microbiota between the groups, but significantly reduced the severity of dental caries ($p < 0.05$). The role of this product in the development of caries is interfering physico-chemically by reducing demineralization and enhancing remineralization

of incipient lesions [Dawes & ten Cate 1990]. It could clearly be seen in our study because, as the severity of carious lesions were increasing, the difference between the groups became remarkable.

On the other hand, despite propolis antimicrobial properties [Libério *et al.*, 2009; Barrientos *et al.*, 2013], as tooth decay was becoming more severe, propolis varnish was not effective to reduce incidence of caries lesions. Its lack of residual effect shows that propolis activity occurs while it is in direct contact with oral tissues. Repeated and prolonged applications of this new product could reduce cariogenic bacteria, and thus, achieve effective anti-caries activity.

Changes in varnish application protocol should be based on the microbiological evaluation of the recovery of the initial number of the targeted bacteria. Only at the end of the study these bacteria were quantified, which is a limitation. If this quantification was made in regular times, we could have information about the need of reapplication of the product, which could enhance the anti-caries results of all groups.

Further studies are needed to develop an antimicrobial suppression protocol that enables the maintenance of a longer antimicrobial activity and thus, the effective prevention of dental caries lesions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to CNPq for scholarship; Eliane Franco and José Carlos for technical support; Bruna Benso, Carina Denny, Irlan Almeida Freires, Laila Facin, Lívia Galvão, Camila Batista, Luiz Eduardo Ferreira and Cleiton P. Santos for their help in the experiments.

LEGENDS

Table 1: *Duraphat®; Vehicle ** (chitosan varnish); and ^xwithout treatment. All values showed no significant difference ANOVA, comparison between all pairs using Tukey-Kramer HSD ($p < 0.05$). Different superscript letters indicate significant differences between treatments.

Table 2: *Duraphat®; Vehicle ** (chitosan varnish); and ^xwithout treatment. All values showed no significant difference ANOVA, comparison between all pairs using Tukey-Kramer HSD ($p < 0.05$). Different superscript letters indicate significant differences between treatments.

Table 3: *Duraphat®; Vehicle ** (chitosan varnish); and ^xwithout treatment. All values showed no significant difference ANOVA, comparison between all pairs using Tukey-Kramer HSD ($p < 0.05$). Different superscript letters indicate significant differences between treatments.

TABLES

Table 1 - Analysis of effects on the total oral microbiota and *Streptococcus mutans* (mean and standard deviation/ $M \pm SD$) submitted to cariogenic challenge for four weeks with propolis varnish and its controls.

Treatments	Total microbiota (CFU/mL) ($M \pm SD$)	Total <i>S. mutans</i> (CFU/mL) ($M \pm SD$)	% <i>S. mutans</i> ($M \pm SD$)
Propolis varnish	75.4 (7,8) ^a	37.6 (4,2) ^a	40.7 (11,3) ^a
Positive control*	43.5 (6,0) ^a	24.4 (3,7) ^a	46.2 (15,5) ^a
Vehicle control**	74.3 (8,1) ^a	38.7 (4,7) ^a	47.1 (7,8) ^a
Negative control ^x	48.4 (10,1) ^a	33.1 (8,0) ^a	40.4 (11,3) ^a

Table 2 - Effect of propolis varnish (mean and standard deviation/M±SD) in the development of smooth surface caries and severity (E - enamel caries; Ds - slight dentinal caries; Dm - moderate dentinal caries; Dx - extensive dentinal caries) in rats using classification Keyes' modified by Larson.

Treatments	Smooth-surface caries			
	E (M±SD)	Ds (M±SD)	Dm (M±SD)	Dx (M±SD)
Propolis varnish	19,8 (1,5) ^b	13,4 (5,2) ^{b,c}	1,4 (1,4) ^a	0,1 (0,3) ^a
Positive control*	16,5 (1,6) ^b	10,3 (4,6) ^c	0,1 (0,4) ^b	0,0 ^a
Vehicle control**	33,5 (1,6) ^a	19,8 (5,9) ^a	1,2 (1,4) ^{a,b}	0,1 (0,3) ^a
Negative control ^x	28,3 (1,5) ^a	16,5 (4,5) ^{a,b}	1,1 (1,0) ^a	0,3 (0,6) ^a

Table 3 - Effect of propolis varnish (mean and standard deviation) in the development of sulcal caries and severity (E - enamel caries; Ds - slight dentinal caries; Dm - moderate dentinal caries; Dx - extensive dentinal caries) in rats using classification Keyes' modified by Larson.

Treatments	Sulcal caries			
	E (M±SD)	Ds (M±SD)	Dm (M±SD)	Dx (M±SD)
Propolis varnish	43,2 (6,5) ^a	34,6 (6,7) ^{a,b}	14,6 (4,6) ^b	6,4 (1,6) ^a
Positive control*	35,6 (6,0) ^a	21,0 (5,7) ^c	4,9 (3,2) ^c	2,8 (1,9) ^b
Vehicle control**	46,5 (4,0) ^a	40,0 (5,9) ^a	20,1 (4,2) ^a	7,5 (2,5) ^a
Negative control ^x	41,6 (5,3) ^a	34,1 (6,4) ^b	15,4 (4,2) ^{a,b}	6,0 (2,4) ^a

REFERENCES

Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C: The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ* 2005, 83:661-69.

Wolff D, Frese C, Maier-Kraus T, Krueger T, Wolff B: Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects. *Caries Res* DOI: 10.1159/000344022.

Beighton D: The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005; 33: 248–55.

Choi EJ, Lee SH, Kim YJ: Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent* DOI: 10.1111/j.1365-263X.2008.00942.x.

Head DA, Marsh PD, Devine DA: Non-lethal control of the cariogenic potential of an agent-based model for dental plaque. *PLoS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0105012.

Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. 2011: Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res* DOI: 10.1159/000327250.

Mishra BB, Tiwari VK: Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur J Med Chem* 2011; 46:4769-4807.

Libério SA, Pereira AL, Araújo MJ, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V, Ribeiro MN, Gonçalves AG, Guerra RN: The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol* DOI:10.1016/j.jep.2009.04.047.

Ikeno, K.; Ikeno, T.; Miyazawa, C: Effects of propolis in dental caries in rats. *Caries Res Basel* 1991;25: 347-351.

Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, et al.: The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol* 2006;51:15-22.

Kumar, LSV: Propolis in dentistry and oral cancer management. *N Am J Med Sci* 2014;6(6):250-9. DOI: 10.4103/1947-2714.134369.

Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Bowen WH, Ikegaki M, Cury JA: *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol* 2005 3;101(1-3):110-5.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A: Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res* 1999;33(5):393-400.

Petersson LG, Twetman S, Dahlgren H, Norlund A, Holm AK, Nordenram G, *et al.*: Professional fluoride varnish treatment for caries control: a systematic review of clinical trials. *Acta Odontol Scand* 2004;62(3):170-6.

Marinho VCC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* DOI: 10.1002/14651858.CD002279.pub2.

Jayabal J, Mahesh R: Current state of topical antimicrobial therapy in management of early childhood caries. *ISRN Dent* DOI: 10.1155/2014/762458.

De Luca MP, Franca JR, Macedo FA, Grenho L, Cortes ME, Faraco AA, Moreira AN, Santos VR: Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. *Biomed Res Int* 2014. DOI: 10.1155/2014/348647.

Keyes PH. Dental caries in the Syrian hamster. VIII. The induction of rampant caries activity in albino and golden animals. *J Dent Res* 1959;38:525-33.

Murata RM, Branco-de-Almeida LS, Franco EM, Yatsuda R, Santos MH, Alencar SM, Koo H, Rosalen PL: Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries *in vivo* by 7-epiclusianone and fluoride. *Biofouling* DOI:10.1080/08927014.2010.527435.

Bowen WH, Madison KM, Pearson SK: Influence of desalivation in rats on incidence of caries in intact cagemates. *J Dent Res* 1988;67:1316-18.

Larson RM. Merits and modifications of scoring rat dental caries by Keyes' method. In: *Animal Models in Cariology*. Washington DC, IRL Press, 1981.195-203.

Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta ML, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL: Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm *in vitro* and development of dental caries *in vivo*, *Biofouling* DOI: 10.1080/08927014.2013.834050.

Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH: Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(6):337-43.

Uysal T, Akkurtd MD, Amasyalic M, Ozcand S, Yagcie A, Basakf F, Sagdicg D. Does a chitosan-containing dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets? *Angle Orthod* DOI: 10.2319/062910-359.1.

Busscher HJ, Engels E, Dijkstra RJ, van der Mei HC: Influence of a chitosan on oral bacterial adhesion and growth *in vitro*. Eur J Oral Sci DOI: 10.1111/j.1600-0722.2008.00568.x.

No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int J Food Microbiol 2002;74:65-72.

Decker EM, Von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. J Periodont Res 2005; 40:373–377.

Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP: The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2005; 57(11):1666-91.

Chen CY, Chung YC: Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*. J Appl Oral Sci 2012;20(6):620-7.

Costa EM, Silva S, Tavaría FK, Pintado MM: Study of the effects of chitosan upon *Streptococcus mutans* adherence and biofilm formation. Anaerobe 2013; 20:27-31.

Costa EM, Silva S, Madureira AR, Cardelle-Cobas A, Tavaría FK, Pintado MM: A comprehensive study into the impact of a chitosan mouthwash upon oral microorganism's biofilm formation *in vitro*. Carbohydr Polym 2014;101: 1081–1086.

Dawes C, ten Cate JM: International symposium on fluorides: mechanisms of action and recommendations for use. J Dent Res 1990; 69:505–836.

Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, et al.: Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Braz J Microbiol 2013; 44(2):577-585.

Tulsani SG, Chikkanarasaiah N, Siddaiah SB, Krishnamurthy NH. The effect of Propolis and Xylitol chewing gums on salivary *Streptococcus mutans* count: A clinical trial. Indian J Dent Res 2014;25:737-41

5.2 ARTIGO 2

A avaliação do efeito do verniz na redução de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças de 8 a 11 anos foi realizada na cidade de Belo Horizonte-MG. A aplicação do verniz foi realizada na clínica de Odontopediatria da FO-UFMG e a inclusão na pesquisa foi feita a partir da assinatura do consentimento livre esclarecido (APÊNDICE 1). A pesquisa clínica seguiu a aplicação única do produto no início do tratamento, seguindo com coletas diárias até o 5º dia e no 10º, 15º e 30º dia após a aplicação do verniz. Neste artigo intitulado: “Evaluation of reduction in salivary levels of *Streptococcus mutans* after propolis varnish single application.”, comparamos a quantidade de SM na saliva e em biofilme em diferentes tempos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (parecer nº 168.394) (ANEXO B) e registrado na base de dados de ensaios clínicos (Clinical Trials ID: 10726612.8.0000.5149) (ANEXO C).

“Evaluation of reduction in salivary levels of *Streptococcus mutans* after propolis varnish single application”

Mariana Passos De Luca¹, Miriam Pimenta Parreira Vale¹, Patrícia Corrêa-Faria¹, Suzane Gonçalves Paixão¹, Vagner Rodrigues Santos²

¹ Department of Paediatric Dentistry and Orthodontics, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6.627, Pampulha, 31.270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

² Department of Oral Pathology and Oral Surgery, Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Av. Presidente Antônio Carlos, 6.627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Corresponding author:

Prof. Dr. Vagner Rodrigues Santos

Avenida Presidente Antônio Carlos 6627, 31.270-901 Belo Horizonte, MG,

Brazil. Tel: +55 31 34092497 / FAX: +55 31 34092430

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficacy of an experimental propolis varnish containing 15% of propolis ethanolic extract in reducing salivary levels of *Streptococcus mutans* (SM). Caries-free patients with age varying from 8 to 11 years were recruited from a preventive program of the pediatric dentistry clinic of UFMG. After profilaxis, propolis varnish was applied in all tooth surface and saliva samples were collected in regular times (Baseline/T0, 2nd day/T1, 3rd day/T2, 4th day/T3, 5th day/T4, 10th day/T5, 15th day/T6 and 30rd day/T7). At each sampling, subjects chewed a 1 cm piece of a sterilized latex tube to stimulate whole saliva, which was homogenized for 30 s and ten-fold serial dilutions in saline were plated in duplicate on a petri dish containing mitis-salivarius-bacitracin (MSB) agar. The plates were incubated at 37°C for 48 h. Colonies with typical morphology were counted and the number of CFU/mL was compared using independent sample test t. There was significant difference between T0 / T1 (baseline and 2nd day), and T1 / T7 (2nd day/30th day), but no difference was verified from the 4th day forward. Based on the results, the varnish enabled the maintainance of reduction of SM salivary levels for 3 days. If these findings would have impact in the incidence of caries is needed to be confirmed.

INTRODUCTION

Dental caries is a disease with identified etiology and able to be prevented and controlled (Pitts, 2004). It is proven that caries development is dependent on the stagnation of an organized biofilm on the dental surface, and its metabolic activity is the fuel for the development of this disease (Kidd, 2004; Hesse *et al.*, 2014). The predominance of bacteria with aciduric and acidogenic characteristics, using sucrose as a substrate for synthesis of exopolysaccharide, lead to the development of virulent biofilms on susceptible tooth surfaces (Bowen & Koo, 2011; Bueno-Silva *et al.*, 2013).

Many researches suggest that *Streptococcus mutans* (SM) are the major pathogens of human dental caries, often associated with the virulence of the biofilm (Jeon *et al.*, 2011). This bacteria is usually isolated from caries lesions and is generally used in animals experiments for induction of caries formation (Hamada & Slade, 1980; Loesche, 1986). In addition, SM has the ability to produce water-insoluble glucan, promoting its adhesion to the tooth surface and to other bacteria (Hamada & Slade, 1980; Takahashi & Nyvad, 2008).

Antimicrobial treatments have been an important part of preventive dentistry for a long time and often the main purpose of these treatments is the reduction of *Streptococcus mutans* in the oral cavity (Ekenbäck *et al.*, 2000). This bacteria is very sensitive in treatments with chlorhexidine, and the formulation as a varnish reduces its side effects and allows prolonged release of its components (Jentsch *et al.*, 2014).

Dental varnishes have been designed with the intention of being adhered to the tooth surface and thereby, through this intimate contact, enable the main active ingredient present in the formulation to be more easily incorporated, and maintain its activity for a longer period. These preparations differ in the polymeric matrix, pharmaceutical additives and therapeutical agents, being the most common fluoride and chlorhexidine (Steinberg *et al.*, 2001).

Other varnishes formulations can be found for preventive purposes (Steinberg *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2014). Here in Brazil, only fluoride varnishes are commercialized, although there is little evidence that fluoride at levels that can occur naturally in dental biofilms could significantly change the number or proportions of species found in this dynamic microbiome, not effectively addressing the infectious character of the disease (Killian *et al.*, 1979; Ekenbäck *et al.*, 2000; Bueno-Silva *et al.*, 2013).

Natural products are being tested as a potential source of new and active therapeutic agents (Newman & Cragg, 2012). Propolis is one of the main source of biologically active compounds that exhibit proven antimicrobial activity, with potential anti-biofilm and anticaries activities (Koo, *et al.* 2002; Bueno-Silva *et al.*, 2013). Although this product has shown promising results in studies *in vitro*, only a few studies were performed with the objective of evaluating its possible use in anti-biofilm and anticaries chemotherapy using a clinical treatment protocol *in vivo* (Jeon *et al.*, 2011). In this study, we have used propolis type 12, also known as "green propolis", found in southeastern Brazil (Park *et al.*, 2002; Bueno-Silva *et al.*, 2008).

Due to the paucity of studies in dental literature in this regard, this clinical study aimed to investigate the efficacy of an experimental varnish containing 15% of propolis type 12 (green propolis) ethanolic extract on the reduction of salivary levels of *Streptococcus mutans* in children for a 30 days period.

MATERIALS AND METHODS

The present study was approved by the ethics committee of Federal University of Minas Gerais (report n^o 168.394) and registered in Clinical Trials data base (ID: 10726612.8.0000.5149). This clinical study was conducted to evaluate the effect of propolis varnish application on *S. mutans* counts in saliva of children aged 8-11 years, from both genders, who were recruited from public shelters registered and attended by the project of prevention and oral health maintenance of UFMG, totaling 11 children. Those responsible for the shelters received an invitation letter explaining the purpose of the study and signed their informed consent. The inclusion criteria were: (i) children 8-11 years in mixed dentition, with at least eight permanent teeth, (ii) residing in the greater area of Belo Horizonte, MG (iii) good health condition and (iv) children not making use of mouthwashes or medications, especially antibiotics, until three weeks prior to the beginning of the experiment. Children with active caries lesions at the time of clinical examination were excluded from the study. The difference in the level of 'colony-forming units' (CFU) of *S. mutans* at different time intervals such as at the baseline, after 1 day to the 5th day, at the 10th day, at the 15th day and at the end of 30 days was compared.

Saliva samples were obtained from each individual initially prior to the start of the experiment to establish baseline SM levels. Volunteers were informed to refrain from oral hygiene procedures for 12 h prior to collection. The total volume of 360 µL of propolis varnish was applied in all tooth surfaces (volume set in a prior pilot study). At each sampling, subjects chewed a 1 cm piece of a sterilized latex tube to stimulate whole saliva, and the samples were collected in sterile bottles with no eating/drinking for two hours prior to the sampling. No transport medium was used as culturing was done within half an hour of collection of samples (Rupesh *et al.*, 2014). Stimulated saliva was homogenized in a Thermolyne mixer (Barnsted International, Dubuque, IA, USA) for 30 s and ten-fold serial dilutions in saline were plated in duplicate on a petri dish (Inlab, Diadema, SP, Brazil) containing mitis-salivarius-bacitracin (MSB) agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), by the drop-counting technique (Miles *et al.*, 1938). The plates were incubated in microaerophilic condition at 37°C for 48 h. Only colonies with typical morphology were counted and the number of CFU/ml of saliva was calculated by multiplying the colony count of each plate with its respective dilution factor (Tenuta *et al.*, 2003).

STATISTICAL ANALYSIS

All data were processed by the SPSS 19.0 software. The comparisons between groups with normal distribution were tested using independent sample t test, and the Wilcoxon test when the distribution was not normal (10th day). The level of significance considered for all tests was 5%. Results were also analyzed as the reduction in the number of SM colony forming units (CFU) in the baseline

(T0) and every other collection times (T1/2nd day; T2/3rd day; T3/4th day; T4/5th day; T5/10th day; T6/15th day; T7/30rd day). Percentage SM reduction was calculated based on the following formula: % MS = $[(MS\ T0 - MS\ Tj) / MST0 \times 100]$ (Lobo *et al.*, 2011).

RESULTS

No side-effects were described by children following topical application of propolis varnish. According to them, propolis varnish was adhered until toothbrushing, performed after 12 hours of varnish application as recommended by the researcher. Patients complained about the product taste, characterizing it as "very bitter", and burning sensation immediately after application. However, no damage to the intra-oral tissues was observed. No other specific complaints were reported.

Of the 11 participants of the study, 7 had a reduction of more than 90% of salivary SM relative to baseline in the second day (T1). However, the UFC/mL counts started increasing since the 3rd day after the varnish application in all patients (data not shown).

The results of the means and standard deviations, as well as the minimum and maximum values of UFC/mL counts in all collection times are shown in table 1. There was significant difference between T0 / T1 (baseline and 2nd day), and T1 / T7 (2nd day/30th day), but no difference was verified from the 4th day forward.

Table 1: Mutans streptococci colony forming units in saliva (Minimum/Maximum values; Mean; SD: standard deviation), in different collection times.

Collection times	Min-Max	Mean	SD
Baseline/T0	$4,6 \times 10^5 - 2,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$ ^a	514157.3
2 nd day /T1	$4,6 \times 10^4 - 5,9 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$ ^b	171976.4
3 rd day/T2	$6,2 \times 10^4 - 1,4 \times 10^6$	$6,9 \times 10^5$	579229.9
4 th day /T3	$6,2 \times 10^4 - 1,4 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$	607930.9
5 th day /T4	$9,3 \times 10^4 - 3,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	954887.9
10 th day /T5	$3,1 \times 10^4 - 7,9 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	2730566.5
15 th day /T6	$1,4 \times 10^6 - 2,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	431459.4
30 th day /T7	$8,1 \times 10^5 - 3,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$ ^c	840599.8

Means followed by different letters are statistically significant ($p < 0.05$). Different superscript letters show differences between the periods of saliva collection.

DISCUSSION

This study evaluated the efficacy of an experimental varnish containing 15% of propolis type 12 ethanolic extract in the reduction of *Streptococcus mutans* in saliva. Salivary levels of this bacterium are often related to the susceptibility of individuals to tooth decay, reflecting the composition of the oral microbiota, serving as a biomarker of its health and disease status (Guo & Shi,

2013; Gomes *et al.*, 2011). Many studies testing antimicrobial products in dentistry use this evidence to measure the efficacy of the product on the reduction of oral bacteria (Neturi *et al.*, 2014; Rupesh *et al.*, 2014; Anauate-Netto *et al.*, 2013; De Carli *et al.*, 2010).

Chlorhexidine is the gold standard antimicrobial agent against SM and dental caries, and its substantivity ensures a longer-lasting suppression of SM compared to other substances and forms of application. (George *et al.*, 2010; Jayaprakash *et al.*, 2010; Attin *et al.*, 2003). This might be due to the affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins, having an additional role in its retention in the oral cavity (Singh *et al.*, 2014). As a dental varnish, besides chlorhexidine side-effects were not reported, its antimicrobial activity remained for 30 days (George *et al.*, 2010). Propolis varnish had good results in the suppression of SM for 3 days, even with patients having brushed their teeth after 12 hours of application. As it does not have the ability to remain in the oral tissues, propolis could not maintain its antimicrobial activity for a longer period.

Prolonged decrease in SM levels following topical application of chlorhexidine varnish also depends upon its concentration. Studies evaluating concentrations between 10% and 50% concluded that 40% chlorhexidine varnish is the most effective against SM (Ribeiro *et al.*, 2007; Sandhan *et al.*, 1992; Schaeken *et al.*, 1991; Schaeken *et al.*, 1989). Our previous study has shown the varnish containing propolis ethanolic extract in a concentration of 15% had the best results when evaluated *in vitro* (De Luca *et al.*, 2014), reason why this concentration was chosen to be tested. Although we had promising results in the suppression of SM for 3 days, we might obtain better results by increasing the concentration of propolis in the varnish.

Fluoride varnish is a widely used strategy of topical fluoride application to control caries by increasing fluoride exposure in the oral biofilm, and effectively preventing dental caries, which is supported by robust scientific evidence from clinical trials (Agouropoulos *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014). Also, evidence shows that fluoride can affect both the adherence of cariogenic bacteria onto the tooth surface as the virulence of cariogenic biofilms. However, this activity cannot be sustained over time, maybe because salivary levels of fluoride after the application of fluoride varnishes returned to < 2 ppm, what might reduce effect of fluoride on bacterial growth. (Chau *et al.*, 2014). In this study, although we have not quantified the amount of propolis in patients saliva after applying the varnish, results showed that its antimicrobial effect remained active for at least 24 hours, returning to initial levels after the 3rd day in most of the patients.

Propolis is usually tested as ethanolic extracts, gels or mouthwashes on cariogenic bacteria (Libério *et al.*, 2009). Studies performed with human volunteers treated with propolis to reduce caries indicators have reached mean reductions 42% in salivary *Streptococcus mutans* counts of 10 volunteers after using mouth rinses with 10 mL of 0.2% propolis solution for 1.5 min. These inhibitory effects were observed 10 min after propolis application, and when saliva samples were cultured 1 h later, only a slight increase in the amount of *Streptococcus mutans* was observed (Steinberg *et al.*, 1996). Propolis varnish reduced in 90% de number of SM after one day, and there was no collection right

after the application because the varnish is released from the tooth surface when children starts to spit saliva, losing much of the applied volume and interfering in the saliva handling for cultivation on agar.

Koo *et al.* (2002) studied a propolis sample containing a high concentration of flavonoids in volunteers under conditions favoring plaque accumulation. They used 15ml of 3% (w/v) propolis in a hydro-alcoholic solution as mouth rinses for 1min, twice a day, for 3 days, and demonstrated significant reduction both in the plaque index (44.7%) and in the insoluble polysaccharide (61.7%). Other study with propolis produced by *Melipona fasciculata* bees was performed with individuals rinsing three times per day for 7 days with 3ml of an ethanolic extract of this propolis sample. A decrease in the number of SM was observed in 62% of saliva samples 1 h after the first mouth rinse and in 81% after 7 days of treatment (Duailibe *et al.*, 2007). These data suggest that when propolis is in continuous contact with oral tissues, it can suppress the number of cariogenic bacteria significantly, both plactonic or in biofilm. The polymeric base of this experimental varnish could have a crucial role in this regard because it enables the controlled release of propolis for a longer period. That could be unabled by the act of brushing the teeth after 12 hours of the application, what would happen in daily basis anyway.

Based on the results, according to the significant difference between the baseline (T0) and the 2nd day (T1), the varnish could suppress the levels of this bacteria for 3 days. If these findings would have impact in the incidence of caries is needed to be confirmed.

REFERENCES

- Pitts NB. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? *Caries Res.* 2004; 38:294–304.
- Kidd EA. How ‘clean’ must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004; 38:305–313.
- Hesse D, Bonifácio CC, Mendes FM, Braga MM, Imparato JCP, Raggio DP. Sealing versus partial caries removal in primary molars: a randomized clinical trial. *BMC Oral Health* 2014, 14:58. doi:10.1186/1472-6831-14-58
- Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011. 45:69–86.
- Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta ML, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo, *Biofouling* 2013; 29(10), 1233-1242, DOI: 10.1080/08927014.2013.834050.
- Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45:243–63.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 1980;44(2):331-84.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50(4):353-80.

Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. Caries Res. 2008;42:409–18. DOI: 10.1159/000159604

Ekenbäck SB, Linder LE, Lönnies H. effect of four dental varnishes on the colonization of cariogenic bacteria on exposed sound root surfaces. Caries Res. 2000;34:70–4.

Jentsch HFR, Eckert F-R, Eschrich K, Stratul S-I, Kneist S. Antibacterial action of Chlorhexidine/thymol containing varnishes in vitro and in vivo. Int J Dent Hygiene 12, 2014; 168–173. DOI: 10.1111/idh.12079.

Steinberg D, Moldovan M, Molunkandov M. Testing a degradable topical varnish of cetylpyridinium chloride in an experimental dental biofilm model. J Antimicrob Chemot. 2001;48:241-3.

Cardoso CA, de Castilho AR, Salomão PM, Costa EN, Magalhães AC, Buzalaf MA. Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro. J Dent. 2014;42(11):1495-501. DOI: 10.1016/j.jdent.2014.08.009.

Killian M, Thylstrup A, Fejerskov O: Predominant plaque flora of Tanzanian children exposed to high and low water fluoride concentrations. Caries Res. 1979;13:330–343.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod. 2012; 75:311–335.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. Antimicrob Agents Chemother. 46:1302–1309.

Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. J Agric Food Chem 2002;50: 2502- 2506.

Bueno-Silva B, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. eCAM 2008;5(3)313–316. DOI:10.1093/ecam/nem059

Tenuta LMA, Lima JEO, Cardoso CL, Tabchoury CPM, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition *in situ*. Pesqui Odontol Bras. 2003;17(4):326-31.

Lobo PL, Fonteles CS, de Carvalho CB, do Nascimento DF, da Cruz Fonseca SG, Jamaru FV, de Moraes ME. Dose-response evaluation of a novel essential oil against Mutans streptococci in vivo. Phytomedicine. 2011 May 15;18(7):551-6. doi: 10.1016/j.phymed.2010.10.018.

Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. J Calif Dent Assoc. 2013 Feb;41(2):107-9, 112-8.

Jiang EM, Lo ECM, Chu CH, Wong MCM. Prevention of early childhood caries (ECC) through parental toothbrushing training and fluoride varnish application: A 24-month randomized controlled trial. J Dent. 2014;42: 1543 – 50.

Gomes ALF, Silveira FD, Sá TNM, Pontes KMF, Turatti E, Santiago SL. Caries risk in children with and without immunodeficiency - a comparative study. Rev Bras Pesq Saúde. 2011; 13(2): 56-61.

Neturi RS, Srinivas R, Vikram Simha B, Sandhya Sree Y, Chandra shekar T, Siva Kumar P. Effects Of Green Tea On Streptococcus Mutans Counts – A Randomised Control Trial. J Clini Diagn Res. 2014; 8(11): 128-30.

Rupesh S, Winnier JJ, Nayak UA, Rao AP, Reddy NV, Peter J. Evaluation of the effects of manuka honey on salivary levels of mutans streptococci in children: A pilot study. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2014;32:212-9. DOI:10.4103/0970-4388.135827

Anauate-Netto C, Marcucci MC, Paulino N, Anido-Anido A, Amore R, de Mendonça S, Borelli Neto L, Bretz WA. Effects of typhified propolis on mutans streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. Braz Dent Sci. 2013;16(2):31-36.

De-Carli AD, Zárate-Pereira P, De-Carli G, Zafalon EJ, Zárate CBR, Yassumoto LM. The effect of *Apis mellifera* propolis associated with sodium fluoride on dental biofilm: randomized double-blind clinical trial. Rev Odontol Bras Central 2010;19(51).

George AM, Kalangi SK, Vasudevan M, Krishnaswamy NR. Chlorhexidine varnishes effectively inhibit Porphyromonas gingivalis and *Streptococcus mutans* - an *in vivo* study. J Indian Soc Periodontol. 2010;14(3):178-80. DOI: 10.4103/0972-124X.75913.

Jayaprakash R, Sharma A, Moses J. Comparative evaluation of the efficacy of different concentrations of chlorhexidine mouth rinses in reducing the mutans streptococci in saliva: an *in vivo* study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2010;28(3):162-6. DOI: 10.4103/0970-4388.73792.

Attin R, Tuna A, AttinT, Brunner E, Noack MJ. Efficacy of differently concentrated chlorhexidine varnishes in decreasing Mutans streptococci and lactobacilli counts. Arch Oral Biol 2003; 48: 503-9.

Singh H, Kapoor P, Dhillon J, Kaur M. Evaluation of three different concentrations of Chlorhexidine for their substantivity to human dentin. Indian J Dent. 2014; 5(4): 199–201. DOI: 10.4103/0975-962X.144726.

Ribeiro LGM, Hashizume LN, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. J Dent. 2007; 35: 359 – 70.

Sandham HJ, Nadeau L, Phillips HI. The effect of chlorhexidine varnish treatment on salivary mutans streptococcal levels in child orthodontic patients. *J Dent Res.* 1992;71:32–5.

Schaeken MJ, Schouten MJ, van den Kieboom CW, van der Hoeven JS. Influence of contact time and concentration of chlorhexidine varnish on mutans streptococci in interproximal dental plaque. *Caries Res.* 1991;25:292–5.

Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Hendriks JC. Effects of varnishes containing chlorhexidine on the human dental plaque flora. *J Dent Res.* 1989; 68:1786–9.

De Luca MP, Franca JR, Macedo FA, Grenho L, Cortes ME, Faraco AA, Moreira AN, Santos VR. Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. *Biomed Res Int.* 2014;2014:348647. DOI: 10.1155/2014/348647.

Agouropoulos A, Twetman S, Pandis N, Kavvadia K, Papagiannoulis L. Caries-preventive effectiveness of fluoride varnish as adjunct to oral health promotion and supervised toothbrushing in preschool children: a double-blind randomized controlled trial. *J Dent.* 2014;42(10):1277-83. DOI: 10.1016/j.jdent.2014.07.020.

Jiang EM, Lo EC, Chu CH, Wong MC. Prevention of early childhood caries (ECC) through parental toothbrushing training and fluoride varnish application: a 24-month randomized controlled trial. *J Dent.* 2014; 42(12):1543-50. DOI: 10.1016/j.jdent.2014.10.002.

Chau NP, Pandit S, Jung JE, Jeon JG. Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *J Dent.* 2014 Jun;42(6):726-34. DOI: 10.1016/j.jdent.2014.03.009.

Libério SA, Pereira AL, Araújo MJ, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V, Ribeiro MN, Gonçalves AG, Guerra RN. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(1):1-9. DOI: 10.1016/j.jep.2009.04.047.

Steinberg, D, Kaine, G, Gedalia, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am J Dent.* 1996;9: 236–39.

Duailibe, S.A., Gonçalves, AG, Ahid, FJ. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. *J Appl Oral Sci.* 2007;15, 420–3.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo dados de levantamentos epidemiológicos, os níveis de saúde bucal no Brasil melhoraram significativamente, saindo de uma condição de média prevalência de cárie em 2003 (CPO entre 2,7 e 4,4) para uma condição de baixa prevalência em 2010 (CPO entre 1,2 e 2,6) (SB BRASIL, 2012). O aumento da exposição das pessoas ao flúor, seja pela água de abastecimento ou dentifrícios fluoretados, atividades de promoção de saúde, melhoria nas condições de saúde geral e qualidade de vida e a mudança nos critérios de diagnóstico de cárie foram decisivos para que isso acontecesse (CARDOSO *et al.*, 2003). Ainda assim, algumas comunidades brasileiras não foram beneficiadas da mesma maneira por esse implemento na saúde bucal, justamente por não terem acesso a essas melhorias, tornando-se mais suscetíveis a níveis mais elevados da doença cárie (CARDOSO *et al.*, 2003).

Essas disparidades entre a experiência de cárie em crianças instigou a idealização de um novo material preventivo para uso profissional, com custo menor do que os similares encontrados no mercado, podendo ser uma nova alternativa na prevenção da cárie dentária. O verniz de própolis foi idealizado e testado, inicialmente, em diversas concentrações *in vitro*, sendo a concentração de 15% a que apresentou melhores resultados (De Luca *et al.*, 2014).

De acordo com isso, optou-se pela continuidade do estudo para verificar se o verniz seria efetivo em modelo animal de cárie dentária. O protocolo de aplicação única foi o escolhido para a realização do teste, assim como os outros materiais que serviriam como controle do experimento. O verniz de clorexidina era a opção mais indicada para ser o padrão-ouro do experimento por possuir propriedades antimicrobianas comprovadas em vários estudos (JULIANO *et al.*, 2008; GEORGE *et al.*, 2010; HARINI & ANEGUNDI, 2010; JAYAPRAKASH *et al.*, 2010 PAPAS *et al.*, 2012) e mais passível de comparação com a própolis. A sua não comercialização no Brasil dificultou seu emprego no estudo, por isso optou-se pelo verniz de flúor.

Os resultados do estudo em modelo animal mostraram que, em cárie de esmalte, o verniz de própolis teve atividade similar ao verniz de flúor. No entanto, à medida que a lesão se tornava mais severa, a atividade do verniz de própolis se tornou similar aos outros grupos. Uma das limitações deste estudo foi a ausência de teste de diferentes protocolos de aplicação do verniz. Como foi demonstrado, a própolis quando aplicada diariamente sobre a forma de extrato etanólico consegue diminuir a severidade de cárie em modelo animal, conquistando resultados similares aos obtidos com o grupo tratado com flúor a 225 ppm (BUENO-SILVA *et al.*, 2013). A aplicação diária do verniz de própolis não seria factível e nem se justificaria na prática clínica, principalmente em odontopediatria, porém, se tivéssemos testado protocolos semanais ou quinzenais poderíamos ter conseguido que a atividade antimicrobiana da própolis permanecesse por um período maior e assim, significativa redução da incidência de lesões cariosas.

Com posse dos resultados em modelo animal, optamos por testar o mesmo protocolo em crianças livres de cárie e com idade suficiente para reportar suas impressões sobre o verniz experimental. O resultado foi unânime: o gosto amargo do verniz de própolis e sua coloração esverdeada tornou-o um produto de difícil aceitação. Como ele foi idealizado para aplicação em pacientes infantis, é necessário que algumas mudanças sejam feitas em sua formulação. Apesar de alguns trabalhos relatarem o efeito sinérgico dos diversos componentes da própolis (ORSOLIC *et al.*, 2005; SFORCIN *et al.*, 2005), existem relatos de frações bioativas da própolis que, quando isoladas ou combinadas ao flúor potencializam os efeitos biológicos de ambos os produtos (KOO *et al.*, 2005), podendo ser uma alternativa futura ao aperfeiçoamento da formulação.

No estudo em modelo animal, a análise da microbiota e das lesões cariosas em um único momento, apenas no final do experimento, pode ser considerada uma limitação. Se as coletas para quantificação de *Streptococcus mutans* tivessem sido semanais, poderíamos ter obtido informações sobre a recuperação dos níveis iniciais desta bactéria no animal e assim, estabelecido um protocolo de reaplicação do verniz.

A inexistência de um grupo controle no estudo clínico e o baixo número amostral podem ser consideradas suas principais limitações. A comparação com outros vernizes, ou até mesmo com um grupo sem tratamento, tornaria os resultados mais consistentes, norteados futuras pesquisas clínicas com esse produto.

Embora os resultados desse trabalho não tenham confirmado os resultados obtidos *in vitro*, o verniz de própolis é um produto que merece mudanças em sua formulação. Novos testes são necessários para comparar a diminuição de *Streptococcus mutans* através de outros materiais, assim como o intervalo ideal de aplicação para manutenção de sua atividade biológica e no impacto na redução de cárie dentária.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Artigo 1

1. O verniz de própolis foi eficaz sobre lesões cariosas de esmalte.
2. O efeito do verniz de própolis na microbiota total e em *Streptococcus mutans* não teve diferença com outros grupos de comparação após 4 semanas de experimento.
3. Em termos de severidade, o verniz de flúor teve atividade superior quando comparado aos outros grupos.

Artigo 2

1. O verniz de própolis foi eficaz na redução dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* em crianças por um período de 3 dias após única aplicação do produto.
 2. Os indivíduos que receberam aplicação tópica do verniz de própolis não apresentaram efeitos colaterais.
-

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Ismail AI, Tellez M, Pitts NB, Ekstrand KR, Ricketts D, Longbottom C, Eggertsson H, Deery C, Fisher J, Young DA, Featherstone JD, Evans W, Zeller GG, Zero D, Martignon S, Fontana M, Zandona A. Caries management pathways preserve dental tissues and promote oral health. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013 Feb;41(1):e12-40. DOI: 10.1111/cdoe.12024.

Hesse D, Bonifácio CC, Mendes FM, Braga MM, Imparato JC, Raggio DP. Sealing versus partial caries removal in primary molars: a randomized clinical trial. *BMC Oral Health.* 2014 May 28;14:58. DOI: 10.1186/1472-6831-14-58.

Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008;42(6):409-18. DOI: 10.1159/000159604.

Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta ML, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. *Biofouling.* 2013;29(10):1233-42. DOI: 10.1080/08927014.2013.834050.

Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2013 Feb;41(2):107-9, 112-8.

Segura A, Boulter S, Clark M, Gereige R, Krol DM, Mouradian W, Quinonez R, Ramos-Gomez F, Slayton R, Keels MA. Section on Oral Health. Maintaining and improving the oral health of young children. *Pediatrics.* 2014 Dec;134(6):1224-9. doi: 10.1542/peds.2014-2984.

Borges BC, De Souza Borges J, De Araujo LS, Machado CT, Dos Santos, AJ, De Assunção Pinheiro IV. Update on nonsurgical, ultraconservative approaches to treat effectively non-cavitated caries lesions in permanent teeth. *Eur J Dent.* 2011 Apr;5(2):229-36.

Marechal M. Chemical control of plaque: comparative review. *Rev Belge Med Dent.* 1991; 46: 51–58.

Ferreira JM, Aragão AK, Rosa AD, Sampaio FC, Menezes VA. Therapeutic effect of two fluoride varnishes on white spot lesions: a randomized clinical trial. *Braz Oral Res.* 2009 Oct-Dec;23(4):446-51.

Furiga A, Roques C, Badet C. Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria. *J Appl Microbiol.* 2014 Apr;116(4):761-71. DOI: 10.1111/jam.12395.

Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Mar;4(3):206-20.

Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011;45(3):243-63. DOI: 10.1159/000327250.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 2012 Mar 23;75(3):311-35. DOI: 10.1021/np200906s.

Butler MS. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep.* 2005. 22:162–195.

Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50,2502–2506.

Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008 Sep;5(3):313-6. doi: 10.1093/ecam/nem059.

Hayacibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Bowen WH, Ikegaki M, Cury JA. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol.* 2005 Oct 3;101(1-3):110-5.

Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis in dental caries in rats. *Caries Res Basel* 1991; 25: 347-351.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res.* 1999 Sep-Oct;33(5):393-400.

Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, Rehder VL, Sartoratto A, Ikegaki M, Koo H. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol.* 2006 Jan;51(1):15-22.

Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006; 31:603–632.

Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci.* 2009; 34: 641–78.

Liu H, Chen B, Mao Z, Gao C. Chitosan nanoparticles for loading of toothpaste actives and adhesion on tooth analogs. *J Appl Polym Sci.* 2007;106: 4248–56.

De Luca MP, Franca JR, Macedo FA, Grenho L, Cortes ME, Faraco AA, Moreira AN, Santos VR: Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. *Biomed Res Int* DOI: 10.1155/2014/348647.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Projeto SB Brasil 2010: Resultados Principais*. Brasília: MS; 2012.

Cardoso L., Rösing C., Kramer P., Costa CC., Costa-Filho LC. Polarization of dental caries in a Brazilian city without fluoridated water. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(1): 237-243.

Juliano C, Cossu M, Pigozzi P, Rasso G, Giunchedi P. Preparation, *in vitro* characterization and preliminary *in vivo* evaluation of buccal polymeric films containing chlorhexidine. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(4):1153-8. DOI: 10.1208/s12249-008-9153-6.

George AM, Kalangi SK, Vasudevan M, Krishnaswamy NR. Chlorhexidine varnishes effectively inhibit *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans* - an *in vivo* study. *J Indian Soc Periodontol*. 2010;14(3):178-80. DOI: 10.4103/0972-124X.75913.

Harini PM, Aneundi RT. Efficacy of a probiotic and chlorhexidine mouth rinses: a short-term clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2010;28(3):179-82. DOI: 10.4103/0970-4388.73799.

Jayaprakash R, Sharma A, Moses J. Comparative evaluation of the efficacy of different concentrations of chlorhexidine mouth rinses in reducing the mutans streptococci in saliva: an *in vivo* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2010;28(3):162-6. DOI: 10.4103/0970-4388.73792.

Papas AS, Vollmer WM, Gullion CM, Bader J, Laws R, Fellows J, Hollis JF, Maupomé G, Singh ML, Snyder J, Blanchard P. Efficacy of chlorhexidine varnish for the prevention of adult caries: a randomized trial. *J Dent Res*. 2012;91(2):150-5. DOI: 10.1177/0022034511424154.

Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta ML, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm *in vitro* and development of dental caries *in vivo*, *Biofouling* 2013; 29(10), 1233-1242, DOI: 10.1080/08927014.2013.834050.

Orsolić N, Kosalec I, Basić I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(4):694-700.

Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J Ethnopharmacol*. 2005 Apr 26;98(3):301-5.

Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Nov;52(5):782-9.

ANEXO A: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNICAMP.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Eficácia de verniz de própolis verde sobre cárie em ratas" (protocolo nº 3142-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen / Mariana Passos De Luca, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 12 de agosto de 2013.

Campinas, 12 de agosto de 2013.

Handwritten signature of Ana Maria A. Guaraldo in blue ink.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Handwritten signature of Fátima Alonso in blue ink.

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO C: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Eficácia de verniz contendo própolis verde e quitosana no controle do biofilme dental: estudo de fase II

Pesquisador: Vagner Rodrigues Santos

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 10726612.8.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia (UFMG)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 168.394

Data da Relatoria: 04/12/2012

Apresentação do Projeto:

Projeto da Faculdade de Odontologia da UFMG, para obtenção de título de doutorado, intitulado: Eficácia de verniz contendo própolis verde e quitosana no controle do biofilme dental, fase II.

A cárie dentária é uma doença multifatorial que acomete principalmente adolescentes e crianças. Os antimicrobianos são substâncias utilizadas na Odontologia como uma forma eficiente de combate às cáries. Substâncias como a clorexidina são as mais conhecidas e mais aplicadas para esse fim e, na forma de verniz, aumentam seu potencial anticariogênico por permanecerem mais tempo em contato com a superfície dentária, facilitando sua incorporação.

Os efeitos antimicrobianos das substâncias naturais também estão sendo estudados por exibirem propriedades antimicrobianas semelhantes àquelas da clorexidina, porém menos tóxicos.

A própolis possui efeito comprovado contra diversos microorganismos da cavidade bucal, especificamente contra os Estreptococos do grupo mutans, um dos principais microorganismos causadores da cárie dentária.

Uma formulação farmacêutica contendo própolis foi desenvolvida tendo como base o polímero quitosana, que é biocompatível e biodegradável. Em estudo anterior, observou-se in vitro as propriedades antimicrobianas do verniz contra Streptococcus mutans.

Este trabalho objetiva estudar as evidências preliminares da eficácia do verniz para uso

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945

Fax: 3134-0945

E-mail: coep@prpq.ufmg.br, coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



odontológico contendo 15% de própolis verde no controle do biofilme dental in vivo num estudo de fase II abrangendo pacientes de 8 a 10 anos.

Objetivo da Pesquisa:

Metodologia:

Este será um ensaio clínico de fase II, em que o verniz de própolis verde e quitosana terá sua eficácia avaliada individualmente, sem grupos de comparação.

As crianças de 8 a 10 anos que participarão do estudo serão pareadas de acordo com a idade e o gênero.

Serão selecionados 30 pacientes voluntários.

Crítérios de Inclusão:

Crianças de 8 a 10 anos na dentição mista, com no mínimo oito dentes permanentes

Pacientes residentes na cidade de Belo Horizonte

Pacientes da Clínica de Odontopediatria, Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (FOUFMG)

Boa condição geral de saúde.

Pacientes que não estejam fazendo uso de enxaguantes ou medicamentos, principalmente antibióticos, até as três semanas anteriores ao início do experimento.

Crítérios de Exclusão:

Pacientes em tratamento médico ou que fizeram uso de medicamentos, principalmente antibióticos, nas três semanas anteriores.

Pacientes que apresentem lesão de cárie ativa.

Procedimentos da Pesquisa:

Exame clínico para avaliar presença de cárie ativa e experiência de cárie.

A experiência de cárie será aferida pelos critérios da OMS, de acordo com o índice CPO-d. Será aplicado questionário sobre a história médica da criança e sua saúde bucal.

1. Índice de placa visível e Índice de sangramento gengival.

O índice de placa visível (IPV) e o índice de sangramento gengival serão

coletados no momento do exame clínico e a cada retorno do paciente, após 30, 60 e 90 dias.

No IPV, observa-se a placa visível por dente percorrendo-o com o auxílio da sonda periodontal de forma suave. Os resultados são colocados como número de dentes afetados pelo número de dentes examinados.

No ISG, percorre-se a sonda periodontal suavemente no sulco gengival de todos os dentes

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945 **Fax:** 3134-0945 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br, coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



presentes e observa-se se houve ou não sangramento.

Os resultados são colocados como número de dentes afetados em porcentagem pelo número de dentes examinados.

2. Análise salivar. Logo após o exame clínico inicial, será colhida saliva do paciente. A análise salivar tem como objetivo quantificar *Streptococcus mutans* presentes na saliva, antes da aplicação do verniz (baseline) e em períodos pré-determinados.

Após 24 horas, o paciente retornará à clínica para nova coleta de saliva, assim como nos 30, 60 e 90 dias subsequentes.

A metodologia da coleta de saliva obedecerá às normas do fabricante do Dentocult SM.

A contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) será classificada de 0 a 3.

A amostra de saliva de cada paciente, coletada em recipientes estéreis, será submetida à avaliação de capacidade tampão através de tiras indicadoras de pH.

As amostras de biofilme dental serão coletadas com a finalidade de se verificar a presença e a quantidade de *Streptococcus mutans* presente antes e durante todo o tratamento com o verniz, como padrão de comparação.

Uma pequena amostra de placa supragengival da face vestibular de um dos primeiros molares superiores será coletada com explorador estéril. Essa amostra será pesada com uma micro-balança e será armazenada em eppendorfs contendo solução salina e mantida a -20°C até análise posterior em real-time PCR.

3. Real - time PCR: O DNA das bactérias será extraído de um pellet obtido por centrifugação de 10mL de uma cultura overnight de amostra de placa usando G-spin Genomic DNA Extraction Kit. Mais de dez diluições da suspensão bacteriana serão realizadas em série, sendo todas elas contadas através do uso de câmaras Petroff-Hausser. Para gerar uma curva-padrão para o real-time PCR. O DNA bacteriano será extraído das diluições e a concentração será ajustada.

4. Protocolo de aplicação do verniz: A aplicação do verniz se iniciará após a coleta de saliva e de biofilme dental. O protocolo de aplicação dos vernizes será: profilaxia com pedra-pomes e água, isolamento relativo dos dentes com algodão e secagem com ar comprimido. Aplicação do verniz com microbrush em todas as superfícies visíveis dos dentes do paciente. Este será orientado a não escovar os dentes durante as próximas 12 horas e comer alimentos macios durante esse período.

Objetivo Primário:

Avaliar a eficácia de um verniz contendo própolis verde, em inibir a formação do biofilme dental, em pacientes com idades variando entre oito e dez anos.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S1 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945 **Fax:** 3134-0945 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br, coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Objetivos Secundários:

1. Analisar a saliva de crianças de 8 a 10 anos de idade quanto ao número de microorganismos cariogênicos antes (baseline) e após 30, 60 e 90 dias após a aplicação do verniz contendo própolis.
2. Avaliar a eficácia de verniz contendo própolis verde no controle do biofilme dental em crianças no período de 90 dias após a aplicação inicial.
3. Avaliar possíveis efeitos indesejáveis nos tecidos moles e duros da cavidade bucal de crianças de 8 a 10 anos de idade, durante e após o uso de verniz contendo própolis verde no período de 90 dias após a aplicação.
4. Avaliar o grau de confiança e aceitabilidade do produto pelas crianças incluídas no estudo, durante o uso de verniz contendo própolis verde.
5. Avaliar a adesividade dos pacientes ao programa de controle de biofilme dental, durante o uso de verniz contendo própolis verde durante 90 dias.

Duração: Fevereiro de 2013 a Junho de 2015

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Citando o projeto

"Riscos:

O verniz de própolis verde pode se mostrar ineficaz na redução de microorganismos cariogênicos na saliva e no biofilme".

"Benefícios:

O verniz de própolis verde pode ter grande eficácia na redução de microorganismos cariogênicos na saliva e no biofilme, possibilitando sua aplicação no combate à cárie dentária".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto meritório. Metodologia pertinente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto assinada pelo pesquisador e diretor da fac. de odontologia, UFMG.

Termo de Compromisso- Resolução 196

Parecer Consubstanciado da Camara Departamental

Projeto detalhado

TCLE: Modificado apos Diligencia Previa do CEP

Compromisso de sigilo e confidencialidade

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: 3134-0945 **Fax:** 3134-0945 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br, coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Orçamento : 12.000,00 reais a serem custeados, segundo pesquisadores, pela Fac. de Odontologia.
Cronograma

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

TCLE modificado Pos-Diligencia do CEP.

SMJ, Projeto Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 11 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: 3134-0945 **Fax:** 3134-0945 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br, coep@reitoria.ufmg.br

ANEXO D: REGISTRO DA PESQUISA NA PLATAFORMA DE ENSAIOS CLÍNICOS CLINICAL TRIALS.GOV

ClinicalTrials.gov PRS
Protocol Registration and Results System



ClinicalTrials.gov Protocol and Results Registration System (PRS) Receipt
Release Date: 08/11/2014

Efficacy of Propolis Varnish Against Oral Biofilm

This study is not yet open for participant recruitment.

Verified by Mariana Passos De Luca, Federal University of Minas Gerais, August 2014

Sponsor:	Federal University of Minas Gerais
Collaborators:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Information provided by (Responsible Party):	Mariana Passos De Luca, Federal University of Minas Gerais
ClinicalTrials.gov Identifier:	NCT02052973

► Purpose

This study aims to evaluate the effectiveness of a varnish containing 15% of green propolis on Streptococcus mutans in saliva and biofilm. Will be invited to join the study: children 8-10 years old, free of caries, without orthodontic appliances and without having undergone antibiotic therapy until three weeks before the start of the study. Saliva will be collected before, immediately after, 24 hours and 30 days after application of the varnish. The collection of biofilm will be performed before, after, 24 hours and 30 days after application of the varnish. Data will be collected and compared between periods.

Condition	Intervention	Phase
Streptococcal Infections Saliva Altered	Propolis varnish	Phase 1

Study Type: Interventional

Study Design: Prevention, Single Group Assignment, Open Label, N/A, Efficacy Study

Official Title: Efficacy of Brazilian Green Propolis Varnish Against Streptococcus Mutans in Saliva and Oral Biofilm: a Phase II Study.

Further study details as provided by Mariana Passos De Luca, Federal University of Minas Gerais:

Primary Outcome Measure:

- Streptococcus mutans in saliva and in tooth biofilm [Time Frame: 30 days] [Designated as safety issue: Yes]

Secondary Outcome Measures:

- Caries incidence reduction [Time Frame: Up to 24 months] [Designated as safety issue: Yes]

Estimated Enrollment: 15

Study Start Date: September 2014

Estimated Primary Completion Date: October 2014
 Estimated Study Completion Date: November 2014

Arms	Assigned Interventions
Experimental: Propolis varnish Saliva and oral biofilm will be collected before and in regular times after the application of the propolis varnish. This data will be compared in order to evaluate the probable reduction of Streptococcus mutans in saliva and oral biofilm.	Propolis varnish Saliva and oral biofilm will be collected before and in regular times after the application of the propolis varnish. This data will be compared in order to evaluate the probable reduction of Streptococcus mutans in saliva and oral biofilm.

Detailed Description:

Antimicrobials are substances used in dentistry as an efficient way of caries prevention. Substances such as chlorhexidine are the most known and most applied for this purpose and, as a varnish, increased its anticariogenic potential. The antimicrobial effects of natural substances are being studied for exhibiting antimicrobial properties similar to those of chlorhexidine, but less toxic in some cases. Several studies with propolis has proven its efficacy against several microorganisms of the oral cavity, specially Streptococcus mutans. A pharmaceutical formulation containing brazilian green propolis was developed based on the chitosan polymer that is biocompatible and biodegradable. In a previous study, we observed in vitro antimicrobial properties of the varnish against Streptococcus mutans. This work aims to study the preliminary evidence of the efficacy of the propolis dental varnish in reducing Streptococcus mutans in saliva and in the biofilm control through a phase II study involving patients with 8-10 years. After 30 days, the results will be compared and statistically analyzed at a level of significance of 5 % .

► Eligibility

Ages Eligible for Study: 8 Years to 10 Years
 Genders Eligible for Study: Both
 Accepts Healthy Volunteers: Yes

Criteria

Inclusion Criteria:

- children 8-10 years old
- good general health condition
- not making use of mouthwashes or medications (especially antibiotics), until three weeks prior to the beginning of the experiment.

Exclusion Criteria:

- Patients in medical treatment or who used drugs (especially antibiotics), in the three previous weeks and patients with active caries lesions.

► Contacts and Locations

Contacts

Mariana P De Luca, DDs, MSc	55 31 8467-5371	delucamariana@hotmail.com
Vagner R Santos, PHD	55 31 3409-2497	vegner2003@yahoo.com.br

Investigators

Principal Investigator:	Mariana P De Luca, DDs MSc	UFMG
-------------------------	----------------------------	------

► More Information

Responsible Party: Mariana Passos De Luca, DDS, MSc, PhD student, Federal
University of Minas Gerais
Study ID Numbers: 10726612.8.0000.5149
Health Authority: Brazil: National Committee of Ethics in Research

APÊNDICE 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça à pesquisadora que explique as palavras ou informações que você não tenha entendido completamente.

A criança está sendo convidada a participar da pesquisa denominada: **“Eficácia de verniz contendo própolis verde e quitosana no controle do biofilme dental: estudo de fase II.”**, a ser executada pela cirurgiã-dentista Mariana Passos De Luca, pelo Professor Vagner Rodrigues Santos e sua equipe e pela Professora Miriam Pimenta Parreira do Vale, na Faculdade de Odontologia da UFMG, em Belo Horizonte, e que fará parte de sua Tese de Doutorado.

Esta pesquisa tem como objetivo verificar a eficácia de um verniz odontológico contendo 15% de própolis, no controle de biofilme dental em pacientes assistidos durante 30 dias.

A sua participação constará em:

- Responder perguntas a respeito de sua condição de saúde e hábitos de higiene da boca da criança.
- Participar de um estudo no qual será aplicado um verniz odontológico a base de própolis, comparecendo a Faculdade de Odontologia da UFMG para a primeira aplicação e, depois disso, a coleta será feita em domicílio após 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 30 dias, completando o período de um mês de acompanhamento para ser examinado e avaliado quanto a sua saúde bucal e, também, para observações de alterações de tecidos moles e duros e presença de reações adversas. No primeiro momento, será feita a profilaxia completa da cavidade bucal, incluindo raspagem supragengival, remoção de cálculos, polimento coronário e remoção completa da placa.
- O verniz odontológico de própolis verde e quitosana possui coloração verde-clara e ficará aderido ao dente da criança apenas enquanto ela não escovar os dentes. A mudança de cor não será definitiva, pois o produto sai com escovação.
- Você será orientado sobre como deverá fazer a sua escovação e como deverá proceder após a aplicação do produto (também, serão entregues orientações impressas). Os procedimentos em boca serão realizados com instrumentos esterilizados. O polimento dos dentes será feito com pastas profiláticas e taças de borrachas ou escovinhas que são acionadas através de um motor de baixa rotação. Será observado o grau de cooperação da criança em relação ao seguimento das instruções.
- Fotografias do interior da boca poderão ser realizadas, constituindo propriedade exclusiva dos pesquisadores, aos quais serão dados plenos direitos de retenção e uso para quaisquer fins de ensino e divulgação, preservado o direito de não-identificação (o rosto da criança não aparecerá).

Há a possibilidade de ocorrer durante a profilaxia um pequeno sangramento gengival. As consultas, os exames e os procedimentos relacionados ao estudo serão inteiramente gratuitos e você não receberá nenhum pagamento pela sua participação.

Pode surgir alguma alteração na cavidade bucal durante o uso do produto, nesse caso, o seu uso será suspenso e a faculdade fará o tratamento de tal alteração.

A sua participação neste estudo é completamente voluntária e você tem o direito de não aceitar ou desistir do mesmo a qualquer momento, sem prejuízo ou perdas de benefícios a que tenha direito. As informações obtidas da coleta dos dados da criança

são confidenciais. É importante que você se disponha a comunicar eventuais mudanças de endereço e telefone.

Você também poderá ser desligado(a) do estudo a qualquer momento, sem o seu consentimento, nas seguintes situações: caso você não siga as orientações e não siga corretamente as instruções após a aplicação do verniz ou em caso do estudo ser suspenso ou concluído.

Você poderá fazer perguntas a qualquer momento do estudo e obter explicações com Mariana Passos De Luca nos telefones (31)3409-2497/8467-5371. Em caso de dúvidas em relação aos seus direitos como participante desta pesquisa, você poderá entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, situado na Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II – 2º andar – sala 2005 (UFMG – Campus Pampulha), ou através do número 3409-4592.**

Declaro que tive tempo de ler as informações contidas neste documento antes de assiná-lo e declaro que fui informado(a) sobre os métodos do estudo, as inconveniências, riscos, benefícios e eventos adversos que podem vir a ocorrer em consequência dos procedimentos. Autorizo a realização de exame clínico odontológico não invasivo, segundo critérios convencionais e universais de biossegurança.

Declaro, também, que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar como paciente neste estudo.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__.

Nome do(a) participante (letra de forma) e RG

Assinatura do(a) participante

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos e benefícios da participação no mesmo, junto ao (à) participante e/ ou representante legal. Acredito que forneci todas as informações necessárias, em linguagem adequada e compreensível.

Assinatura da pesquisadora

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

RESUMOS:

DE LUCA MP, GALA-GARCIA A, CORRÊA-FARIA P, VALE MP, SANTOS VR. Evaluaciones periodicas del efecto antibacteriano de un barniz hecho de propoleo contra *Streptococcus mutans* en niños de 8 a 10 años. In: Encuentro científico internacional de verano (ECI 2015v) 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

DE LUCA MP, CORRÊA-FARIA P, VALE MP, SANTOS VR. Análise da redução de *Streptococcus mutans* após aplicação de verniz à base de própolis. In: XII Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2014, Belo Horizonte. Arquivos em Odontologia - XII Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG, 2014. v. 50. p. 9.

LUCA MP, FREIRE-MAIA FB, SARDENBERG F, AUAD SM, VALE MPP, PAIVA SM, PORDEUS IA. Prevalência de traumatismo dentário e determinantes sociais em crianças de 8 a 10 anos de idade na cidade de Belo Horizonte. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2013, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research (Proceedings of the 30th SBPqO Annual Meeting), 2013.

GONÇALVES SP, CORRÊA-FARIA P, **DE LUCA MP**, MARQUES LS, RAMOS-JORGE ML. Número de dentes decíduos erupcionados em crianças brasileiras: fatores associados. In: Congresso Odontológico do Jubileu de Ouro da UEL e 10 Encontro Nacional de Odontologia para Bebês, 2012, Londrina, PR. Anais [do] Congresso Odontológico do Jubileu de Ouro da UEL e 10 Encontro Nacional de Odontologia para Bebês, 2012.

DE LUCA MP, FERNANDES MLMF. Conhecimentos e práticas em saúde bucal de avós. In: 43º Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria, 2012, Campos do Jordão. Anais Grupo 2012.

SANTOS VR, **LUCA MP**, CORTES ME, MOREIRA AN, FRANCA JR, FARACO AAG. Characterization and *in vitro* evaluation of a new chitosan-based propolis tooth varnish.. In: 59th. International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Products Research, 2011, Antalya/Turquia. Planta Medica Journal of Medicinal Plant and Natural Products Research. New York/USA, 2011. v. 12. p. 1282.

LUCA MP, FRANCA JR, MACEDO FAFF, Cortes ME, FARACO AAG, SANTOS VR. Avaliação *in vitro* de verniz polimérico de própolis verde e quitosana. In: 28ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2011, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research (Impresso). São Paulo/SP: Brazilian Oral Research, 2011. v. 25. p. 363.

PUBLICAÇÕES:

DE LUCA MP. FRANCA, JR, MACEDO FAFF, GRENHO L, CORTES ME, FARACO AAG, MOREIRA AN, SANTOS VR. Propolis Varnish: Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria, Cytotoxicity, and Sustained-Release Profile. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-6, 2014.

FRANCA, JUÇARA R. ; **DE LUCA, M.P.** ; RIBEIRO, TG ; CASTILHO, R. O. ; MOREIRA, A. N. ; FARACO, A. A. G. ; SANTOS, V. R. Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine (Online)*, v. 14, p. 478, 2014.

SILVA, J. L. C. ; SILVA, F.F. ; SOUZA, T. F. M. ; GENEROSO, W. G. ; Noronha, VRAS ; PEREIRA, E.M.R. ; **DE LUCA, M.P.** ; ABREU, S. L. R. ; SANTOS, V.R. . Synergic effect of associated green, red and brown Brazilian propolis extract onto *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 7, p. 2006-2010, 2013.

CURSOS:

Planejamento Do Ensino Superior. UFMG (2012)

Avaliação Da Aprendizagem No Ensino Superior. UFMG (2012)

Formação Em Docência Do Ensino Superior. UFMG (2012)

II Fórum Em Docência Do Ensino Superior. UFMG (2012)

Workshop Sobre Patrimônio Genético E Conhecimento. UFMG (2012)

Matriz Extracelular Bacteriana E Virulência Em Biofilme. UNICAMP (2012)