

Mariana Passos De Luca

**VERNIZ À BASE DE QUITOSANA
CONTENDO PRÓPOLIS VERDE
BRASILEIRA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, CITOTOXICIDADE E
PERFIL DE LIBERAÇÃO.**

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
2011**

Mariana Passos De Luca

**VERNIZ À BASE DE QUITOSANA
CONTENDO PRÓPOLIS VERDE
BRASILEIRA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA, CITOTOXICIDADE E
PERFIL DE LIBERAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Vagner Rodrigues Santos

Co-orientador: Prof. Allyson Nogueira Moreira

Faculdade de Odontologia - UFMG
Belo Horizonte
2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família:

Aos meus pais, Aldo De Luca e Marilsa Duarte Passos De Luca, meus verdadeiros mestres, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim,

Ao meu marido, Paulo Christiano de Anchieta Garcia, que me ajudou direta e indiretamente,

À minha filha, Isabela De Luca Garcia, razão pela qual tento ser melhor a cada dia.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não teria sido possível se algumas pessoas não tivessem percorrido esse caminho junto comigo.

Ao Prof. Dr. Vagner Rodrigues Santos, a primeira pessoa que me recebeu na UFMG, em seu laboratório, interessado nas minhas idéias e envolvido diretamente neste trabalho. Agradeço profundamente sua dedicação!

Ao Prof. Dr. Allyson Nogueira Moreira, co-orientador da dissertação pela amizade, ajuda e questionamentos pertinentes durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Augusto Gomes Faraco, colaborador deste trabalho, peça chave no desenvolvimento do verniz.

À Juçara Ribeiro Franca, farmacêutica responsável pelo desenvolvimento do produto, incansável, brilhante, amiga.

À Elizete Maria Rita Pereira pela amizade, apoio e por ter me acompanhado desde os primeiros momentos no Laboratório de Microbiologia e por ter me ajudado em vários momentos difíceis do mestrado.

Ao Filipe Macedo pela grande ajuda nos testes de citotoxicidade e análise dos dados.

À Profa. Maria Esperanza Cortés Segura pela ajuda com os testes de citotoxicidade, doação de células, dentes bovinos e microorganismos para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Dr. Rubén Sinisterra do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais da Faculdade de Química da UFMG, por ter autorizado a realização dos testes de citotoxicidade em seu laboratório.

À Profa. Dra. Claudia Silami de Magalhães pela ajuda no trabalho e na gentil doação de instrumentos para realizar o corte dos dentes.

À Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes pela gentil doação de células para a realização do teste de citotoxicidade.

À Técnica do Laboratório de Microbiologia Silvana Maria de Souza, que me ajudou muito dando suporte técnico no ambiente do laboratório.

Ao Técnico do Laboratório de Dentística Restauradora Bruno Ferreira Lourenço.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FAFAR/UFMG.

Ao pessoal do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais da Faculdade de Química da UFMG: Karina, Kelen, Ivana, Sávio e todos aqueles que me ajudaram no teste de citotoxicidade.

Aos alunos da iniciação científica do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Aos amigos Fernanda, Adriana, Gustavo, Alfonso, Patrícia, Thalyta, Cláudia. A companhia de vocês deixou esse caminho mais fácil de ser percorrido.

Aos amigos do Laboratório de Herpetologia do ICB/UFMG pela descontração e por terem me aturado ocupando o lugar de vocês.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura molecular da quitosana	22
FIGURA 2	Estrutura molecular da quitina	22
FIGURA 3	Abelha <i>Apis mellifera</i> sobre a folha de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	24
FIGURA 4	Extrato etanólico de própolis verde (Pharmanéctar®, lote PAE0509).	35
FIGURA 5	A) Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 15% (verniz A); B) Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 10% (verniz B); C) Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 5% (verniz C).	37
FIGURA 6	D) Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 7,5% (verniz D); E) Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 5% (verniz E).	38
FIGURA 7	F) Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 10% (verniz F); G) Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 5% (verniz G);	39
FIGURA 8	Aspecto macroscópico do verniz base contendo quitosana homogeneizado após 24 horas.	40
FIGURA 9	A) Posicionamento dos discos de celulose em placa de silicone; (B) Posicionamento da placa de silicone perfurada sob os discos de celulose; (C) Espatulação do verniz em placas perfuradas de silicone.	41
FIGURA 10	Aspecto dos corpos de prova prontos para teste	42
FIGURA 11	A) Imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura em dentes bovinos contendo verniz de própolis verde e quitosana. B) Aumento da região aonde foi aplicado o verniz	44

FIGURA 12	Curva analítica obtida para quantificação de flavonóides totais em termos de quercetina, em solução de etanol/ácido acético (50:50).	49
FIGURA 13	Curva analítica obtida para quantificação de flavonóides totais em termos de quercetina, em solução de etanol/água (20: 80).	50
FIGURA 14	Dentes bovinos contendo vernizes aplicados e secos	52
FIGURA 15	Teste de susceptibilidade antimicrobiana a <i>Streptococcus sanguinis</i> a vernizes de quitosana contendo própolis e vernizes controles. Teste de difusão em ágar. Halos de inibição após 24 (A) e 48 horas (B).	54
FIGURA 16	Número de células viáveis (%) após 24 horas em contato com vernizes poliméricos de quitosana contendo própolis e verniz contendo somente quitosana da esquerda para direita verniz A, verniz B, verniz C, verniz D, verniz E, verniz F, verniz G, verniz Bs, LSS a 0,1%, 0,075%, 0,05% e 0,025%. Abcissas: número de células viáveis. Ordenadas: vernizes e controle.	56
FIGURA 17	Gráficos representando o perfil de liberação do verniz A (A), verniz B (B) e verniz C (C).	59
FIGURA 18	Gráficos representando o perfil de liberação do verniz D (D), e verniz E (E).	60
FIGURA 19	Gráficos representando o perfil de liberação do verniz F (F) e verniz G (G).	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Constituintes químicos identificados e quantificados (marcadores) por cromatografia líquida de alta performance e de fase reversa: flavonóides e outros constituintes químicos presentes em 1 grama da amostra de própolis verde utilizada na manipulação (SBN 97)	36
Tabela 2	Formulação de verniz à base de quitosana contendo 15% (verniz A), 10% (verniz B) e 5% (verniz C) de extrato etanólico de própolis verde brasileira a 25%.	37
Tabela 3	Formulação de verniz à base de quitosana contendo 7,5% (verniz D) e 5% (verniz E) de extrato etanólico de própolis verde brasileira a 25%.	38
Tabela 4	Formulação de verniz à base de quitosana contendo 10% (verniz F) e 5% (verniz G) de extrato etanólico de própolis verde brasileira a 25%.	39
Tabela 5	Componentes da formulação do verniz base contendo apenas quitosana.	40
Tabela 6	Avaliação qualitativa das formulações de acordo com os critérios de viscosidade, homogeneidade e tempo de secagem na superfície dos dentes bovinos.	43
Tabela 7	Construção de curvas analíticas obtidas para quantificação de flavonóides totais em termos de quercetina, em solução de etanol/ácido acético (50:50).	49
Tabela 8	Construção de curvas analíticas obtidas para quantificação de flavonóides totais em termos de quercetina, em solução de etanol/água (20:80).	50
Tabela 9	Halos de inibição de <i>S. mutans</i> e <i>S. sanguinis</i> a corpos de prova contendo quitosana e extrato etanólico de própolis verde.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
CAPE	Éster Fenil do Ácido Cafeico
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CO ₂	Gás Carbônico
D	Dentina
DP	Desvio Padrão
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Esmalte
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
Ex-URSS	Ex- União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
F	Flúor
g	Gramas
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
h	Hora
HCL	Ácido Clorídrico
ISO	International Organization for Standardization
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
LEMB	Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais
LSS	Lauril Sulfato de Sódio
M	Média
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	miligramas
mL	mililitros

mm	milímetros
Mm	massa molar
µL	microlitros
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
nm	nanômetros
OD	Densidade Ótica
P.A.	Pró Análise
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>/ Solução Tampão Fosfato Básico Salino
PLA	Ácido Poli-lático
q.s.p	quantidade suficiente para
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
SS	<i>Streptococcus sanguinis</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
V	Verniz

RESUMO

Os vernizes são formulações que, ao serem associadas com antimicrobianos, tem sido utilizadas em Odontologia para o controle e a prevenção do biofilme cariogênico. Nesse contexto, a clorexidina é o padrão utilizado como princípio ativo dos vernizes odontológicos. Entretanto, a clorexidina exibe efeitos indesejáveis como alteração do paladar e coloração dos dentes e da mucosa. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um verniz polimérico à base de quitosana e própolis verde com a finalidade de controlar e prevenir o biofilme cariogênico, considerando que a própolis tem demonstrado atividade antimicrobiana contra microorganismos patogênicos da cavidade bucal comprovada mundialmente em diversos estudos já publicados. Ao verniz polimérico contendo quitosana foi adicionado extrato etanólico de própolis verde brasileira em diferentes concentrações, sendo cada uma delas: verniz A (15% de extrato etanólico de própolis verde/EEP), verniz B (10% EEP), verniz C (5% EEP), verniz D (7,5% EEP), verniz E (5% EEP), verniz F (10% EEP), verniz G (5% EEP). A atividade antimicrobiana foi testada de acordo com as normas do CLSI (2007) contra amostras padrão de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* pelo método de difusão em ágar. Os resultados foram obtidos através da média das medidas dos halos de inibição e de seus desvios-padrões e demonstraram que todos os vernizes inibiram o crescimento dos dois microorganismos testados, porém, após 24 horas, o verniz B exibiu o maior halo de inibição para *S. mutans* ($8,92 \pm 0,68$), enquanto que o verniz A mostrou o maior halo de inibição contra *S. sanguinis* ($10,91 \pm 0,79$) no mesmo período. Após 48 horas, o verniz F apresentou halos de inibição maiores para *S. mutans* ($9,53 \pm 1,07$) enquanto, contra o *S. sanguinis*, os maiores halos de inibição foram observados para o verniz A ($10,23 \pm 0,35$). O teste de citotoxicidade dos vernizes sob osteoblastos foi feito obedecendo às normas ISO 10993-5 e utilizando o ensaio colorimétrico com MTT para verificar a viabilidade celular, o qual demonstrou que todas as formulações dos vernizes mantiveram 80% das células viáveis, demonstrando baixa citotoxicidade, apresentando diferença estatisticamente significativa apenas com o verniz base contendo apenas quitosana, que permitiu a proliferação celular (120%). O teste de liberação controlada da própolis foi feito através da aplicação de 40 μ L de cada verniz na superfície de esmalte dentes bovinos e mantidos em solução etanol/água em tempos regulares. O resultado demonstrou que, para liberação imediata, próximo a 8 horas, os melhores desempenhos foram observados para os vernizes E e F; demonstraram médio desempenho os vernizes G e A; os piores desempenhos foram observados para os vernizes C, D e B. O melhor desempenho em liberação prolongada foi do verniz A. Todos esses dados nos permitem concluir que o verniz à base de quitosana contendo extrato etanólico de própolis verde tem potencial para ser aplicado clinicamente na prevenção e controle do biofilme dental cariogênico, sendo que a formulação do verniz A, contendo própolis verde a 15% obteve os resultados mais favoráveis em todos os testes a que foi submetido.

Palavras-chave: vernizes, própolis, quitosana, sistemas de liberação de drogas, agentes antimicrobianos, citotoxicidade.

ABSTRACT

Varnish containing chitosan and Brazilian green propolis extract: antimicrobial activity, cytotoxicity and sustained-release profile.

Varnishes are formulations that, when associated with antimicrobials, are being used in Dentistry to control and prevent cariogenic biofilm. In this context, chlorhexidine is the gold standard in antimicrobial varnishes, although chlorhexidine has some side effects affecting taste and oral mucosa. The aim of this work was to develop a polymeric varnish containing chitosan and Brazilian green propolis to control and prevent cariogenic biofilm, considering that propolis has been demonstrating antimicrobial activity against oral pathogenic bacteria in several studies worldwide. To the chitosan polymeric varnish was added green propolis ethanolic extract in different concentrations: varnish A (15% green propolis ethanolic extract/GPEE), varnish B (10% GPEE), varnish C (5% GPEE), varnish D (7, 5% GPEE), varnish E (5% GPEE), varnish F (10% GPEE), varnish G (5% GPEE). The antimicrobial activity was tested according to CLSI (2007) patterns and carried out against standard samples of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* through agar diffusion method. Results were obtained through the mean size of the inhibiting halo and their deviation standards, which showed that all the varnishes inhibited both bacteria, but in 24 hours, varnish B formed the biggest halo at *S. mutans* ($8,92\pm 0,68$), while varnish A formed the biggest halo at *S. sanguinis* ($10,91\pm 0,79$) at the same period. After 48 hours, varnish F formed the biggest halo at *S. mutans* ($9,53\pm 1,07$) and varnish A formed the biggest halo at *S. sanguinis* ($10,23\pm 0,35$). The cytotoxicity test with osteoblasts was made according to the ISO 100993-5 patterns and the cellular viability was accessed through the MTT essay, which demonstrated that all the varnishes kept 80% of the viable cells, showing low cytotoxicity and presenting significative statistical difference with the varnish base containing just chitosan, which allowed cellular proliferation (120%). The sustained-release test was carried out after the application of 40 μ L of each varnish in the enamel surface of bovine teeth and kept in ethanol/water solution in regular times. Results showed that, in terms of immediate liberation, next to 8 hours, the best performance was observed in the varnishes E and F; mean performance was reached by the G and A varnishes; and the worst performance was observed in the C, D and B varnishes. The best prolonged performance was made by varnish A. These results allow us to conclude that the varnish containing chitosan and Brazilian green propolis has potential to be applied clinically in the prevention and control of cariogenic biofilm, considering that the formulation of the varnish A, containing 15% of the green propolis ethanolic extract, gave the best results in all the applied tests.

Key words: varnish, propolis, chitosan, drug delivery system, antimicrobial agents, cytotoxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. O Biofilme e a Cárie Dental.....	17
2.2 Vernizes.....	19
2.3 Quitosana.....	21
2.4 Própolis.....	23
2.4.1 Histórico.....	23
2.4.2 Classificação.....	25
2.4.3 Composição química.....	29
2.4.4 Propriedades terapêuticas da própolis.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
Objetivos gerais.....	34
Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Preparação dos vernizes.....	35
4.2 Preparação dos corpos de prova.....	40
4.3 Caracterização dos vernizes.....	43
4.4 Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	44
4.5 Teste de citotoxicidade.....	45
4.5.1 Ensaio com MTT.....	46
4.6 Teste de liberação prolongada.....	48
4.6.1 Construção de curva analítica para doseamento do teor de flavonóides totais.....	48
4.6.2 Teste de doseamento de flavonóides totais na formulação.....	51
4.6.3 Teste de liberação prolongada.....	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1 Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	53
5.2 Teste de citotoxicidade.....	55
5.3 Teste de liberação prolongada.....	56

6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÃO.....	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXO 1.....	85
ANEXO 2.....	104
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	106

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença multifatorial que acomete diversas populações no mundo inteiro, principalmente adolescentes e crianças. Apesar de não depender apenas da presença de microbiota cariogênica, mas também de dieta rica em açúcar, um dos mecanismos de controle dessa doença se dá através da diminuição do biofilme dental, que é um conjunto de microorganismos e produtos metabólicos fixados a uma matriz polimérica aderida à superfície dentária. Nesse conjunto, os microorganismos cariogênicos produzem ácidos responsáveis pela diminuição do pH da boca, dando início ao processo de desmineralização do esmalte do dente (FEJERSKOV & KIDD, 2005).

Para coibir esse fenômeno, vários produtos vêm sendo desenvolvidos. O primeiro deles foi o flúor, com ação remineralizante, seguido pela clorexidina, com ação antimicrobiana, dentre outros. O veículo para essas substâncias varia de acordo com a sua aplicação clínica, podendo ser encontrados como enxaguantes, géis e vernizes empregados como métodos não cirúrgicos de tratamento e prevenção da cárie dentária (PETERSSON *et al.*, 2000).

Os vernizes são formulações farmacêuticas que aderem à superfície do dente formando um filme polimérico, liberando lentamente uma substância antimicrobiana no meio bucal. Essa capacidade de formar um filme se dá através de um polímero, e dentre os mais usados está o de etilcelulose e uma mistura de copolímero acetatos e vinil-copolímeros acrilatos. No entanto, esses copolímeros não são biodegradáveis e são citotóxicos (MORAIS *et al.*, 2007).

A investigação de produtos naturais com atividade antimicrobiana vem atraindo a atenção de muitos pesquisadores, motivados principalmente pelo aumento da resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos tradicionais e

aos efeitos adversos frequentemente observados depois do uso de antibióticos (LIBÉRIO *et al.*, 2009).

Entre os produtos naturais mais estudados, a própolis vem sendo considerada um auxiliar no tratamento ou prevenção de várias doenças infecciosas. A própolis é considerada relativamente não-tóxica (BURDOCK, 1998; CUESTA *et al.*, 2005; JASPRICA *et al.*, 2007) e proporciona uma atividade antibacteriana ampla, além de atuar contra diversos fungos, parasitas e vírus (SFORCIN *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2001; ORSI *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2006). A própolis vem sendo usada pelo homem desde tempos muito antigos, quando este produto era utilizado no embalsamento de corpos no Egito (GHISALBERTI, 1979).

Além da atividade antimicrobiana, outras propriedades têm sido conferidas à própolis, incluindo as atividades antiinflamatória, antitumoral, citotóxica, hepatoprotetora, antioxidante, hematoestimulante, imunomodulatórias e cicatrizante (BANSKOTA *et al.*, 2001; AHN *et al.*, 2004; ORSOLIC & BASIC, 2005; SFORCIN, 2007; SFORCIN & BANKOVA, 2010).

A quitosana é um derivado da quitina, composto natural que pode ser encontrado em exoesqueletos de artrópodes, conchas de crustáceos e cutículas de insetos. Industrialmente, pode ser obtida através da hidrólise alcalina da quitina (VAN DER MEI *et al.*, 2007). As propriedades da quitosana são muito importantes na área odontológica, pois além de ser biocompatível e biodegradável, é um polímero de carga positiva que se combina à parede celular das bactérias, conferindo ação bactericida e bacteriostática a esse material (UYSAL *et al.*, 2011). Essas propriedades, aliadas à capacidade de formar uma película e de ser mucoaderente torna a quitosana a base ideal para liberação de fármacos de forma lenta, no caso deste trabalho, a própolis.

Portanto, foi idealizado um verniz odontológico contendo própolis verde em diferentes concentrações. Estudos *in vitro* foram realizados com o objetivo de verificar quais as propriedades antimicrobianas, citotóxicas e de liberação prolongada deste novo produto.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Biofilme e a Cárie Dental

Os microorganismos da cavidade bucal se aderem aos componentes salivares da película adquirida do esmalte e, através do crescimento e a interação entre as espécies, forma uma comunidade, o biofilme. Conseqüentemente, o reconhecimento bacteriano dos receptores salivares sobre as superfícies dentais representa um importante passo na patogênese da doença bucal (OLIVEIRA *et al*, 2007).

A palavra “placa”, no contexto odontológico, foi inicialmente usada por Black (BLACK, 1886 *apud* BOWEN & KOO, 2011), quando ele descreveu a acumulação coletiva de microorganismos em lesões cariosas incipientes. A placa dental, biofilme dental ou placa são colônias de microorganismos embebidos em uma matriz amorfa aderida à superfície do dente. Todos os biofilmes têm no mínimo uma propriedade em comum, como por exemplo, a presença de uma matriz bacteriana (BOWEN & KOO, 2011). Alguns desses microorganismos têm sido responsabilizados pela ocorrência de doenças bucais, tais como cárie e periodontites que estão entre as mais freqüentes infecções bacterianas em humanos (FISCHMAN, 1997). Há uma distinta microbiota saudável na cavidade bucal diferente daquela de doenças bucais (AAS *et al*, 2005).

A cárie é uma doença infecciosa multifatorial e está entre as doenças crônicas mais prevalentes entre adultos e crianças mundialmente. A superfície do dente é ímpar entre todas as superfícies corporais por ter uma superfície dura e lisa e, por irromper na cavidade bucal nos primeiros anos de vida. A colonização das superfícies do dente por *Streptococcus mutans* está associada

com a etiologia e patogênese da cárie dental em humanos (MURATA *et al.*, 2010). A primeira vez em que o microorganismo cariogênico *Streptococcus mutans* pode se estabelecer é quando o primeiro dente decíduo erupciona na cavidade bucal, já que esses microorganismos necessitam de superfícies lisas e duras para sua colonização e multiplicação. A relação entre o estabelecimento do *Streptococcus mutans* e o início da carie dental em crianças jovens tem sido extensivamente estudada. Vários estudos têm demonstrado que crianças que foram infectadas por *S. mutans* precocemente são mais susceptíveis a desenvolver a cárie dental do que as crianças que foram infectadas mais tardiamente (LENANDER-LUMIKARI & LOIMATANTA, 2000).

Outras espécies de microorganismos, tais como *Actynomices*, também estão entre os colonizadores iniciais da superfície dental e podem constituir até 27% das bactérias pioneiras. Vários estudos baseados em cultura indicaram que as espécies de *Actynomices* aumentam sua proeminência a expensas dos *Streptococcus* durante a maturação do biofilme (DIGE *et al.*, 2009).

Os microorganismos do gênero *Lactobacillus* podem ser isolados de lesões de cárie e também podem ser encontrados em outros lugares do corpo e em alimentos fermentados. Essa espécie, quando encontrada nas lesões de cárie, é extremamente dependente da dieta do indivíduo, ocorrendo uma troca entre as populações bucais e intestinais. No entanto, essas espécies não são membros significantes da microflora da placa bacteriana normal na ausência de cáries, mas são invasoras oportunistas que levam vantagem em condições de baixo pH estabelecidas por outra bactéria em lesões profundas de cárie. O mesmo se aplica às Bifidobactérias, porém isto ainda não está claro (RUSSELL, 2009).

A remoção da placa dental e de sua microbiota é considerada essencial para a obtenção e manutenção da saúde bucal (PALOMO *et al.*, 1989; FISCHMAN, 1997). O uso de agentes mecânicos constitui um método simples e de custo eficaz que demonstra ser eficiente no controle da placa bacteriana. A

efetividade desse método é influenciada pela habilidade manual e pela motivação do indivíduo (FRANCO-NETO *et al.*, 2008). A utilização de enxaguantes bucais é uma medida adjuvante comum no controle mecânico da higiene bucal, facilitando o controle da placa supragengival e da gengivite (JANSON, 2006). O controle químico de placa dental inclui somente as áreas supragengival e marginal, devido ao fato de os enxaguantes bucais usados sob condições normais não alcançarem a área subgengival (BRECX, 1997).

Substâncias como flúor e clorexidina já foram consagradas na literatura como agentes remineralizantes e antimicrobianos, respectivamente. A forma de utilização mais comum desses compostos é em cremes dentais, enxaguatórios e géis, porém, muitas das propriedades contidas nessas substâncias são perdidas através desses veículos. A utilização dessas substâncias sob a forma de vernizes é comprovadamente eficaz devido ao prolongamento do contato das mesmas com a superfície dentária, melhorando sua incorporação ao dente (STROHMENGER & BRAMBILLA, 2001).

2.2 Vernizes

Os vernizes odontológicos são formulações farmacêuticas capazes de formar um filme polimérico que permite a incorporação e a consequente liberação de fármacos na cavidade bucal. Ele tem como principal função a prevenção da cárie dentária, já que suas propriedades contribuem para a desestruturação do biofilme dental e, conseqüentemente, diminuição de microrganismos cariogênicos na superfície dentária (PESSAN *et al.*, 2008).

O verniz de flúor foi introduzido no mercado odontológico em 1960 e desde então é utilizado em tratamentos profissionais na prevenção da cárie dentária. É um produto de fácil aplicação e deve ser usado em pacientes com alto risco de cárie por ter como principal propriedade a liberação lenta e prolongada do flúor na cavidade bucal, remineralizando o esmalte dentário. Os

vernizes de flúor disponíveis no mercado são: Duraphat (Colgate) –2,26% de F, Duraflur (Herpo/Dentsply) – 2,26% de F, Fluorniz (SSWhite) – 2,26% de F, Fluor Protector (Vivadent) – 0,9% de difluorsilano e 0,7% de F, Biophat (Biodinâmica) – 6% de fluoreto de sódio e 6% de fluoreto de cálcio, Duofluorid XII (FGM) – 6% de fluoreto de sódio e 6% de fluoreto de cálcio, Shellac F (Isodan) - fluoreto de sódio a 5%, (BUSSADORI *et al.*, 2004).

Apesar do aumento e subsequente declínio da cárie desde 1950 até o começo dos anos 90 na maioria dos países desenvolvidos, observou-se que, apesar da prevalência de cárie ter diminuído, ela se tornou fortemente polarizada, mostrando uma distribuição bimodal (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Enquanto alguns países revelam que a maioria das crianças não necessita de tratamento restaurador invasivo, outros revelam que parte da população permanece inerte aos benefícios de ações preventivas, como o acesso ao flúor. Nesses países em que a distribuição de cárie é polarizada, existem estratégias de promoção de saúde para pacientes com alto risco de cárie, ao invés do sistema de promoção de saúde convencional. Mesmo assim, esses programas ainda são passíveis de falha por dependerem da adesão do paciente, o que destaca ainda mais a importância de um sistema de liberação lenta e prolongada para essa população (PESSAN *et al.*, 2008).

A clorexidina é um agente antimicrobiano usado para suprimir as bactérias cariogênicas, principalmente os *Streptococcus mutans*. Ela é considerada padrão ouro no controle químico da placa bacteriana e na prevenção de cáries em populações de alto risco, podendo ser encontrada numa variedade de formulações e veículos, como enxaguantes, géis, cremes dentais, impregnada em fio dental e vernizes (ZHANG *et al.* 2006; COSYN *et al.* 2005). Sua efetividade é atribuída à sua substantividade, ou seja, sua capacidade de se manter terapeuticamente ativa por um longo período de tempo (JAMES *et al.*, 2010). Atualmente, existem apenas duas marcas comerciais de vernizes de clorexidina disponíveis no mercado, sendo que nenhuma delas é comercializada no Brasil. São elas: Cervitec® (Ivoclar

Vivadent) – 1% de clorexidina e 1% de timol, EC40®(Certichem) – 35% de clorexidina.

A eficácia do verniz de clorexidina na prevenção da cárie dentária foi pesquisada na literatura abrangendo trabalhos de 1995 até 2003. Os ensaios clínicos retratados nesses trabalhos não mostraram evidências clínicas conclusivas do papel da clorexidina na prevenção da cárie dentária (TWETMAN *et al.*, 2004).

Visto que os vernizes possuem atividades complementares, se a terapia antibacteriana (clorexidina) for feita em conjunto com a terapia remineralizante (flúor) os resultados podem ser efetivos em indivíduos com alto risco de cárie. No entanto, esse tipo de terapia tem que ser desenvolvida numa forma que supere a necessidade de adesão do paciente ao tratamento, o que pode ser conseguido empregando-se esses agentes sob a forma de verniz (FEATHERSTONE, 2006).

Apesar da eficácia comprovada de ação antimicrobiana do verniz à base de clorexidina, há uma dificuldade de acesso a esse produto devido à sua não comercialização no Brasil e ao seu alto custo. Isso torna o seu emprego oneroso na clínica odontológica e, conseqüentemente reflete no custo do atendimento que muitas vezes impede o paciente de usufruir dos benefícios deste produto. Sendo assim, o desenvolvimento de um verniz à base de quitosana contendo um produto natural e nacional como a própolis verde brasileira, com efeito antimicrobiano comprovado cientificamente, pode preencher este espaço e permitir que uma grande parte da população seja beneficiada.

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).

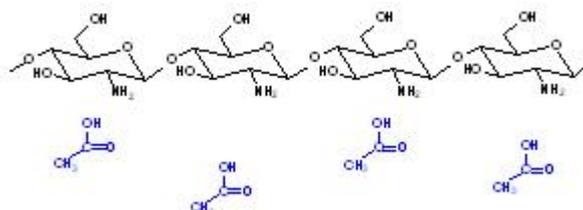


FIG.1: Estrutura molecular da quitosana.

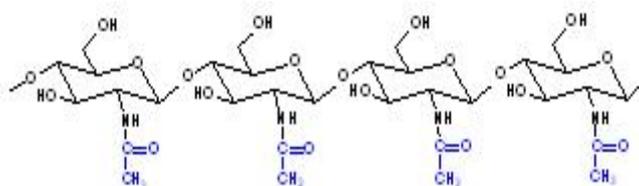


FIG. 2: Estrutura molecular da quitina.

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,

consequentemente 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 microorganismos (DECKER *et al*, 2005).

2.4 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). A própolis é uma substância natural não tóxica coletada por abelhas *Apis mellifera* em várias espécies de plantas (FIGURA 3). Tem sido usada na medicina popular através dos séculos (CASTALDO & CAPASSO, 2002;

BANKOVA, 2005a). Caracteristicamente, é um material lipofílico, duro e frágil quando frio, mas mole, flexível e muito pegajoso quando quente. Daí o nome “cera de abelha” (MARCUCCI *et al.*,1995). Tem cheiro característico e mostra propriedades adesivas por interagir fortemente com óleos e proteínas da pele (SFORCIN *et al.*, 2007).



FIG. 3: Abelha *Apis mellifera* sobre a folha de *Baccharis dracunculifolia*.

Fonte:<http://revelatti.blogspot.com/2009/09/o-potencial-da-propolis-verde.html>

A composição química da própolis é complexa (BURDOCK, 1998; BOYANOVA *et al.*, 2006). Alguns fatores, como a origem botânica da própolis e a sua época de coleta podem influenciar a composição química deste material resinoso (FERNANDES *et al.*, 2007).

A coloração da própolis varia do verde amarelado ao marrom escuro, dependendo do local – savana, florestas tropicais, deserto, regiões litorâneas e montanhosas – onde é produzida (BANKOVA *et al.*, 1998; MARCUCCI *et al.*, 2000; BANKOVA *et al.*, 2005b).

A própolis é utilizada pelas abelhas como proteção contra a entrada de microorganismos, fungos e bactérias na colméia, 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 (besouros e insetos) que as abelhas não conseguiram tirar da colméia, evitando sua putrefação, o que poderia causar-lhes infecções e doenças (MARCUCCI *et al.*, 1995; BURDOCK *et al.*, 1998; SALATINO *et al.*, 2005).

O interesse pela ação farmacológica de produtos naturais tem crescido e encontrado significativa aceitação popular. Dentre esses produtos, a própolis tem se destacado devido à sua aplicabilidade na indústria de alimentos e cosméticos, por ser utilizada como princípio ativo em vários produtos, como dentifrícios e os cremes dermatológicos (SIMÕES *et al.*, 2008). Também está disponível sob a forma de cápsula (pura ou combinada), extrato (hidroalcoólico ou glicólico), enxaguante bucal (combinado com melissa, salva, malva e/ou alecrim), pastilhas, cremes e pó (indicada em gargarejos ou para uso interno, quando dissolvida em água) (CASTALDO & CAPASSO, 2002).

Quanto ao aspecto etnofarmacológico, a própolis é um dos poucos "remédios naturais" que continuam sendo utilizados por um longo período por diferentes civilizações (MENEZES *et al.*, 2005). A própolis é largamente empregada na medicina popular, principalmente em comunidades com condições inadequadas de saúde pública. Tem sido estudada em sequência para descobrir mais efetividade e menos compostos tóxicos (AMARAL *et al.*, 2006; MELLO *et al.*, 2006).

2.4.1 Histórico

A própolis é um produto de origem natural que tem sido empregado extensivamente desde a Antiguidade. Os egípcios conheciam as propriedades antiputrefativas da própolis, utilizando-a para embalsamar cadáveres (GHISALBERTI, 1979). Era reconhecida por suas propriedades medicinais por médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno. A própolis foi empregada como antisséptico e cicatrizante no tratamento de feridas e como desinfetante bucal, sendo o seu uso perpetuado na Idade Média entre médicos árabes (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Também, foi muito utilizada, sob a forma de pomada e bálsamo, no tratamento de ferimentos de soldados em batalhas, devido ao seu efeito cicatrizante. Essa propriedade curativa da própolis, conhecida como “Bálsamo de Gileade”, é também referida na Bíblia Sagrada (PARK *et al.*, 1999).

Do ponto de vista farmacológico, a própolis tem sido empregada na forma sólida; na forma de unguento à base de vaselina, lanolina, manteiga e azeite de oliva, ou extrato óleo-alcoólico; e na forma de extrato alcoólico e de extrato hidroalcoólico. A proporção própolis/veículo pode variar, para que se obtenham resultados bacteriostáticos ou bactericidas (GERALDINI *et al.*, 2000).

Nas décadas de 1980 e 1990, surgiu um grande número de publicações no mundo inteiro, sobressaindo o Japão em quantidade de trabalhos publicados, seguindo-se o Brasil e a Bulgária (PEREIRA *et al.*, 2002). Internacionalmente, a primeira licença comercial de medicamento contendo própolis foi registrada na Romênia, em 1965. Em todo o mundo, no mesmo período analisado, apurou-se um total de 239 licenças comerciais. Na década de 1980, as licenças comerciais foram predominantes na ex-URSS e países satélites. Atualmente, 43% das licenças comerciais são de origem japonesa. Dessas licenças, 62% correspondem a produtos para tratamento dental. No Japão, a produtividade científica relatada para a própolis aumentou 660% entre as décadas de 1980 e 1990 (PEÑA, 2008).

O interesse global em pesquisar a própolis aumentou consideravelmente e está relacionado a suas várias propriedades biológicas (PEREIRA *et al.*,

2002; SANTOS *et al.*, 2002; BOYANOVA *et al.*, 2005; AMARAL *et al.*, 2006; AURICCHIO *et al.*, 2007; PARKER & LUZ, 2007).

Na Odontologia, tem-se estudado a atividade farmacológica da própolis em algumas situações, como: gengivites, periodontites, aftas, mumificação pulpar em dentes de cães e cárie dental em ratos (GERALDINI *et al.*, 2000). Também, tem sido usada em curativos pré e pós-cirúrgicos e em tratamentos da candidose, herpes labial e higiene bucal. Verificou-se, ainda, a capacidade antisséptica e cicatrizante da própolis em indivíduos internados em hospitais, cujos resultados foram positivos (GRÉGIO *et al.*, 2005). Assim, este produto natural revela-se de grande interesse para o tratamento das doenças bucais (MANARA *et al.*, 1999).

Outro estímulo para a realização de pesquisas sobre própolis é o alto valor agregado no mercado internacional, principalmente no Japão, onde um frasco do extrato etanólico é vendido a preços dez vezes superior ao praticado no Brasil. O Brasil é considerado o terceiro maior produtor de própolis do mundo, ficando atrás somente da Rússia e da China. Apesar de o País ser responsável por 10% a 15% da produção mundial, atende a cerca de 80% da demanda japonesa. O interesse dos japoneses pela própolis brasileira deve-se a suas propriedades terapêuticas e características organolépticas, além da presença de menor quantidade de metais pesados e demais poluentes ambientais (PEREIRA *et al.*, 2002).

Nos últimos trinta anos, vários estudos e pesquisas científicas foram realizados para esclarecer as características medicinais atribuídas à própolis (BANSKOTA *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2002).

2.4.2 Classificação

Houve uma tentativa de classificação da própolis brasileira em doze tipos de acordo com as propriedades físico-químicas e relatos da localização geográfica. Entretanto, até o momento, somente três tipos tiveram a sua origem botânica identificada. A principal origem botânica dos tipos Sul (três), Nordeste (seis) e Sudeste (doze) da própolis brasileira, fora relatadas como resinas de *Populus sp.*, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente.

Os diferentes compostos presentes na própolis brasileira foram identificados e quantificados por meio de processo químico de tipificação, empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estabeleceu-se o processo de separação por cromatografia líquida, capaz de identificar os componentes predominantes de amostras de própolis (marcadores principais). Com base nos resultados obtidos a partir da investigação de centenas de amostras, foram estabelecidas metodologias de análise química de própolis brasileiras para o controle de qualidade. Por meio da técnica de CLAE e da quantificação dos compostos identificados por ela, estabeleceu-se uma tipificação para a própolis brasileira, com base na presença de marcadores. A principal característica desta tipificação prende-se à agilidade com que este produto apícola poderá chegar ao mercado, desde o campo até a indústria farmacêutica e cosmética, favorecendo a estas utilizarem a tipificação para a confecção de seus medicamentos e cosméticos, com controle de qualidade estabelecido, já que todos estes marcadores foram separados nos tipos por faixa de concentração. Isto é, a classificação é quantitativa (PARK *et al.*, 1999).

Outro fator importante da tipificação é que será possível confeccionar produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene bucal conhecendo-se o tipo de própolis empregada e as quantidades dos componentes bioativos presentes, características nunca antes relatadas em publicações e patentes sobre própolis (MARCUCCI *et al.*, 2006).

O Cerrado brasileiro é uma das áreas mais ricas em *Baccharis sp.* Essas plantas são um grupo de arbustos lenhosos perenes, que são dióicas com

inflorescências masculinas e femininas que aparecem nas plantas separadamente. Das várias espécies de *Baccharis*, a *Baccharis dracunculifolia* é a origem dominante de própolis no sudeste do Brasil (Estado de São Paulo e área de cerrado de Minas Gerais), onde a maioria dos produtos comercializados a base de própolis são produzidos (PARK *et al.*, 2004).

Recentemente, foi encontrada uma própolis vermelha em colméias localizadas em regiões de mangues na região Nordeste. Observou-se que as abelhas coletam o exsudato vermelho da superfície da *Dalbergia ecastophyllum* (Linnaeus; Taubert), sugerindo que essa é a origem botânica da própolis vermelha. Analisaram-se, então, comparativamente, as amostras de exsudatos da planta e da própolis vermelha, demonstrando que o perfil cromatográfico da própolis é exatamente o mesmo da *D. ecastophyllum* (LUSTOSA *et al.*, 2008). A melhor maneira de se encontrar origem botânica da própolis seria comparando-se a sua composição química com a da suposta planta de origem (SILVA *et al.*, 2008).

2.4.3 Composição química

Mais de 300 componentes químicos são descritos em própolis de diversas origens (PEÑA *et al.*, 2008). Entre as substâncias químicas encontradas na própolis estão ceras, resinas, bálsamos, óleos aromáticos e éter, pólen e material orgânico. A proporção dessas substâncias varia e depende do lugar e do período de coleta (MARCUCCI *et al.*, 1995).

A própolis recolhida de uma colméia de abelhas, também conhecida como própolis bruta, apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (BURDOCK *et al.*, 1998; MENEZES *et al.*, 2005; SFORCIN *et al.*, 2007). A própolis é composta também de vários ácidos orgânicos, quantidade considerável de substâncias minerais (entre as

quais, manganês, zinco, cálcio, fósforo e cobre), vitaminas B1, B2, B6, C e E, ácidos (nicotínico e pantotênico) e aminoácidos já comprovados (MARCUCCI *et al.*, 1995; BURDOCK *et al.*, 1998; BANKOVA *et al.*, 2000; MARCUCCI *et al.*, 2000).Essas características constitutivas podem variar de acordo com a região e com o período do ano (AHN *et al.*, 2007a; FISCHER *et al.*, 2007).

Contudo, a composição da planta de origem determina a composição química da própolis (BANKOVA, 2005a; AHN *et al.*, 2007b; FISCHER *et al.*, 2007).

Hoje, são conhecidas na própolis diversas substâncias de estruturas químicas distintas, pertencentes às seguintes classes: alcoóis, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonoides, ésteres hidrocarboidratos, éter, ácidos graxos, cetonas, terpenoides, esteroides e açúcares (MANARA *et al.*, 1999).

Os primeiros trabalhos de identificação dos elementos ativos da própolis foram realizados em 1911 por pesquisadores alemães (VERONESE *et al.*, 2009), em que foram identificados: a vanilina, o ácido e o álcool cinâmico. Já na década de 1970, Popravko (1975) conseguiu isolar e identificar onze elementos, destacando-se como os mais importantes os de tipo flavonóides, especialmente flavonas, flavonóis e flavononas, os terpenos, o alfa acetobutilenol e a isovanilina. Nessa mesma época, Cizmarik & Matel (1975) identificaram os ácidos aromáticos não saturados, como os ácidos cafeico e ferúlico. Na mesma década, Kadakov *et al.* (1978) relataram a presença de treze aminoácidos presentes em amostras de própolis.

Os efeitos terapêuticos são atribuídos aos diversos compostos fenólicos que compõem a própolis verde, os quais estão largamente distribuídos no reino vegetal. Destes, os flavonóides podem ser considerados os principais compostos (BURDOCK, 1998; BOYANOVA *et al.*, 2006), encontrando-se ainda alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, alcoóis e acetonas (ENDLER *et al.*,2003).

Os flavonóides e o éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) são compostos fenólicos que possuem a capacidade de inibir o crescimento e a divisão celular, aumentar a permeabilidade da membrana e interferir na mobilidade celular dos microorganismos (SIMÕES *et al.*, 2008).

Apesar de serem os componentes mais estudados da própolis, os flavonóides não são os únicos responsáveis pelas propriedades farmacológicas. Diversos outros componentes têm sido relacionados às propriedades medicinais da própolis (AWALE *et al.*, 2005). A própolis da Europa e da China contém muitos flavonóides e ácidos ésteres fenólicos. Flavonóides estão presentes somente em pequenas quantidades na própolis brasileira. Os principais componentes da própolis de origem brasileira são: terpenoides e prenilatados derivados de ácidos β -cumarínicos (AHN *et al.*, 2007a).

Na região Sudeste do Brasil existe em abundância a espécie botânica fornecedora de resina verde, que é a *Baccharis dracunculifolia*, também chamada de “alecrim do campo”, ou “vassourinha”, típica das Américas, pois precisa de solo ácido para crescer, característica encontrada no Estado de Minas Gerais. O alecrim nasce e se desenvolve facilmente no Brasil, tanto em áreas plantadas como em espaços abandonados (PARK *et al.* 2004; SALATINO *et al.* 2005; FUNARI & FERRO, 2006).

Ela é muito diversificada em sua composição química devido à rica biodiversidade do País. Precisa ser investigada como origem de novas substâncias bioativas, tais como derivados de ácido cinâmico, principalmente artepilin C, flavonóides e outras com propriedades farmacológicas ou funcionais (SILVA *et al.*, 2008).

O renovado interesse sobre a composição da própolis brasileira deve-se ao fato de o Brasil possuir uma flora muito diversificada, clima tropical e abelhas africanizadas da espécie *Apis mellifera* que produzem a própolis,

durante o ano, no período de abril a setembro (MARCUCCI, 1995; BANKOVA *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2002).

Os típicos constituintes da própolis verde brasileira derivada da *Baccharis dracunculifolia* são ácido cafeoquinico e derivados prenilatados de ácido cinâmico, tais como artepilin C e baccharina. Outras própolis verdes brasileiras são quimicamente diferentes, pois além de prenilatados de ácido cinâmico, contém triterpenóides (MOURA *et al.*, 2009).

Ao lidar com a composição química e a ação biológica da própolis verde, não se pode apontar um componente de determinada substância ou uma classe de substâncias que poderiam ser responsáveis por suas distintas atividades farmacológicas. Obviamente, em diferentes amostras diferentes combinações de substâncias são essenciais para a atividade biológica da própolis (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; MENEZES, 2005). É importante observar que todas as investigações sobre a atividade antibacteriana de substâncias específicas isoladas da própolis mostraram que um único componente não tem uma atividade superior à do extrato total (PAULA *et al.*, 2006).

As propriedades químicas da própolis não são apenas benéficas para as abelhas; têm, também, valor farmacológico como uma mistura natural, e não como uma poderosa fonte de novos agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais e compostos individuais (KUJUMGIEV *et al.*, 1999).

2.4.4 Propriedades terapêuticas da própolis

Atualmente, sabe-se que a própolis brasileira exibe diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, antiinflamatória, imunomodulatória, citostática entre outras (BANKOVA, 2005b; SZLISZKA *et al.*, 2011).

A composição química da própolis é muito complexa. Observam-se: 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 antiúlceras (auxílio na cicatrização), imunoestimuladora, hipotensiva e citostática (SFORCIN, 2007; SFORCIN & BANKOVA, 2010).

Os métodos de extração da própolis podem influenciar em sua atividade, desde diferentes solventes solúveis a diferentes componentes do extrato (SFORCIN, 2007; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana, a citotoxicidade sobre osteoblastos e o perfil de liberação de um verniz polimérico de quitosana contendo própolis verde brasileira.

3.2 Objetivos específicos

a) desenvolver formulações de vernizes poliméricos de quitosana contendo própolis verde brasileira em diversas concentrações;

b) avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de vernizes poliméricos de quitosana contendo própolis verde brasileira em diversas concentrações sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*;

c) avaliar *in vitro* a citotoxicidade de vernizes poliméricos de quitosana contendo própolis verde brasileira em diversas concentrações sobre osteoblastos;

d) avaliar *in vitro* o perfil de liberação controlada de vernizes poliméricos de quitosana contendo própolis verde brasileira em diversas concentrações;

e) avaliar qual dos vernizes poliméricos de quitosana contendo própolis verde brasileira em diversas concentrações tem melhor perfil para ser utilizado em estudo clínico *in vivo* para o controle do biofilme cariogênico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação dos vernizes

Os vernizes de própolis foram preparados pela dispersão da quitosana em veículo hidro-alcoólico acidificado, contendo o extrato etanólico de própolis verde a 25% (Pharmanéctar®, lote PAE0509, Belo Horizonte, Brasil) (FIGURA 4). Esse extrato etanólico foi escolhido por ser padronizado, tendo seus componentes químicos e seus flavonóides identificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE) (TABELA 1).



FIG. 4: Extrato etanólico de própolis verde (Pharmanéctar®, lote PAE0509).
Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 1. Constituintes químicos identificados e quantificados (marcadores) por cromatografia líquida de alta eficiência e de fase reversa: flavonóides e outros constituintes químicos presentes em um grama da amostra de própolis verde utilizada na manipulação dos vernizes (SBN 97).

Componente	Unidade	Resultados
Ácido cumarínico	mg/g	3,56
Ácido cinâmico	mg/g	1,66
Quercetina	mg/g	1,38
Kaempferol	mg/g	1,77
Isoramnetin	mg/g	0,91
Sakuranetin	mg/g	5,57
Pinobanksin-3-acetato	mg/g	13,92
Crisina	mg/g	3,51
Galangina	mg/g	9,75
Kaempferide	mg/g	11,60
Artepillin-C	mg/g	82,96

Além da quitosana de médio peso molecular utilizada na formulação (Sigma-Aldrich[®]), foram utilizados etanol P.A. (Synth[®]) e ácido acético glacial P.A. (Merck[®]), para diluição e solubilização do extrato de própolis e da quitosana, respectivamente.

As formulações A, B e C foram preparadas pela diluição do ácido acético no extrato etanólico de própolis ou no extrato etanólico previamente diluído em etanol P.A. Em seguida, o polímero foi adicionado à solução etanólica e após breve agitação adicionou-se água ao meio. Essa mistura foi então agitada por

24 horas para obtenção da forma farmacêutica final (FIGURA 5). A composição das formulações A, B e C está descrita na TABELA 2.

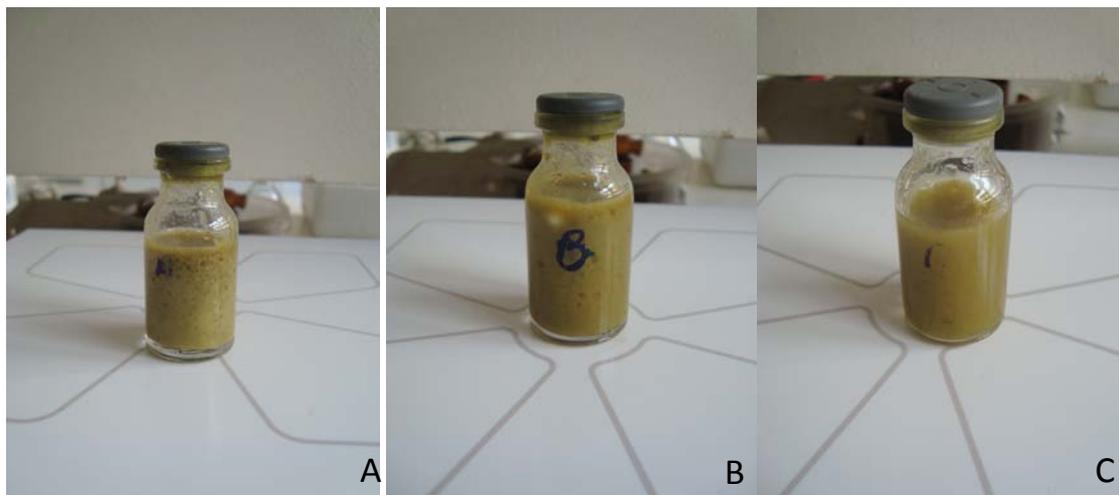


FIG. 5: Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 15% (verniz A), 10% (verniz B) e 5% (verniz C), respectivamente.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2: Formulação de verniz à base de quitosana contendo 15% (verniz A), 10% (verniz B) e 5% (verniz C) de extrato etanólico de própolis verde brasileira.

Constituintes	Quantidade		
	A (15%)	B(10%)	C(5%)
Extrato alcoólico de própolis	60,0 mL	40,0 mL	20, 0 mL
Álcool absoluto	-	20,0 mL	40,0 mL
Ácido acético	9,0 mL	9,0 mL	9,0 mL
Quitosana	1,0 g	1,0 g	1,0 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL	100 mL	100 mL

As formulações D e E (FIGURA 6) foram preparadas pela diluição do extrato etanólico de própolis em uma solução etanólica contendo 1,5% de ácido acético. Em seguida, o polímero foi adicionado à solução etanólica e após breve agitação adicionou-se água ao meio. Essa mistura foi então agitada por 24 horas para obtenção da forma farmacêutica final. A composição das formulações D e E está descrita na TABELA 3. É importante observar que as

concentrações de ácido nessas formulações são menores que nas formulações A, B e C.

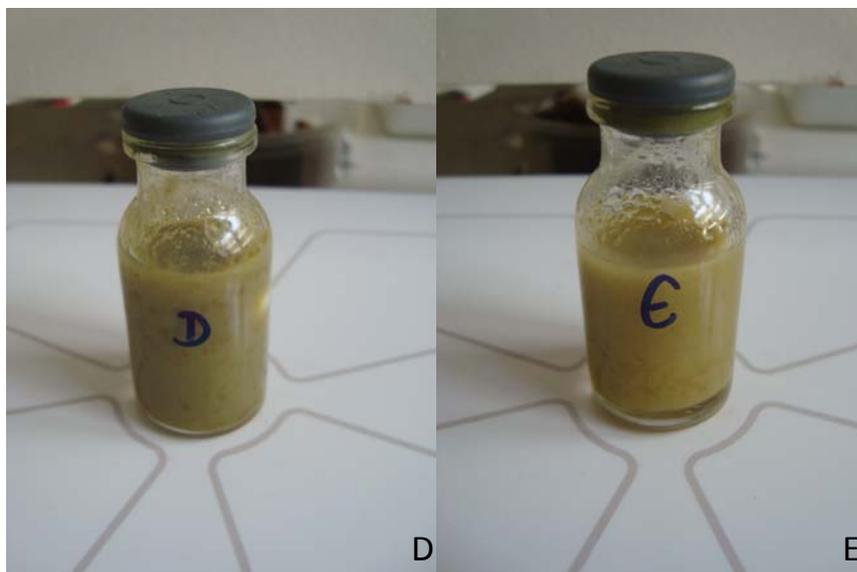


FIG. 6: Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 7,5% (verniz D), 5% (verniz E), respectivamente.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3: Formulação de verniz à base de quitosana contendo 7,5% (verniz D) e 5% (verniz E) de extrato etanólico de própolis verde brasileira.

Constituintes	Quantidade	
	D(7,5%)	E(5%)
Extrato alcoólico de própolis	30,0 mL	20, 0 mL
Álcool absoluto	30,0 mL	40,0 mL
Ácido acético	0,45 mL	0,6 mL
Quitosana	1,0 g	1,0 g
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL	100 mL

As formulações F e G (FIGURA 7) foram obtidas através da adição do extrato etanólico de própolis a um verniz de quitosana (FIGURA 8) previamente

preparado pela dispersão da quitosana em solução etanólica contendo 1,5% de ácido acético, seguida da adição de água e agitação por 24 horas. Após a adição do extrato a preparação foi novamente agitada em durante 24 horas. Os constituintes das formulações F e G e do verniz base contendo apenas quitosana estão descritos nas TABELAS 4 e 5.

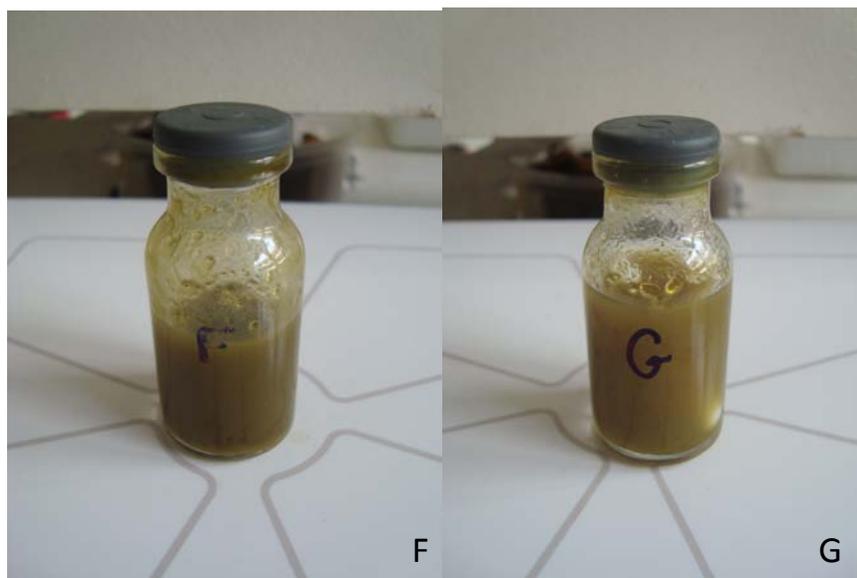


FIG. 7: Aspecto macroscópico de verniz polimérico de própolis verde a 10% (verniz F) e 5% (verniz G), respectivamente.

Tabela 4: Formulação de verniz à base de quitosana contendo 10% (verniz F) e 5% (verniz G) de extrato etanólico de própolis verde brasileira.

Constituintes	Quantidade	
	F(10%)	G(5%)
Extrato alcoólico de própolis	40,0 mL	20,0 mL
Gel de Quitosana q.s.p	100 mL	100 mL



FIG. 8: Aspecto macroscópico do verniz base contendo quitosana homogeneizado após 24 horas.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 5: Componentes da formulação do verniz base contendo apenas quitosana.

Constituinte	Quantidade
Quitosana	1,0 g
Etanol p.a.	50,0 mL
Ácido acético	1,5 mL
Água Milli-Q q.s.p.	100 mL

4.2 Preparação dos corpos de prova

Depois de obtidas as formulações nas consistências desejadas, os vernizes foram processados para se obter corpos de prova sólidos padronizados com os quais foram feitos os testes de susceptibilidade antimicrobiana e citotoxicidade. Os vernizes fluidos foram espatulados em placas de silicone perfuradas contendo, sob cada perfuração, discos de celulose (FIGURA 9). Esse recurso foi utilizado com a finalidade de se

padronizar a quantidade de verniz em cada perfuração (aproximadamente 50 μ L) e permitir o manuseio através dos discos de celulose, prevenindo a quebra dos vernizes secos ou a sua aderência nos vidros em que eram acondicionados. Após a espatulação, os vernizes foram deixados em temperatura ambiente por cerca de 24 horas para evaporação. Em seguida, os corpos de prova foram destacados das respectivas placas e acondicionados em vidros com tampa.

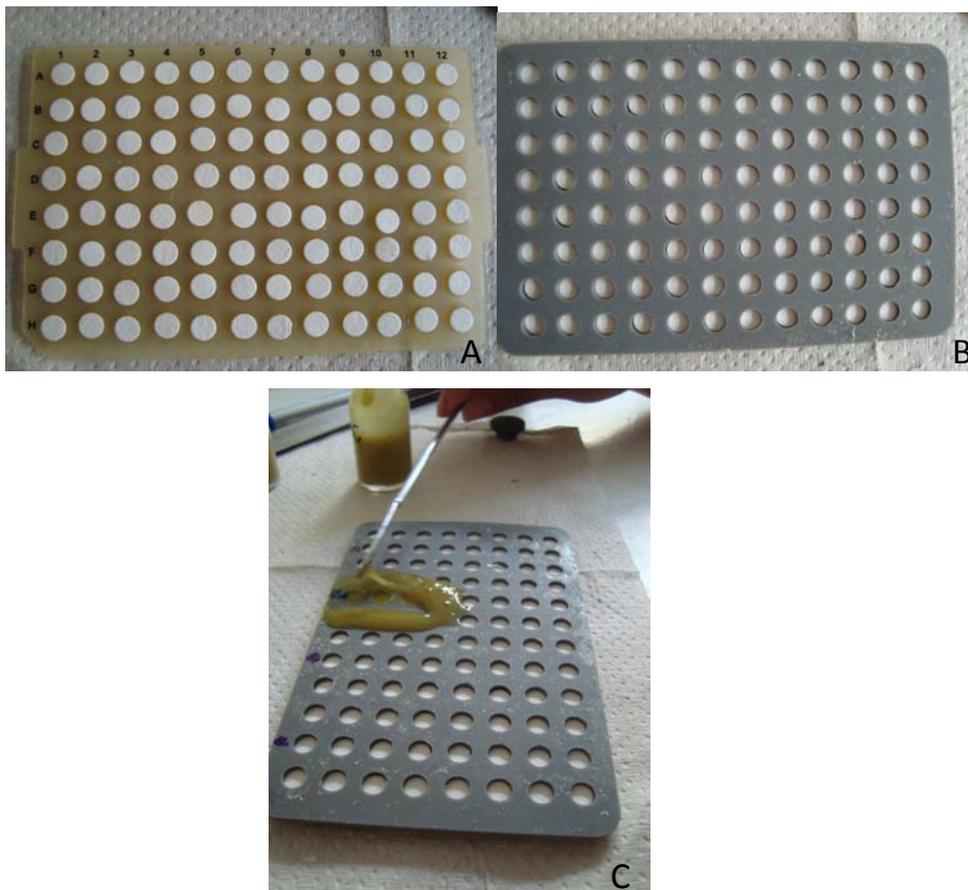


FIG.9: (A) Posicionamento dos discos de celulose em placa de silicone, (B) posicionamento da placa de silicone perfurada sob os discos de celulose, (C) espatulação do verniz em placas perfuradas de silicone.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os corpos de prova obtidos após a secagem das formulações foram posteriormente caracterizados (FIGURA 10).

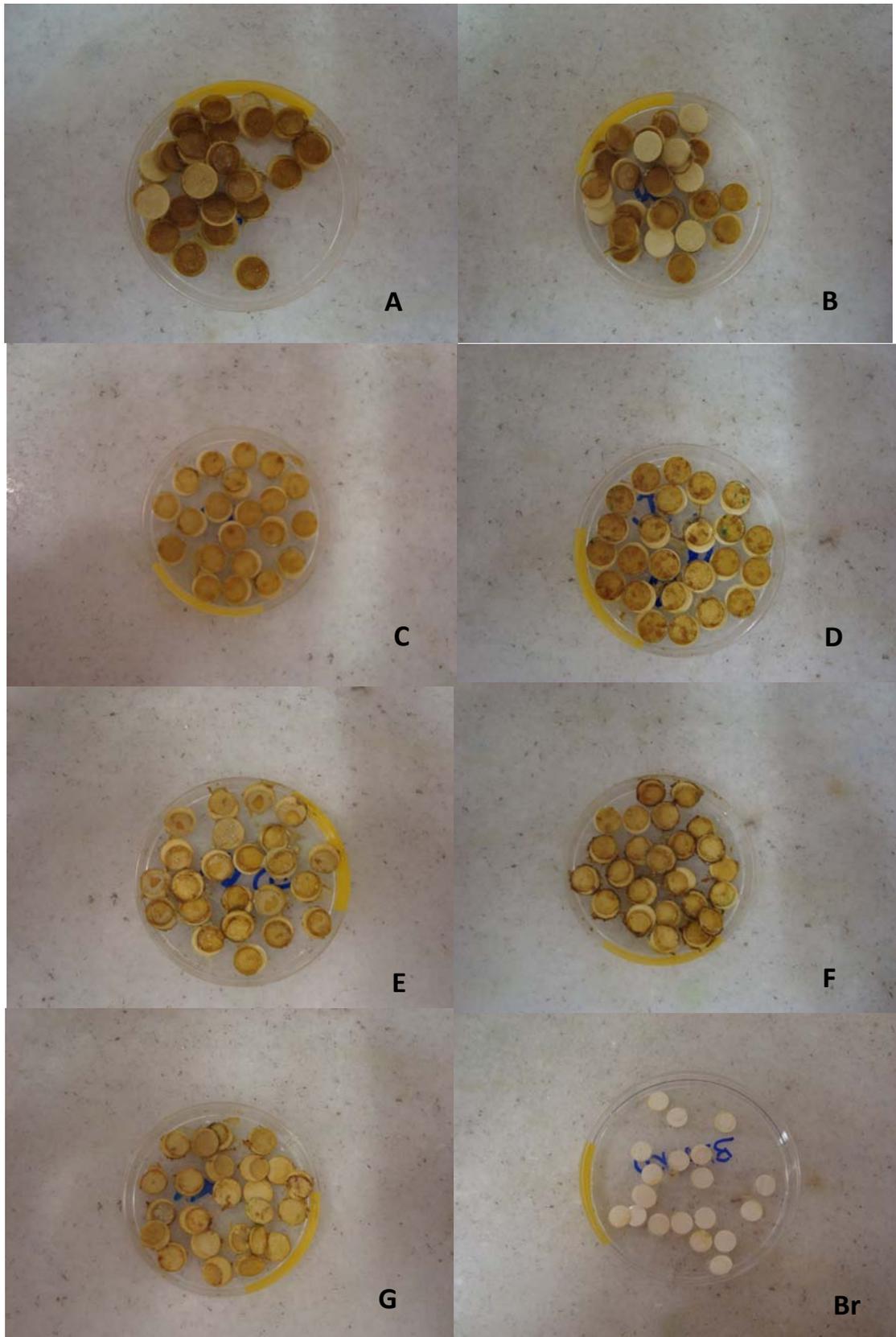


FIG. 10: Aspecto dos corpos de prova prontos para teste.
Fonte: Dados da pesquisa

4.3 Caracterização dos vernizes

A caracterização dos vernizes foi realizada pela análise do infravermelho, teste de hidratação e teste de mucoadesão no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob supervisão de um farmacêutico (ANEXO 1) e os resultados desses experimentos foram descritos em artigo já submetido: "DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN-BASED PROPOLIS TOOTH VARNISH".

Classificou-se qualitativamente a viscosidade, a homogeneidade e o tempo de secagem de cada verniz, obedecendo a critérios consensuais entre os pesquisadores (TABELA 6).

Tabela 6: Avaliação qualitativa das formulações de acordo com os critérios de viscosidade, homogeneidade e tempo de secagem na superfície dos dentes bovinos.

Amostras	Viscosidade	Homogeneidade	Tempo de secagem
Verniz A	Média	Alta	Médio
Verniz B	Baixa	Média	Rápido
Verniz C	Baixa	Baixa	Rápido
Verniz D	Baixa	Baixa	Rápido
Verniz E	Baixa	Baixa	Médio
Verniz F	Alta	Alta	Médio
Verniz G	Média	Alta	Lento

As imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura (MEV), obtidas após a aplicação de 40 µL de verniz em dentes bovinos, com a finalidade de se verificar se os vernizes possuem a capacidade de se aderir ao esmalte dentário, estão apresentadas na FIGURA 11.

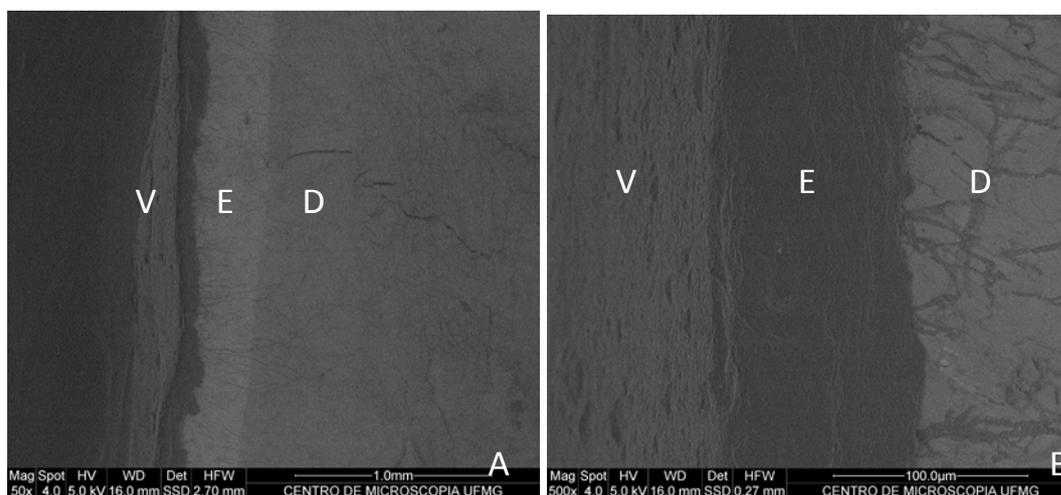


FIG. 11: Imagens representativas da microscopia eletrônica de varredura em dentes bovinos contendo verniz de própolis verde e quitosana (fig. A). A fig. B representa o aumento da região aonde foi aplicado o verniz. **LEGENDA:** (V) verniz, (E) esmalte dentário, (D) dentina. **Fonte:** Dados da pesquisa

4.4 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

O teste de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado através do método de difusão em ágar obedecendo às normas do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2007). Uma alíquota de 300µL contendo 1.0×10^8 UFC/mL das culturas de 18 horas de *Streptococcus mutans* (SM) (ATCC 70069) e *Streptococcus sanguinis* (SS) (ATCC 10557) correspondendo ao padrão 0.5 de McFarland foi plantada em ágar Mueller-Hinton (Difco, EUA) e, em seguida, os corpos de prova dos vernizes poliméricos a base de quitosana contendo diferentes concentrações de própolis verde: verniz A (15%), verniz B (10%), verniz C (5%), verniz D (7,5%), verniz E (5%), verniz F (10%), verniz G (5%),

verniz de clorexidina 1%+ timol 1% (VCT/controle), verniz de flúor (VFI/controle) e verniz base (VBs) foram colocados sobre o ágar. O verniz de clorexidina e timol foi manipulado pela farmácia Fórmula e Ação® (São Paulo, Brasil), pois sua forma comercial (CERVITEC®) não é comercializada no Brasil. O verniz de flúor usado no experimento foi o Fluorniz (SSWHITE, Brasil). As culturas foram deixadas em estufa a 37°C, durante 48 horas, em ambiente contendo 5% de CO₂. Após 24 e 48 horas de incubação as zonas de inibição foram medidas. Os testes foram feitos em três triplicatas independentes e, após aferidas as medidas dos halos de inibição pelo paquímetro digital DIGIMESS® (São Paulo, Brasil), foram calculadas as médias e os desvios-padrões (M±DP). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para se verificar o grau de diferença estatística e se foram significantes. Foram considerados significantes quando o valor de p<0.05.

4.5 Teste de citotoxicidade em osteoblastos

O teste de citotoxicidade em osteoblastos foi realizado segundo as normas ISO 10993-5 para testes de citotoxicidade *in vitro*. O ensaio colorimétrico em MTT foi utilizado para quantificar as células viáveis após a cultura celular. Os vernizes utilizados nesse teste eram previamente secos e colocados em luz ultravioleta durante 24 horas para se tornarem estéreis.

Os osteoblastos originados de cultura primária da calvária de ratos Wistar neonatos, utilizados até a 4^a passagem, foram doados pelo Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais (LEMB) do Departamento de Química da UFMG (CETEA nº167 /2007). Os frascos com células plaqueadas foram mantidos em meio DMEM (Cultilab, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), em estufa para cultura a 37°C e 5% de CO₂. O crescimento foi aguardado até a confluência de 80% das células, necessária para que pudessem ser repicadas.

Em seguida, fez-se o plaqueamento e semeadura das células em placas de cultura de células com 96 poços com a densidade de 5×10^4 cel/poço contadas em hemocítômetro. As células foram previamente incubadas durante 24 horas para que ocorresse a aderência e confluência.

Em seguida, cada verniz polimérico foi adicionado a seis poços (hexaplicata). O controle positivo da inibição da proliferação celular foi feito em triplicata utilizando o lauril sulfato de sódio (LSS) diluído em água Milli-Q nas concentrações: 0,10%, 0,075%, 0,05% e 0,025%. Três poços foram mantidos somente com suspensão de células e serviram como referência da proliferação celular. Os vernizes e também LSS ficaram em contato direto com as células durante 24 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Após o período de incubação, os materiais foram removidos e cada poço foi lavado cuidadosamente com PBS para remover possíveis fragmentos dos materiais ou células não-viáveis. Adicionou-se a cada poço 100 µL de meio DMEM desprovido de soro fetal bovino e contendo 10 µL de solução de MTT (12 mM). Posteriormente, as placas de cultura celular foram incubadas a 37°C durante 4 horas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução SDS-HCL (10 mL de 0,01M HCL/ 1g de SDS) a cada poço. As placas permaneceram em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, durante 24h sendo avaliadas, em seguida, no Thermo Scientific Multiskan® Spectrum a 570nm.

4.5.1 Ensaio com MTT

O ensaio da redução do sal de tetrazólio (MTT) foi utilizado neste estudo para medir a viabilidade e proliferação celular. O componente chave deste método é o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). O reagente MTT reage com o anel tetrazólio (produzido por desidrogenases mitocondriais de células vivas) para produzir o azul de formazan que pode ser medido por um método colorimétrico (espectrofotometria). A quantidade de

cristais de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes. O processo é descrito a seguir: 10^4 cels poço⁻¹ foram cultivadas em uma placa com 96 poços. Depois de uma incubação de 24 horas o meio de cultura foi aspirado dos poços. Em cada poço foi adicionado 100 µL de meio sem soro contendo as amostras, ou o controle positivo ou somente meio. O controle positivo incluído neste teste foi o lauril sulfato de sódio. Após 24 horas, as amostras foram removidas e as células eram lavadas em PBS para eliminar células não viáveis. Em seguida, 100µl poço⁻¹ de solução de MTT (1 mg ml⁻¹ em PBS) foi adicionada e as células foram incubadas a 37° C por 4 h para permitir a formação de cristais de formazan.

Depois da incubação, o sobrenadante foi removido e 100 µl de solução SDS-HCl (10 mL de 0.01M HCl – 1 g de SDS) foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais de formazan pipetando-a vigorosamente. A absorbância foi lida no espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan® Spectrum utilizando um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados de cada amostra foram mensurados. Para calcular a redução da viabilidade celular com os poços contendo somente células, a equação (C.1) abaixo foi usada:

$$(C.1) \text{ Viab.(\%)} = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}}$$

Onde OD_{570e} é o valor médio da densidade ótica das amostras; OD_{570b} é o valor médio da densidade ótica dos poços apenas com células (o mesmo meio de cultura contendo osteoblastos sem as amostras). Quanto mais baixa a porcentagem de viabilidade celular, maior o potencial citotóxico da amostra testada. Se a viabilidade celular for reduzida a < 50 % dos poços contendo somente células, a amostra tem um potencial citotóxico médio (ISO 10995-3).

O ensaio da redução do sal de tetrazólio (MTT) foi analisado estatisticamente utilizando a análise de variância ANOVA. A comparação das

médias foi realizada utilizando-se o teste de Bonferroni. Foram considerados significantes os valores de $p < 0.05$ (GraphPad Prism 5).

4.6 Teste de liberação prolongada

4.6.1 Construção de curva analítica para doseamento do teor de flavonóides totais

Inicialmente, três curvas padrão com quercetina di-hidratada, tomada como substância de referência, foram construídas em três dias diferentes. Alíquotas da solução etanólica de quercetina, a 50 µg/mL, foram diluídas em uma mistura etanol/ácido acético (50:50) nas concentrações de 6, 9, 12, 15, 18 e 21 µg/mL. A cada 240 µL de solução, foram adicionados 10 µL de solução etanólica de cloreto de alumínio na concentração de 2,5 % e a leitura em leitor de Elisa TECAN Infinite Pro a 425 nm foi realizada exatamente 30 minutos após a adição da solução de cloreto de alumínio. A equação da reta obtida para essas curvas foi: $y = 0,042x$; com $R^2 = 0,9970$ (FIGURA 12) e essa curva foi utilizada para quantificação dos flavonóides totais nos vernizes. Outras alíquotas da mesma solução etanólica de quercetina foram diluídas em uma mistura etanol/água 20:80 nas concentrações de 3, 4, 5, 6, 6, 7 µg/mL. A cada 240 µL de solução, foram adicionados 10 µL de solução etanólica de cloreto de alumínio na concentração de 2,5 % e a leitura foi realizada exatamente 30 minutos após a adição da solução de cloreto de alumínio em leitor de Elisa TECN Infinite Pro a 425 nm. A equação da reta obtida para essas curvas foi $y = 0,1025x$, com $R^2 = 0,9971$ (FIGURA 13) e essa curva foi utilizada para quantificação do extrato nas alíquotas obtidas do teste de liberação. (FUNARI & FERRO, 2006).

TABELA 7: Construção de curvas analíticas obtidas para quantificação de flavonóides totais em termos de quercetina, em solução de etanol/ácido acético (50:50).

Concentração (µg/mL)	Curvas			Média	Desvio Padrão
	I	II	III		
6,0	0,2626	0,2724	0,2487	0,2575	0,0086
	0,2605	0,2585	0,2468		
	0,2653	0,2516	0,2509		
9,0	0,4006	0,3931	0,3841	0,3905	0,0083
	0,3869	0,3983	0,3895		
	0,4011	0,3783	0,3828		
12,0	0,5235	0,5248	0,4952	0,5142	0,0124
	0,5296	0,5261	0,5117		
	0,5118	0,5001	0,5047		
15,0	0,6571	0,6530	0,6342	0,6451	0,0109
	0,6474	0,6452	0,6550		
	0,6537	0,6306	0,6295		
18,0	0,7373	0,7730	0,7308	0,7470	0,0228
	0,7605	0,7065	0,7301		
	0,7755	0,7476	0,7614		
21,0	0,8435	0,8754	0,8805	0,8690	0,0189
	0,8775	0,8427	0,8750		
	0,8983	0,8769	0,8512		

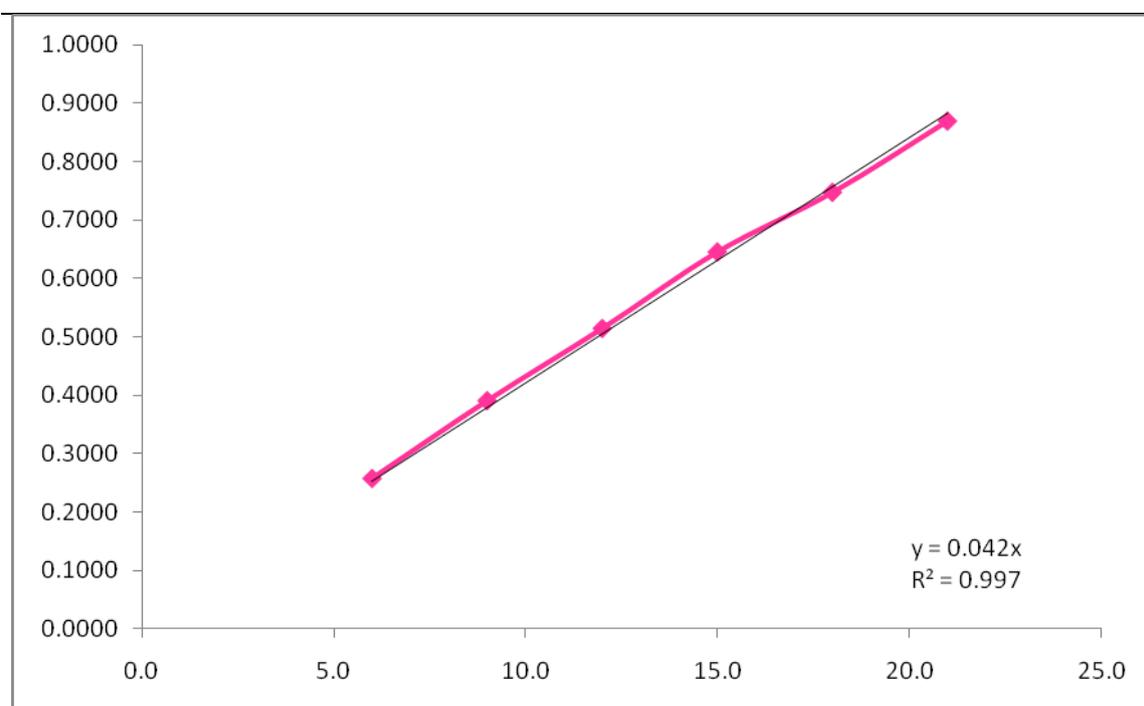


FIG. 12: Curva analítica obtida para quantificação de flavonóides totais em termos de quercetina, em solução de etanol/ácido acético (50:50).

TABELA 8: Construção de curvas analíticas obtidas para quantificação de flavonóides totais em termos de quercetina, em solução de etanol/água (20:80).

Concentração (µg/mL)	Curvas			Média	Desvio Padrão
	I	II	III		
3,0	0,2721	0,2864	0,2999	0,2913	0,0115
	0,2843	0,2917	0,3080		
	0,2826	0,2918	0,3047		
4,0	0,4177	0,4131	0,4139	0,4133	0,0038
	0,4149	0,4077	0,4093		
	0,4156	0,4091	0,4183		
5,0	0,5212	0,5183	0,5116	0,5079	0,0149
	0,5190	0,4902	0,5116		
	0,5204	0,4795	0,4993		
6,0	0,6165	0,6241	0,6137	0,6186	0,0051
	0,6251	0,6130	0,6206		
	0,6247	0,6131	0,6166		
7,0	0,7214	0,7166	0,7242	0,7222	0,0048
	0,7264	0,7180	0,7247		
	0,7257	0,7148	0,7283		

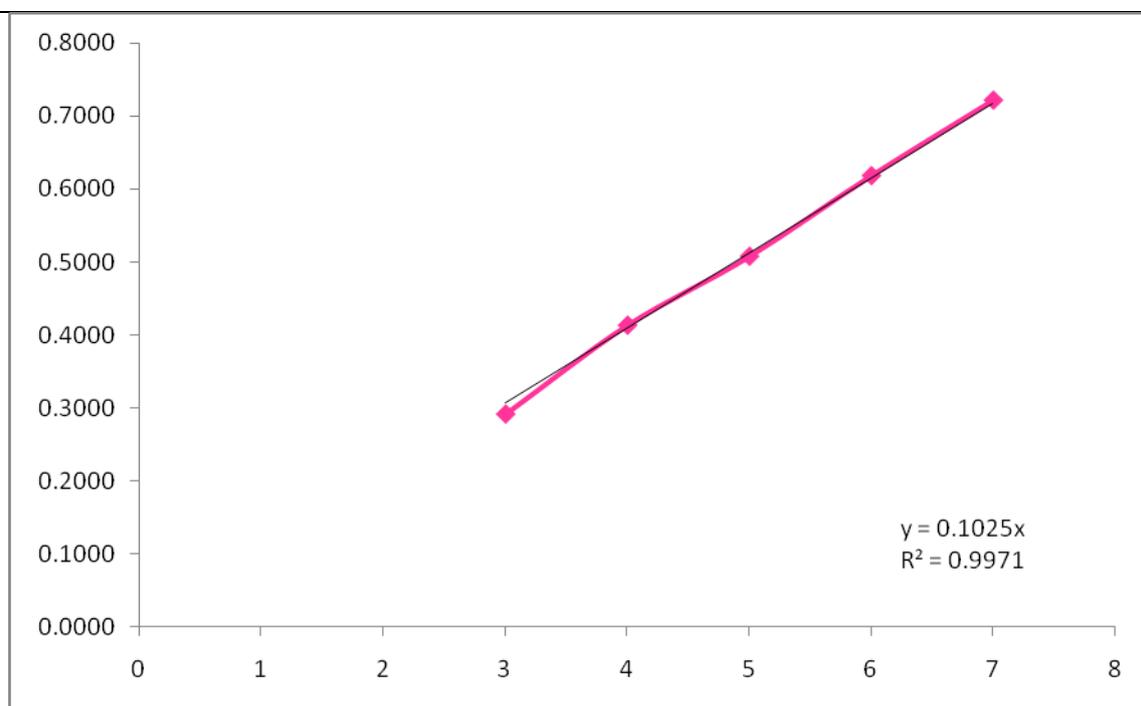


FIG. 13: Curva analítica obtida para quantificação de flavonóides totais em termos de quercetina, em solução de etanol/água (20: 80).

4.6.2 Teste de doseamento de flavonóides totais na formulação

Tomou-se 1mL de cada verniz e dissolveu-se para 10mL com solução contendo 50% de ácido acético em água Milli-Q. A dispersão foi então agitada em banho de ultrassom por 30 minutos e mantida sob agitação magnética por 24 horas para completa extração dos flavonóides totais. Em seguida, a dispersão foi filtrada e o filtrado foi diluído com uma solução de 50% de ácido acético em água para concentrações dentro da faixa de trabalho. A absorvância da solução foi mensurada em espectrofotômetro a 425 nm para determinação da concentração de flavonóides totais em termos de quercetina.

4.6.3 Teste de liberação prolongada

Dentes bovinos obtidos *post mortem* foram utilizados para aplicação dos vernizes neste teste. Foram utilizadas dez coroas de dentes incisivos cortados em quatro, com ponta diamantada, em caneta de alta rotação. Cada verniz foi aplicado na superfície vestibular de cada fragmento dentário, sendo que foram usados cinco fragmentos para cada verniz e um fragmento para o verniz branco em cada grupo. A aplicação foi realizada em duas etapas: primeiro aplicando-se 20 μ L e, depois de secar, mais 20 μ L. Aguardou-se 24 horas para que o verniz secasse sobre a superfície do dente (FIGURA 14) e logo após, cada fragmento foi adicionado ao tubo de coleta. Em seguida, a cada tubo de coleta foi adicionado 1mL de solução 20% etanol em água. Os tubos de coleta foram então incubados em agitador de bancada IKA® KS4000 iconcontrol a 37°C e 30 rpm e, em tempos regulares, a solução era retirada e adicionado novo volume de meio. Cada amostra de solução (240 μ L) foi colocada em placa com 96 poços e em cada poço foi adicionado 10 μ L de solução de cloreto de alumínio. A leitura foi realizada em aparelho de ELISA (TECAN® infinite) a 425 nm.

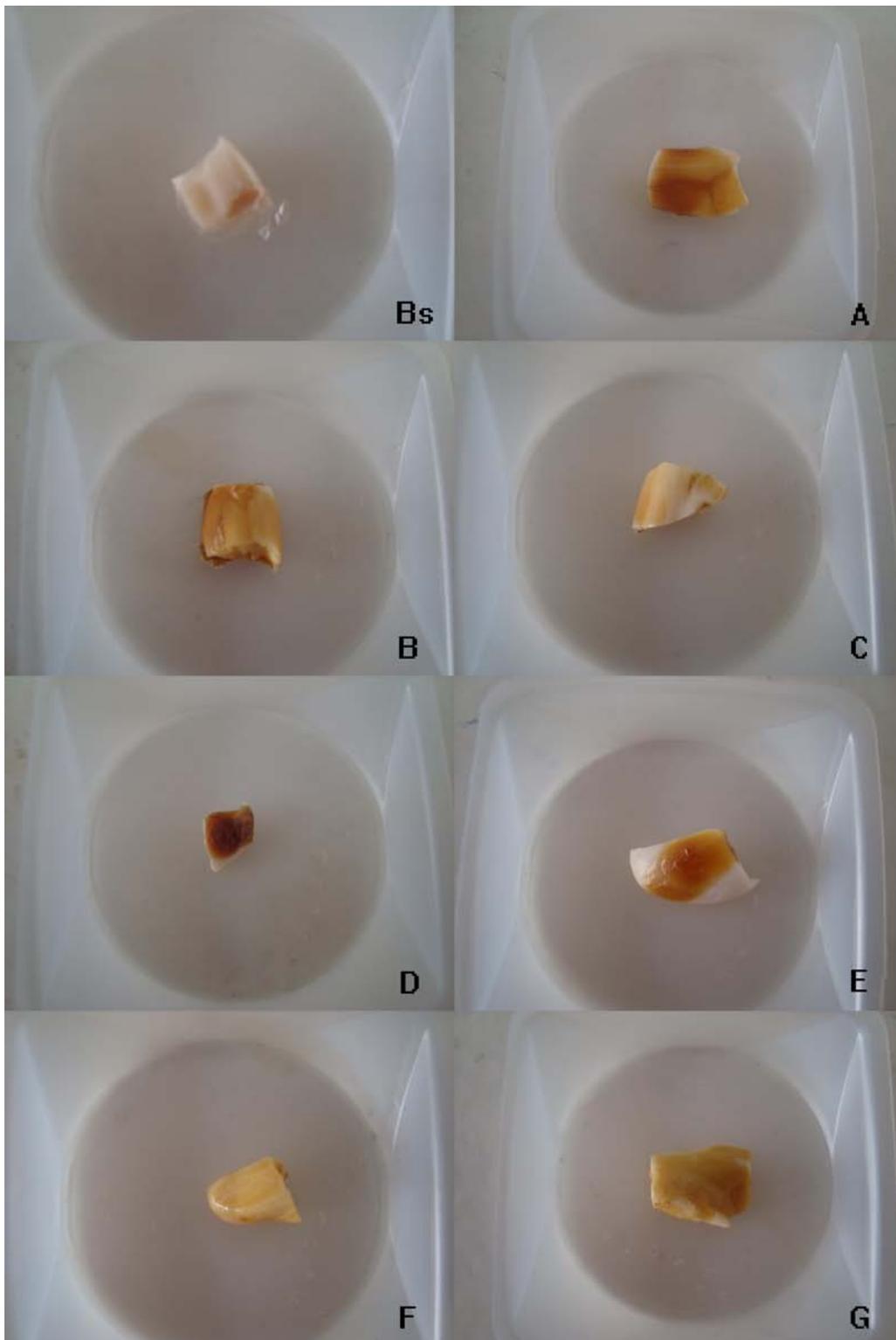


FIG.14: Dentes bovinos contendo vernizes aplicados e secos.

Legenda: Bs (verniz base), A (verniz A), B (verniz B), C (verniz C), D (verniz D), E (verniz E), F (verniz F), G (verniz G).

5. RESULTADOS

5.1 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

TABELA 9: Teste de susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* a vernizes poliméricos de quitosana contendo própolis e vernizes controles. Médias e Desvios-padrões (M± DP) dos halos de inibição (mm) obtidos em três experimentos independentes.

Vernizes	Zona de Inibição (mm; M ± DP)			
	<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Streptococcus sanguinis</i>	
	24h	48H	24	48h
EEP (25%)	7,52±0,66	7,14±0,29	9,86±0,54	9,43±0,42
VA (15%)	8,79±0,86	8,79±0,44	10,91±0,79	10,23±0,35
VB (10%)	8,92±0,68	8,46±0,61	10,48±0,61	9,84±0,57
VC (5%)	7,99±0,79	7,85±0,68	10,45±1,16	9,59±0,52
VD (7,5%)	7,47±0,43	7,36±0,38	9,98±0,61	9,51±0,34
VE (5%)	7,70±1,00	7,55±0,76	9,02±0,76	8,83±0,64
VF (10%)	7,15±0,69	9,53±1,07	9,53±1,07	8,69±0,70
VG (5%)	4,97±0,85	5,01±1,10	8,64±0,63	8,41±0,82
VBs	0,00	0,00	0,00	0,00
VCT	10,74±1,33	10,75±0,76	15,34±1,15	15,66±1,35
VFI	0,00	0,00	0,00	0,00

Legenda: EEP (extrato etanólico de própolis verde a 25%); VA (verniz A), VB (verniz B), VC (verniz C), VD (verniz D), VE (verniz E), VF (verniz F), VG (verniz G), VBs (verniz base), VCT (verniz de clorexidina/timol), VFI (verniz de flúor).

Todos os vernizes poliméricos a base de quitosana e própolis inibiram o crescimento de *S. mutans* e *S. sanguinis*. Na TABELA 9, os resultados são

mostrados através da média das medidas das zonas de inibição e seus desvios padrões ($M \pm DP$) para todos os vernizes testados. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e foram considerados significantes em 5%. Uma amostra do teste da atividade antimicrobiana dos vernizes pode ser observada na FIGURA 15.

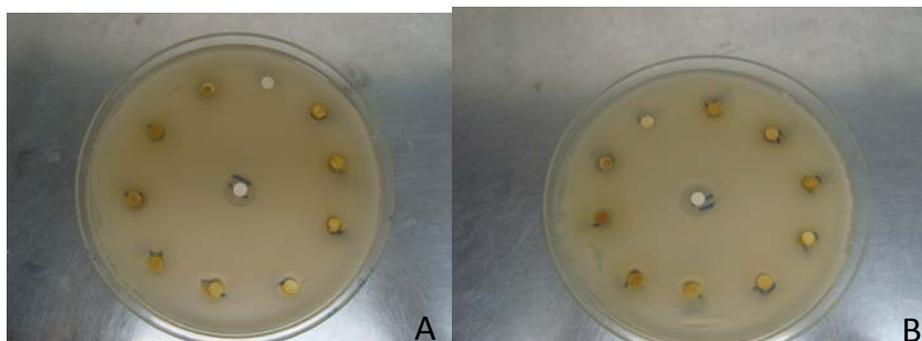


FIG. 15: Teste de susceptibilidade antimicrobiana a *Streptococcus sanguinis* a vernizes de quitosana contendo própolis e vernizes controles. Teste de difusão em ágar. Halos de inibição após 24 (A) e 48 horas (B).

Os resultados mostram que, após 24 horas, o verniz B exibiu o maior halo de inibição para *S. mutans* ($8,92 \pm 0,68$), enquanto que o verniz A mostrou o maior halo de inibição contra *S. sanguinis* ($10,91 \pm 0,79$) no mesmo período.

Após 48 horas, o verniz F apresentou halos de inibição maiores para *S. mutans* ($9,53 \pm 1,07$) enquanto, contra o *S. sanguinis*, os maiores halos de inibição foram observados para o verniz A ($10,23 \pm 0,35$).

Não se observou halos de inibição para o verniz polimérico à base de quitosana sem própolis, bem como para o verniz de flúor contra os dois microorganismos testados.

Por outro lado houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tamanhos dos halos de inibição observados para a o controle positivo clorexidina/timol (VCT) em 24 horas ($10,74 \pm 1,33$) e em 48 horas ($10,75 \pm 0,76$) para *S. mutans*, quando comparados com os halos menores dos vernizes EEP, VC, VD, VE, VBs e VG. Observou-se diferença significativa entre os vernizes VCT e VF ($7,15 \pm 0,69$) apenas no período de 24 horas.

Não se observou diferença estatística significativa ($p < 0.05$) contra *S. mutans* quando comparados os halos de inibição do verniz de clorexidina/timol (VCT) ($10,75 \pm 0,76$) e os vernizes A ($8,79 \pm 0,86$ / $8,79 \pm 0,44$) e B ($8,92 \pm 0,68$ / $8,46 \pm 0,61$), respectivamente, nos dois períodos analisados de 24 e 48 horas.

Não se observou diferença significativa entre todos os vernizes poliméricos a base de quitosana contendo própolis verde testados contra o crescimento de *S. mutans* nos períodos de 24 e 48 horas.

Para *S. sanguinis*, observou-se diferença estatisticamente significativa nas medidas dos halos de inibição quando comparados com o verniz de clorexidina/timol (VCT) ($15,34 \pm 1,15$ / $15,66 \pm 1,35$), respectivamente, nos períodos de 24 e 48 horas. Por outro lado, não houve diferença significativa nas médias dos halos de inibição observados quando comparados todos os vernizes poliméricos contendo própolis entre eles nos períodos analisados de 24 e 48 horas. Entretanto, os vernizes A, B e C demonstraram melhores performances de inibição de *S. sanguinis* nos períodos de 24 e 48 horas quando comparados com os demais vernizes contendo própolis.

5.2 Teste de citotoxicidade sobre osteoblastos

A FIGURA 16 abaixo demonstra a porcentagem de células viáveis após 24 horas. Os resultados demonstraram que somente o verniz base (VBs), que possui apenas quitosana em sua formulação, apresenta diferença estatística significativa com os demais grupos testados, pois permitiu a proliferação celular dos osteoblastos 120%, de acordo com o número de células encontradas no início do experimento. Por outro lado, os outros vernizes viabilizaram 80% das células que havia inicialmente, demonstrando baixa citotoxicidade desses materiais de acordo com as normas ISO 10993-5, que considera um produto citotóxico quando ele permite abaixo de 50% da viabilidade celular a. A análise

estatística de variância (ANOVA) aplicada a esse teste numa significância de 5% não demonstrou diferença estatística entre os vernizes.

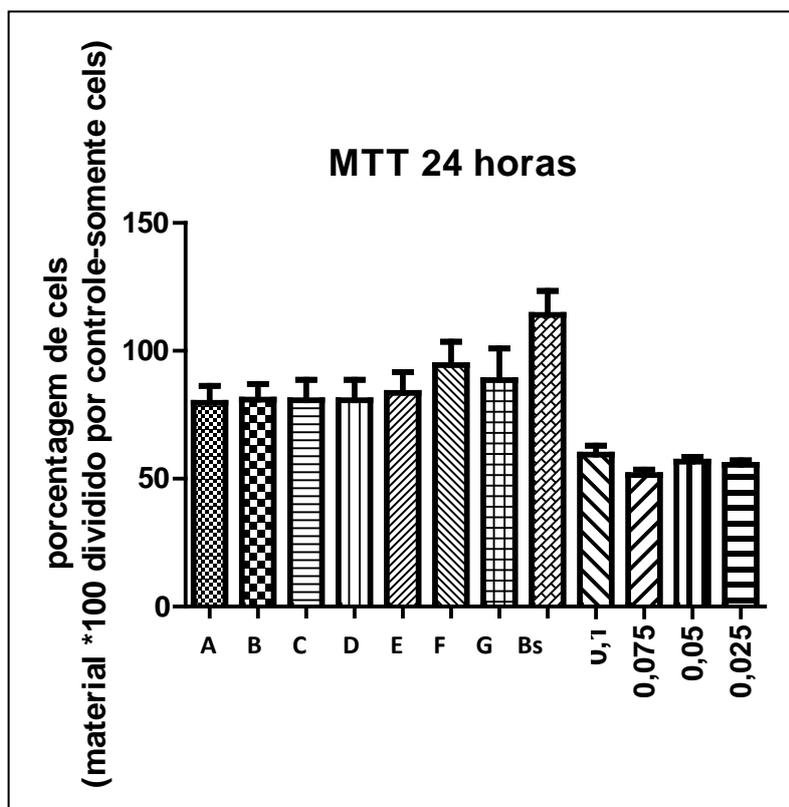


FIG. 16. Número de células viáveis (%) após 24 horas em contato com vernizes poliméricos de quitosana contendo própolis e verniz contendo somente quitosana da esquerda para direita verniz A, verniz B, verniz C, verniz D, verniz E, verniz F, verniz G, verniz Bs, LSS a 0,1%, 0,075%, 0,05% e 0,025%. Abcissas: número de células viáveis. Ordenadas: vernizes e controle.

5.3 Teste de liberação prolongada

As FIGURAS 17 a 19 mostram as curvas do desempenho dos vernizes poliméricos a base de quitosana contendo própolis durante a liberação prolongada dos flavonóides totais da própolis verde em termos de quercetina. O perfil de liberação prolongada foi muito heterogêneo e essa característica ocorreu, provavelmente, em função do perfil físico dos vernizes que eram mais viscosos ou mais fluidos dependendo da concentração da própolis adicionada ao verniz base. Esses perfis poderão ter influenciado no tempo de liberação dos flavonóides.

Pode-se observar que o verniz A, cuja formulação contém 15% de própolis, desenhou uma curva de liberação de 20% do produto nas primeiras 8 horas após o início do experimento. Entretanto, não houve liberação de quercetina quantificável nas primeiras quatro horas e paralizando a liberação após as 8 horas iniciais voltando a liberar quercetina 24 horas depois. Após 24 horas houve uma liberação de maior quantidade tornando-se constante durante 10 semanas (Gráfico A).

O Gráfico B mostra a liberação prolongada do verniz B que contém 10% de própolis verde na sua formulação. Observa-se que não houve liberação de quercetina nas primeiras 2 horas iniciais do experimento, após o que o produto foi liberado e interrompendo essa liberação após 7 horas. Essa inatividade durou 72 horas e a liberação recomeçou após esse tempo. No verniz B 30% dos flavonóides totais foram liberados em três semanas.

O perfil de liberação de quercetina do verniz C é mostrado no Gráfico C. Esse verniz que tem 5% de própolis verde na sua formulação só iniciou a liberação dos flavonóides após 8 horas o início do teste e somente 10% de quercetina foi liberado e em apenas 24 horas.

O verniz D que possui 7,5% de própolis verde na sua formulação não liberou flavonóides em até 24 horas após o início do experimento, começando somente a liberá-los a partir de 15 dias (duas semanas). Após sete semanas, 100% dos flavonóides totais foram liberados (Gráfico D). Isso pode ser devido a essa formulação ter menos ácido acético, portanto, a quitosana pode não ter solubilizado adequadamente, levando à hidrofobia da formulação, impedindo a penetração da água e, conseqüentemente, a liberação do ativo.

O Gráfico 5 mostra o perfil de liberação da quercetina pelo verniz E que contém 5% de própolis na sua formulação. Este verniz liberou os flavonóides totais nas primeiras 8 horas e mais de 60% deles durante quatro semanas.

Nessa formulação, a própolis está em menor quantidade, tornando o verniz menos hidrofóbico, o que promove uma liberação mais lenta.

O verniz F que contém 10% de própolis verde liberou 40% dos flavonóides totais nas primeiras 8 horas de teste e tornando-se contínua a liberação após esse período (Grafico 6).

O Grafico 7 exhibe a curva de liberação prolongada do verniz G que contém 5% de própolis verde na sua formulação. Quercetina foi liberada em apenas 10% durante a primeira hora do experimento, não registrando atividade de liberação após esse período.

Tanto o verniz F quanto o verniz G foram feitos a partir do gel homogêneo e possuem menor quantidade de quitosana. Isso pode ter determinado a liberação dos flavonóides totais numa grande quantidade nas primeiras horas, influenciando no perfil de liberação dessas formulações.

Em termos de liberação imediata, próximo a 8 horas, os melhores desempenhos foram observados para os vernizes E e F. Desempenho mediano foi observado para os vernizes G e A. Os piores desempenhos foram observados para os vernizes B, C e D.

O verniz A teve o melhor desempenho em termos de liberação prolongada, enquanto o verniz D teve o um bom desempenho a partir de 2 semanas e o verniz E porque liberou constantemente em 4 semanas.

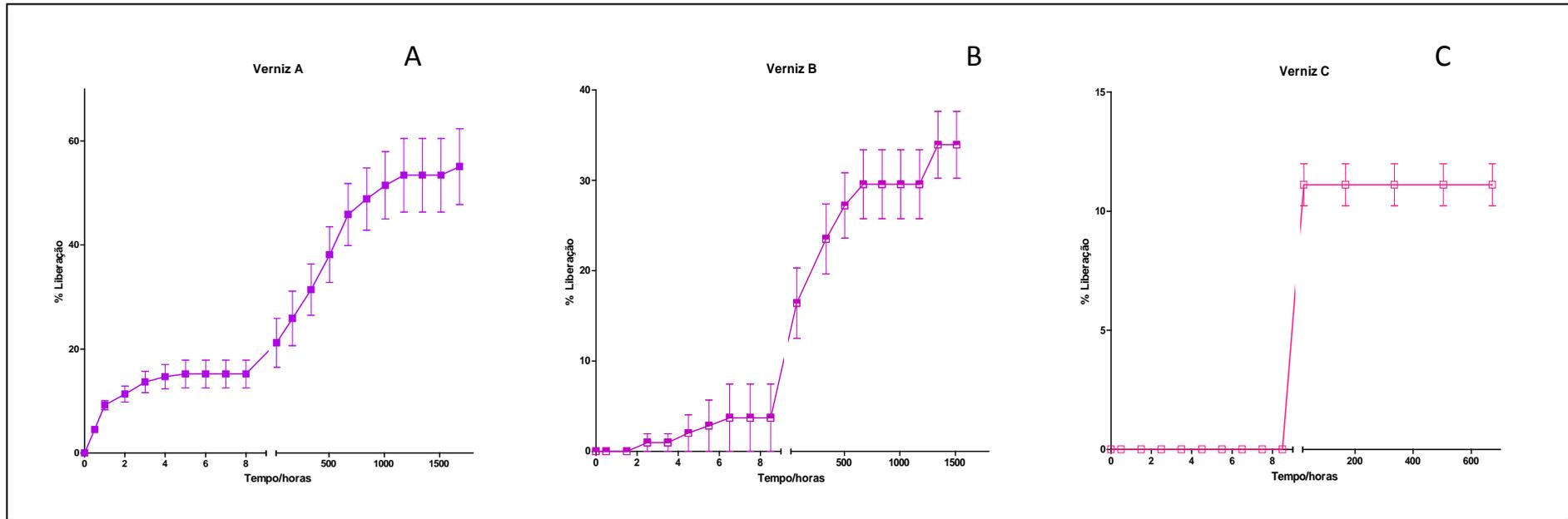


FIG.17: Gráficos representando o perfil de liberação do verniz A (A), verniz B (B) e verniz C (C).

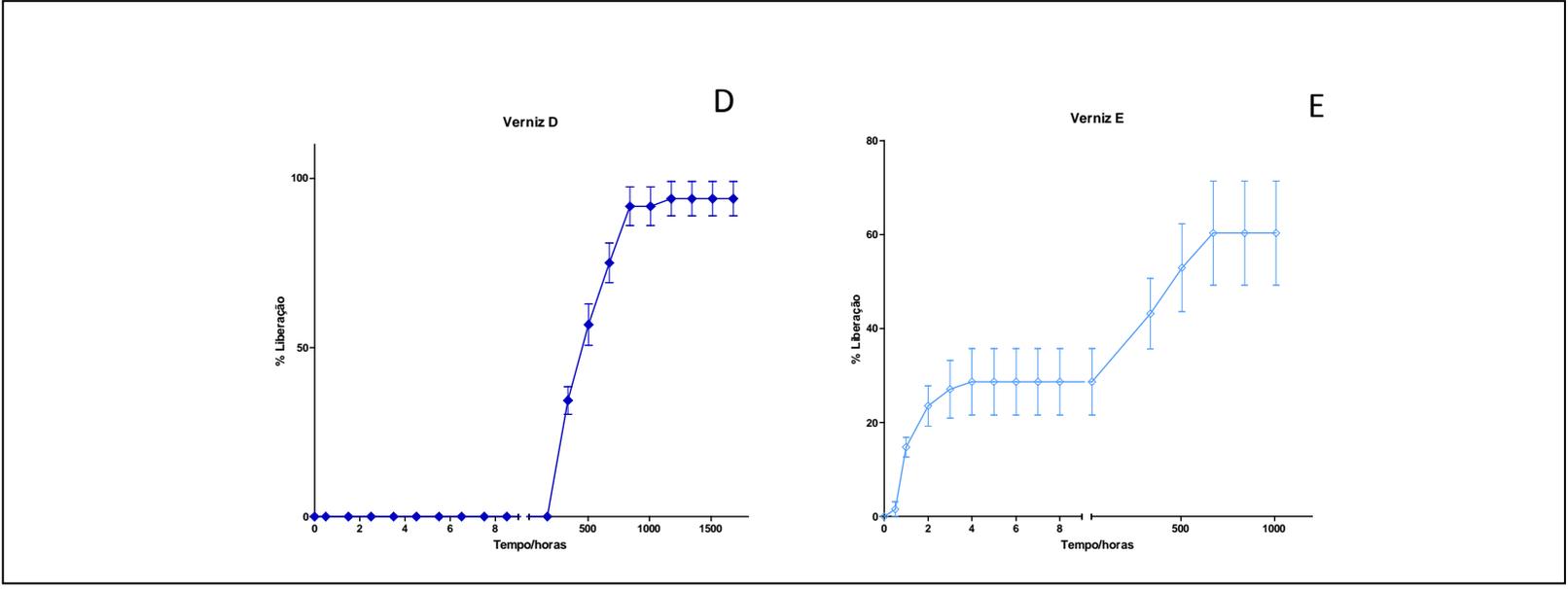


FIG.18: Gráficos representando o perfil de liberação do verniz D (D) e verniz E (E).

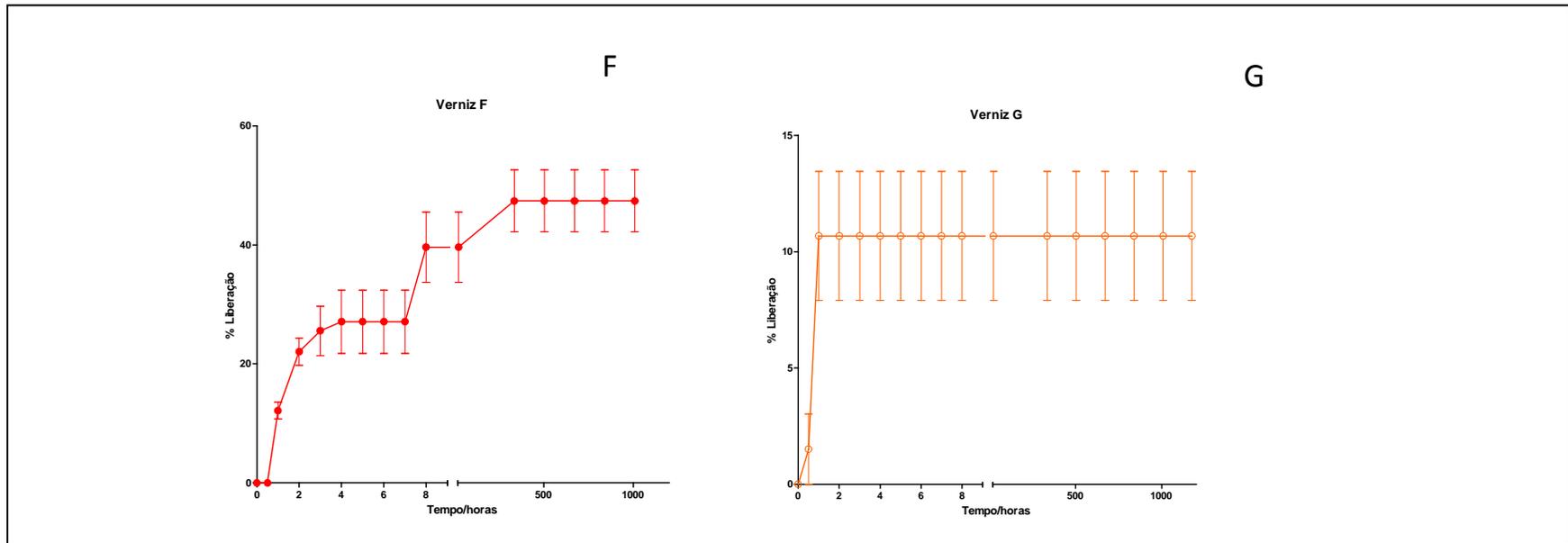


FIG.19: Gráficos representando o perfil de liberação do verniz F (F) e verniz G (G).

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo foram desenvolvidas formulações farmacêuticas a base de quitosana com diferentes proporções de extrato etanólico de própolis verde e realizadas análises *in vitro* de seu potencial antimicrobiano, citotóxico e o perfil de liberação de cada um dos produtos. Essa formulação é inovadora, pois a própolis verde brasileira e a quitosana formam um verniz polimérico que se adere ao dente, produto que permitiu a requisição do depósito de patente no INPI, através da Coordenadoria de Transferência de Inovação Tecnológica da UFMG, sob o nº 014100004357 em 13/12/2010 (ANEXO 2).

O extrato etanólico de própolis verde derivada da *Baccharis dracunculifolia*, planta nativa na região Sudeste do Brasil (própolis tipo 12), utilizado neste trabalho é produzido e comercializado pela Pharmanéctar®, empresa que utiliza amostras padronizadas da própolis verde bruta, o que garante a presença dos principais compostos bioativos desta própolis no verniz polimérico (TABELA 1). Esses compostos possuem propriedades antiinflamatórias e antibacterianas comprovadas, como artepilin C, kaempferol, quercentin e pinobanskin-3-acetato (BURDOCK, 1998; SANTOS *et al.*, 2002; PAULINO *et al.*, 2008; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008, PEREIRA *et al.*, 2011), possuindo controle de qualidade comprovado de acordo com as normas ISO 9001 e GMP internacional.

A própolis vem sendo estudada devido às várias atividades biológicas que ela possui, dentre elas, seu potencial antimicrobiano principalmente sobre bactérias gram-positivas (BANKOVA *et al.*, 2005b; SFORCIN *et al.*, 2007) e gram-negativos (PAULA *et al.*, 2006). Os resultados do teste de susceptibilidade antimicrobiana sobre *Streptococcus* do grupo *mutans* e *S. sanguinis* demonstraram que a própolis, mesmo quando associada ao verniz, é liberada de forma satisfatória, mantendo sua propriedade antimicrobiana, o que

torna viável o uso do fármaco para esse fim (DUAILIBE *et al.*, 2007; FERNANDES JR., *et al.* 2007; KOO, *et al.*, 2002). Todas as formulações testadas inibiram o crescimento de *S. mutans* e *S. sanguinis* em maior ou menor grau. Essa diferença no tamanho dos halos de inibição entre as formulações pode ter ocorrido devido à concentração do extrato etanólico de própolis presente na formulação e a forma em que ela foi feita. O verniz G não formou halos de inibição nas primeiras 24 horas de experimento. Assim como nas demais concentrações de própolis os vernizes mostraram uma lentidão na liberação nas primeiras 24 horas. Essas características devem ter dificultado a liberação do componente antimicrobiano da formulação através do ágar, necessitando das 48 horas de experimento para hidratar o corpo de prova e liberar a própolis. Isso pode estar relacionado ao perfil molecular da própolis que possui uma diversidade de compostos químicos, com características físico-químicas diferentes entre elas o que pode contribuir para a difusão do produto no ágar, conforme preconizado por HINDLER & JORGENSEN (1995). Essa diferença também pode se aplicar quando comparados os halos de inibição observados para a clorexidina, que tem característica de solubilidade e padrão molecular único que permite sua melhor difusão no ágar (BEKHUIS, 2011; GUGGENHEIM & MEIER, 2011).

As maiores zonas de inibição foram observadas para *S. sanguinis*, demonstrando maior sensibilidade do microorganismo ao novo produto durante o experimento. Da mesma forma, *S. mutans* mostrou menor sensibilidade ao produto tanto em 24 como em 48 horas, resultado que não corrobora com outros estudos feitos com a susceptibilidade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis verde sobre esses microorganismos *in vitro*, que demonstraram grande atividade deste produto sobre esses microorganismos (LIBÉRIO *et al.*, 2009; PAULA *et al.*, 2006). Essas diferenças poderão estar relacionadas com o tipo de meio de cultura utilizado pelos outros autores que fizeram seus estudos utilizando Ágar Infuso Cérebro Coração (BHI – do inglês *Brain Heart Infusion*

Agar) ou mesmo devido à variedade nas cepas de microorganismos utilizadas neste e naqueles experimentos.

Os microorganismos do grupo *Streptococcus* são os colonizadores iniciais da superfície dentária, responsáveis pela formação inicial do biofilme dental. O *Streptococcus sanguinis* possui adesinas que se ligam à película adquirida do esmalte e começam a formação do biofilme dental. Já os *Streptococcus mutans* não são tão eficientes quanto a essa característica, dependendo do *Streptococcus sanguinis* para se aderir à superfície do esmalte dentário. Portanto, a atividade antimicrobiana que o verniz de própolis verde exerceu sobre *S. sanguinis* pode demonstrar que será eficaz na prevenção da formação do biofilme dental cariogênico (FEJERSKOV & KIDD, 2005).

OLIVEIRA (2007) avaliou a capacidade de inibição da aderência da lectina de duas plantas (*Talisia esculenta* e *Labramia bojeri*) a cinco bactérias, dentre elas os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. A lectina é uma proteína presente nessas plantas que tem capacidade de reconhecer e se ligar glicoconjugados da parede celular de microorganismos e assim, inibir sua mobilidade e multiplicação. Essa proteína exerceu efeito inibitório sobre *S. mutans*, mas não conseguiu resultado satisfatório contra *S. sanguinis*. Apesar dos nossos experimentos diferirem daqueles autores quanto aos tipos de produtos, a susceptibilidade dessa bactéria ao verniz de quitosana contendo própolis verde e não a outro extrato vegetal pode indicar que esse produto terá sucesso na prevenção e controle do biofilme dental.

Os mecanismos da atividade da própolis na inibição do crescimento de microorganismos ainda não estão claros. Alguns componentes presentes na própolis, como flavonóides (quercetina, galangina, pinocebrina), ácido cafeico, ácido benzoico e ácido cinâmico, provavelmente atuam sobre a membrana microbiana ou na superfície da parede celular, causando danos estruturais e funcionais (MELLO *et al.*, 2006; AGA *et al.*, 1994). Sua atividade

contra microorganismos está mais relacionada ao efeito sinérgico de seus compostos (flavonóides, compostos fenólicos e outros) do que aos compostos individualmente (ÖZAN *et al.*, 2007, PAULA *et al.*, 2006).

O verniz base, composto apenas por quitosana, não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhum dos microorganismos testados neste trabalho. Esse resultado não corrobora com os estudos que vem sendo feitos e que encontram resultados favoráveis a essa atividade na literatura (DECKER *et al.*, 2005; FUJIWARA *et al.*, 2004). Isso pode ser devido à quitosana de médio peso molecular usada na formulação do verniz, que não é solúvel em água, ao contrário da quitosana de baixo peso molecular utilizada em outros trabalhos. Além disso, todos os vernizes foram testados depois de secos, sejam filmes (corpos de prova endurecidos após a evaporação), o que também pode ter impedido que a quitosana exercesse seu potencial antimicrobiano nessa forma.

A quitosana é um polissacarídeo natural não tóxico, biocompatível e versátil quimicamente. Essas propriedades permitem que este material seja utilizado em sistemas de liberação de drogas e em engenharia de tecidos, prometendo ser uma ferramenta nos cuidados com a saúde (THANOU *et al.*, 2001; ILLUM, 1998). A toxicidade da quitosana depende do nível de desacetilação da quitina e de seu peso molecular, aumentando de acordo com sua densidade. Mesmo assim, a maioria dos derivados de quitosana possui baixa toxicidade (KEAN & THANOU, 2010), o que pôde ser verificado no teste de citotoxicidade com osteoblastos realizado neste trabalho. O verniz base contendo somente quitosana, além de não ter apresentado toxicidade, permitiu a proliferação celular, aumentando sua quantidade em 20%. As formulações que continham o EEP apresentaram baixa toxicidade, mantendo 80% da viabilidade celular, apresentando diferença estatística apenas com o verniz base.

Os extratos aquosos e alcoólicos de própolis não causam irritação aos tecidos (GHISALBERTI, 1979) e são considerados relativamente não tóxicos (BURDOCK, 1998).

Soluções experimentais de enxaguante bucal contendo própolis não demonstraram significativa atividade inibitória de microorganismos tão efetiva quanto à clorexidina, mas observou-se menor citotoxicidade em fibroblastos gengivais humanos (ÖZAN *et al.*, 2007). Por outro lado, PEREIRA *et al.* (2011) obteve resultados satisfatórios tanto na redução da gengivite como na adesão dos pacientes ao tratamento com enxaguante bucal contendo 5% de própolis verde. Apesar dos dois trabalhos apresentarem metodologia de estudos com veículos diferentes nas formulações, neste estudo observaram-se resultados que comprovam a liberação da própolis existente no novo produto, tanto no teste de susceptibilidade antimicrobiana com os corpos de prova, em que a clorexidina (VCT) teve maior halo de inibição, como no teste de citotoxicidade com osteoblastos pelo ensaio com MTT.

Embora estudos anteriores demonstrassem que o extrato etanólico de própolis seja citotóxico sobre fibroblastos pulpare (AL-SHAHER *et al.*, 2004) e células cancerígenas (LI *et al.*, 2009) este estudo demonstrou que nas concentrações testadas e nas associações ao extrato etanólico de própolis ao verniz de quitosana, a citotoxicidade do verniz contendo própolis foi considerada baixa. Outro estudo avaliou a capacidade de frações de própolis derivada da *Trigona sp* com e sem flavonóides em promover o retardo da inflamação pulpar e estimular a formação de dentina reparadora em dentes de ratos. Os autores demonstraram que a fração da própolis que continha flavonóides inibiu a inflamação pulpar e promoveu a formação de dentina reparadora, comprovando a capacidade antiinflamatória dos flavonóides e sua baixa citotoxicidade (SABIR *et al.*, 2005).

Em outro estudo, o potencial citotóxico de nanopartículas de quitosana sobre células cancerígenas foi avaliado e concluíram que as nanopartículas permitiram uma interação maior com as células tumorais, levando a uma citotoxicidade significativa deste material (MEHROTRA *et al.*, 2011). Outro estudo avaliou a biocompatibilidade de um nanocompósito contendo quitosana e hidroxiapatita sobre células L929 e osteoblastos para ser aplicado em engenharia de tecidos. Este estudo concluiu que o material é biocompatível, pois apresentou baixa citotoxicidade contra fibroblastos L929, e ainda é osteocompatível e osteoindutor, pois permitiu a proliferação de osteoblastos *in vitro* (PRAMANIK *et al.*, 2009). Resultado similar pôde ser verificado neste estudo, em que o verniz contendo apenas quitosana permitiu a proliferação dos osteoblastos em 20%. Apesar do verniz contendo quitosana e própolis verde ter sido desenvolvido com finalidade antimicrobiana, o verniz contendo apenas quitosana pode ter uma nova aplicação distinta daquela para que foi desenvolvido, merecendo novos estudos que comprovem essa atividade.

Embora outros extratos vegetais com atividade antioxidante já tenham sido encapsulados em nanopartículas de quitosana (LEE *et al.*, 2010), o potencial dessas nanopartículas para liberação controlada de extratos vegetais não foi avaliado em nenhum trabalho descrito na literatura. Nanopartículas poliméricas de ácido poli-lático (PLA) foram utilizadas para veicular quercitrina isolada de extratos vegetais de *Albizia chinensis* e, nesse caso, a velocidade de liberação da quercitrina foi superior à velocidade de liberação do extrato encontrada nesse trabalho (100 % de liberação em 300 horas) (KUMARI *et al.*, 2011).

O teste de liberação prolongada realizado no verniz de própolis verde e quitosana demonstrou um perfil de liberação diferente para cada formulação. Essa característica individual de cada formulação pode viabilizar sua aplicação para uma finalidade específica na prática clínica, portanto, todos podem ser utilizados em diferentes especialidades. Além disso, pôde-se verificar que

todas as formulações possuem uma boa adesividade durante todo o período de experimentação, além de não mudar a coloração do esmalte dentário, mesmo não realizando testes de alteração de cor específicos e validados.

O perfil de liberação do verniz A (15%), que possui maior quantidade de extrato etanólico de própolis em sua formulação, se manteve estável nas primeiras horas de experimento e depois persistiu liberando durante aproximadamente dois meses em torno de 50% dos flavonóides totais contidos na formulação. A maior concentração de própolis permitiu uma liberação mais constante, o que garantiria uma atividade antimicrobiana eficaz e prolongada quando aplicada clinicamente, características importantes para o controle do biofilme dental cariogênico.

Por não ter liberado quercetina nas primeiras duas horas de experimento e não ter mantido certa regularidade, o verniz B (10%) permitiria a proliferação de microorganismos durante o período de inatividade, apesar de ter apresentado resultado satisfatório no teste de susceptibilidade antimicrobiana. Pelo exposto, seu perfil de liberação não representaria uma atividade antimicrobiana não tão eficaz na prática clínica.

O verniz C (5%) não liberou quercetina nas primeiras 8 horas de teste, o que permitiria a proliferação bacteriana na cavidade bucal durante muito tempo após ter sido aplicado. Além disso, a liberação de apenas 10% da quercetina no meio e em apenas 24 horas limitaria a indicação desta formulação de verniz, com o objetivo pelo qual foi desenvolvido, na prática clínica.

O verniz D (7,5%) foi o que levou mais tempo para iniciar a liberação da quercetina (cerca de duas semanas), e foi a única formulação que liberou 100% do ativo durante o experimento. Esse perfil de liberação não favorece a capacidade antimicrobiana do verniz, demonstrando sua falha em liberar lenta e continuamente o composto ativo em questão, no caso, a própolis. Além disso, por ser um verniz

de baixa viscosidade, tem uma consistência mais fluida e essa característica pode ter permitido que a própolis fosse liberada nessa quantidade.

Entretanto, o verniz E (5%) demonstrou um perfil de liberação menos hidrofóbico, pois nesta formulação a própolis está em menor quantidade. Ao contrário do verniz C, que possui a mesma concentração, houve liberação expressiva nas primeiras oito horas de experimento e mais de 60% da quercetina em quatro semanas. Essa quantidade de própolis liberada no meio pode ter ocorrido também devido à consistência desse verniz, que é mais fluida. Além disso, o perfil de liberação favoreceria uma atividade antimicrobiana contínua através desta formulação, apesar do teste de susceptibilidade contra *Streptococcus mutans* e *sanguinis* não ter lhe conferido o melhor resultado.

O verniz F (10%) também demonstrou um perfil contínuo e prolongado da liberação da quercetina durante todo o experimento, sendo que, nas primeiras oito horas de teste, liberou em torno de 40% do ativo, ao contrário do verniz G (5%), que liberou apenas na primeira hora de experimento e só 10% do ativo. As duas formulações foram preparadas pela adição do extrato etanólico de própolis no verniz de quitosana, porém, demonstraram perfis de liberação totalmente diferentes. A quantidade de extrato etanólico de própolis pode ter influenciado em sua liberação, pois o verniz que contém maior quantidade (VF) é o que tem um perfil mais lento e prolongado.

RODRIGUES *et al.* (2009) avaliaram a liberação de filmes de quitosana contendo dexametasona e concluiu que este polímero permitiu a liberação lenta e prolongada do fármaco testado. Quase 90% da droga foi liberada nas primeiras oito horas de experimento, resultado que não foi obtido com nenhuma das formulações de vernizes. Esse resultado pode ser justificado devido às características diferentes dos princípios ativos contidos no filme de quitosana usado no estudo (dexametasona) e neste trabalho (própolis verde). Além disso, não é o objetivo da formulação do verniz liberar todo o seu princípio ativo nas primeiras horas após ter sido aplicado, mas sim que ele permaneça por pelo

menos 24 horas aderido à superfície dentária liberando a própolis de forma regular e contínua, para que sua atividade antimicrobiana seja efetiva.

7. CONCLUSÕES

a) Formulações de verniz à base de quitosana contendo diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis verde brasileira foram desenvolvidas.

b) O teste de susceptibilidade antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* revelou que todos os vernizes apresentaram atividade antimicrobiana contra esses microorganismos.

c) O teste de citotoxicidade sobre osteoblastos apresentou resultados de baixa citotoxicidade para todas as formulações testadas.

d) Os testes de liberação lenta e prolongada de todas as formulações apresentou perfis distintos entre eles. O perfil de liberação do verniz A foi o mais estável e prolongado.

e) Com base nesses resultados, o verniz A possui as melhores condições para ser aplicado clinicamente, merecendo estudos que comprovem essa eficácia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*; Nov: 5721–5732, 2005.
2. AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosc Biotechnol Biochem*; 58(5): 945 – 946, 1994.
3. AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Food Chem*; 52: 7286–7292, 2004.
4. AHN, M.R.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T. Suppression of tumor induced angiogenesis by brazilian propolis: major component artepilin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. *Canc Lett*; 252: 235-243, 2007a.
5. AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; Z. H.U. F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem*; 101: 1400-1409, 2007b.
6. AL-SHAHER, A.; WALLACE, J.; AGARWAL, S.; BRETZ, W.; BAUGH, D. Effects of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod*; 30: 359-361, 2004.
7. AMARAL, R.C.; GOMES, R.T.; ROCHA, W.M.S.; ABREU, S.L.R.; SANTOS, V. R. Periodontitis treatment with Brazilian green propolis gel. *Pharmacology*; 3: 336-341, 2006.

8. ARNAUD, T.M.S.; NETO, B.B.; DINIZ, F.B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an *in vitro* evaluation. *J Dent*; 38:848–852, 2010.
9. AURICCHIO, M.T.; BUGNO, A.; ALMODÓVAR, A.A.B.; PEREIRA, T.C. Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*; 65: 209-212, 2007.
10. AWALE, S.; SHRESTHA, S.P.; TEZUKA, Y.; UEDA, J.Y.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. *J Nat Prod*; 68: 858-864, 2005.
11. BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidol*; 29: 361-367, 1998.
12. BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidol*; 31: 3-15, 2000.
13. BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharm*; 100: 114–117, 2005a.
14. BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complem and Altern Med* 2, 29–32, 2005b.
15. BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S.H., Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytot Res*; 15: 561–571, 2001.
16. BEKHUIS, T. Chlorhexidine varnish may prevent dental caries in children and adolescents. *Evid Based Dent Pract*, 11(2): 84-6, 2011.

17. BOWEN, W.H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res*; 45:69-86, 2011.

18. BOYANOVA, L.; GERGOVA, G.; NIKOLOV, R.; DEREJIAN, S.; LAZAROVA, E.; LATSAROV, N.; MITOV, I.; KRASTEVA, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains *in vitro* by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J. Med. Microbiol.*; 54: 481-483, 2005.

19. BOYANOVA, L.; KOLAROV, R.; GERGOVA, G.; MITOV, I. *In vitro* activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe*; 12: 173-177, 2006.

20. BREX, M. Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodont. 2000*; 15: 100-108, 1997.

21. BUMGARDNER, J.D.; WISER, R.; ELDER, S.H.; JOUETT, R.; YANG, Y.; ONG, J.L. Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium. *J Biomater Sci Polym Ed*; 14: 1401–1409, 2003.

22. BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol*; 36: 347-363, 1998.

23. BUSSADORI, S.K.; SILVA, P.E.; OLIVEIRA, T.C.; MOTTA, L.J. Uso de vernizes de flúor e de clorexidina na promoção de saúde bucal. *Rev Assoc Paul Cirur Dent*; 58: 359-362, 2004.

24. CALDERÓN-MONTAÑO, J.M.; BURGOS-MORÓN, E.; PEREZ-GUERRERO, C.; LOPÉZ-LÁZARO, M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*; 11(4): 298-344, 2011.

25. CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*; 1: S1-S6, 2002.

26. CIZMARIK, J.; MACICKA, M.; MATEL, I. *Propoleos - Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización con fines terapêuticos - Analisis y critica de las teorías acerca de la formacion del propoleos. Bucarest: Apimondia (175 p), 1975.*

27. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. 16th Informational Supplement. CLSI document M100-S15 (ISBN 1- 56238-556-9). Wayne, PA: CSLI 2005.

28. COSYN, J.; WYN, I.; DE ROUCK, T.; COLLYS, K.; BOTTENBERG, P.; MATTHIJS, S.; MORADI-SABZEVAR, M. Short-term anti-plaque effect of two chlorhexidine varnishes. *J Clin Period*; 32: 899–904, 2005.

29. CUESTA, A.; RODRIGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish and Shellfish Immun* 18: 71–80, 2005.

30. DECKER, E.M.; VON OHLE, C.; WEIGER, R.; WIECH, I.; BRECX, M. A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *J Periodont Res*; 40: 373–377, 2005.

31. DIGE, I.; RAARUP, M.K.; NYENGAARD, J.R.; KILIAN, M.; NYVAD, B. *Actinomyces naeslundii* in dental biofilm formation. *Microbiology*; 155: 2116-2126, 2009.

32. DUAILIBE, S.A.C.; GONÇALVES, A.G.; AHID, F.J.M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. *J Appl Oral Sci*; 15(5):420-3, 2007.

33. ENDLER, A. L.; OLIVEIRA, S. C.; AMORIM, C. A.; CARVALHO, M. P.; PILEGGI, M. *Publ. UEPG Cien. Biol. Saúde*; 9: 17-20, 2003.

34. FEATHERSTONE, J.B. Delivery challenges for fluoride, clorexidine and xylitol. *Bmc Oral Health*; 6 (Suppl I): S8, 2006
35. FEJERSKOV, O.; KIDD, E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Ed. Santos, São Paulo, 352 p., 2005.
36. FERNANDES JR, A.; ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FUNARI, S.R.C.; BARBOSA, L. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J Venom Anim Toxins*; 7(2):173-82, 2007.
37. FISCHER, G.; CLEFF, M. B.; DUMMER, L. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VILELA, C. O.; CAMPOS, F. S.; STORCH, T.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S.O.; VIDOR, T. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Veter. Immunol Immunopath*; 116: 79–84, 2007.
38. FISCHMAN, S. L. The history of oral hygiene products: how far have we come in 6000 years?. *Periodontology 2000*; 15: 7-14, 1997.
39. FRANCO-NETO, C. A.; PAROLO, C. C. F.; RÖSING, C. K.; MALTZ, M. Comparative analysis of the effect of two chlorhexidine mouthrinses on plaque accumulation and gingival bleeding. *Braz Ora. Res*; 22: 139-144, 2008.
40. FREITAS, S.F.; SHINOHARA, L.; SFORCIN, J.M.; GUIMARAES, S. *In vitro* effects of propolis on *giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*; 13: 170–175, 2006.
41. FUJIWARA, M.; HAYASHI, Y.; OHARA, N. Inhibitory effect of water soluble chitosan on growth of *Streptococcus mutans*. *New microbiology*; 27:83-6, 2004.
42. FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. *Cienc Tecnol Aliment*; 26:171-178, 2006.

43. GERALDINI, C. A. C.; SALGADO, E. G. C.; RODE, S. M. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária - avaliação ultra-estrutural. *Pós-Grad. Rev Fac Odonto. S J Campos*; 3: 37-42., 2000.
44. GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. *Bee World*; 60: 59-84, 1979.
45. GRÉGIO, A. M. T.; LIMA, A. A. S.; RIBAS, M. O.; BARBOSA, A. P. M.; PEREIRA, A. C. P.; KOIKE, F.; REPEKE, C. E. P. Efeito da *Propolis mellifera* sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. *Estud Biolog*; 27: 43-47, 2005.
46. GUGGENHEIM, B.; MEIER, A. *In vitro* effect of clorexidine mouthrinses on polyspecies biofilms. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*; 121(5): 432-441, 2011.
47. HINDLER, J.A.; JORGENSEN, J.H. Procedures in antimicrobial susceptibility testing. In Mahon, C.R. and Manuselis Jr. Text Book of Diagnostic Microbiology. W.B. Saunders Company. Chapter 3, *Concepts in Antimicrobial Therapy*. Phyladelphia, Pensilvania, p. 49-111, 1995.
48. HSIEH, C.Y.; TSAI, S.P.; WANG, D.M.; CHANG, Y.N.; HSIEH, H.J. Preparation of a pga/chitosan composite for tissue engineering matrices. *Biomater*; 26: 5617–5623, 2005.
49. ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*; 15:1326-1331, 1998.
50. INTERNATIONAL STANDARD FOR BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES - Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5:2009.
51. ITO, J.; CHANG, F.R.; WANG, H.K.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K.H. Anti-aids agents anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from brazilian propolis. *J Nat Prod*; 64: 1278–1281, 2001.

52. JAMES, P.; PARNELL, C.; WHELTON, H. The caries-preventive effect of clorexidine varnish in children and adolescents: a systematic review. *Caries Res*; 44: 333-340, 2010.
53. JANSON, H. Studies on periodontitis and analyses of individuals at risk for periodontal diseases. *Swed Den. J*; 180: 5-49, 2006.
54. JASPRICA, I.; MORNAR, A.; DEBELJAK, Z.; SMOLCIC-BUBALO, A.; MEDIC-SARIC, M.; MAYER, L.; ROMIC, Z.; BUCAN, K.; BALOG, T.; SOBOCANEC, S.; SVERKO, V. *In vivo* study of propolis supplementation effects on anti-oxidative status and red blood cells. *J Ethnopharm*; 110: 548–554, 2007.
55. KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, Biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*; 62: 3-11, 2010.
56. KITTUR, F.S.; KUMAR, A.B.V.; VARADARAJ, M.C.; THARANATHAN, R.N. Chitooligosaccharides-preparation with the aid of pectinase isozyme from *aspergillus niger* and their antibacterial activity. *Carbohydr Res*; 340: 1239–1245, 2005.
57. KADAKOV, V. P.; MULEARCHUK, M. D. Aminoácidos encontrados en el propoleos. *Pchelovodstvo*; 12: 34, 1978.
58. KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*; 46(5):1302-9, 2002.
59. KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y. U.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*; 64: 235–240, 1999.

60. KUMARI, A.; YADAV, S. K.; PAKADE, Y. B.; KUMAR, V.; SINGH, B.; CHAUDHARY, A.; YADAV, S. C. Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Coll and Surf B: Biointerfaces*; 82: 224–232, 2011
61. LEE, J.; KIM, G.; LEE, H. G. Characteristics and antioxidant activity of *Elsholtzia splendens* extract-loaded nanoparticles. *J Agric Food Chem*; 58: 3316-3321, 2010.
62. LENANDER-LUMIKARI, M.; LOIMARANTA, V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res*; 14: 40-47, 2000.
63. LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents of propolis from Myanmar and their structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull*; 32(12): 2075-2078, 2009.
64. LIBÉRIO, S.A., PEREIRA, A.L.A., ARAÚJO, M.J.A.M., DUTRA, R.P., NASCIMENTO, F.R.F., MONTEIRO-NETO, V., RIBEIRO, M.N.S., GONÇALVES, A.G., GUERRA, R.N.M. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J. Ethnopharmacol.* 125: 1-9, 2009.
65. LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Bras J Pharmacog*; 18: 447-454, 2008.
66. MANARA, L. R. B.; ANCONI, S. I.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W. A. Utilização da própolis em Odontologia. *Rev. FOB*; 7: 15-20, 1999.
67. MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*; 26: 83–99, 1995.
68. MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Z. Naturforsch*; 55: 76-86, 2000.

69. MARCUCCI, M. C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural contendo este produto de origem apícola. *Rev Fitos*; 1: 36-46, 2006.
70. MEHROTRA, A.; NAGARWAL, R.C.; PANDIT, J.K. Lomustine loaded chitosan nanoparticles: characterization and in vitro cytotoxicity on human lung cancer cell line L132. *Chem Pharm Bull*; 59(3): 315-320, 2011.
71. MELLO, A. M.; GOMES, R. T.; LARA, S. R.; SILVA, L. G.; ALVES, J. B.; CORTÉS, M. E.; ABREU, S. L.; SANTOS, V. R. The effect of brazilian propolis on the germ tube formation and cell wall of *Candida albicans*. *Pharmacology*; 3: 352-358, 2006.
72. MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq Inst Biol*; 72: 405-411, 2005.
73. MOURA, S. A. L.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; LIMA, L. D. C.; DOURADO, L. P. A.; MENDES, J. B.; ANDRADE, S. P.; FERREIRA, M. A. N. D.; CARA, D. C. Aqueous extract Brazilian Propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evidence-Based Compl. Altern. Med.*; 18: 1-9, 2009
74. MORAIS, F.A.I., MELLO, B.A., SOUZA, I.A., PONZI, E.A.C., REVOREDO, G.A. Polímeros a base de metil metacrilato. Importância em odontologia, *J Dentistry*; 6: 63-66, 2007.
75. MURATA, R.M.; BRANCO-DE-ALMEIDA, L.; FRANCO, E.M.; YATSUDA, R.; SANTOS, M.H.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; ROSALEN, P.L. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and development of dental caries in vivo by 7-epiclusianone and fluoride. *Biofouling*; 26(7): 865-872, 2010.
76. OLIVEIRA, B.H. Intraoral slow-release fluoride devices may decrease the incidence of dental caries in high-risk children. *J Evid Based Dent Pract*; 692:180-2, 2006.

77. OLIVEIRA, M.R.T.R.; NAPIMOGA, M.H.; COGO, K.; GONÇALVES, R.B.; MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; GROPPPO, F.C. Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. *J Oral Sci*; 49(2): 141-145, 2007.
78. ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.; BANKOVA, V. Effects of brazilian and bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *salmonella typhimurium*. *Int Immunopharm*; 5: 359–368, 2005.
79. ORSOLIC, N.; BASIC, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis. *Biomed & Pharmac*; 59: 561–570, 2005.
80. ÖZAN, F.; SÜMER, Z.; POLAT, Z. A.; ER, K.; ÖZAN, Ü.; DEGER, O. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. *Europ J Dent*; 1: 195-201, 2007.
81. PALOMO, F.; WANTLAND, L.; SANCHEZ, A. The effect of a dentifrice containing triclosan and copolymer on plaque formation and gingivitis. A 14- week clinical study. *Am J Dent*; 2: 231-237, 1989.
82. PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*; 50: 2502-2506, 2002.
83. PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F.; IKEGAKI, F. F. M. Atividades biológicas da própolis. *Rev OESP – Alimentação*; 27: 46-53, 1999.
84. PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.;FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*; 52: 1100-1103, 2004.

85. PARKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev. Bras. Farmacogn*; 17: 102-107, 2007.
86. PAULA, A. M. B., GOMES, R. T., SANTIAGO, W. K., DIAS, R. S., CORTÉS, M. E., SANTOS, V. R. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. *Pharmacology*; 3: 467-473, 2006.
87. PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Antiinflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Europ. J. Pharmacol.*; 587: 296–301, 2008.
88. PEÑA, R. C. Propolis standardization: a chemical and biological review. *Cien Inv Agr*; 35: 11-20, 2008.
89. PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M.; AQUINO-NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim. Nova*; 25: 321-326, 2002.
90. PEREIRA, E.M.R., SILVA, J.L.D.C., SILVA, F.F., DE LUCA, M.P., FERREIRA, E.F., LORENTZ, T.C., SANTOS, V.R. Clinical evidence of the efficacy of a mouthwash containing propolis for the control of plaque and gingivitis:a phase II study. *Evidence-Based Compl. Altern. Med.*; 18: 1-7, 2011
91. PESSAN, J.P; AL-IBRAHIM, N.S; BUZALAF, M.A.R; TOUMBA, K.J. Slow-release fluoride devices: a literature review. *J Appl Oral Sci*;16(4):238-44, 2008.
92. PETERSSON, L.G.; MAGNUSSON, K.; ANDERSSON, H.; ALMQUIST, B.; TWETMAN, S. Effect of quarterly treatments with a clorexidine and a fluoride varnish on approximal caries in caries-susceptible teenagers: a 3-year clinical study. *Caries Res*; 34:140-143, 2000.

93. PRAMANIK, N.; MISHRA, D.; BANERJEE, I.; KUMARMAITI, T. BHARGAVA, P.; PRAMANIK, P. Chemical synthesis, characterization and biocompatibility. Study of hydroxyapatite/chitosan phosphate nanocomposite for bone tissue engineering applications. *Int J Biomat*; 2009: 1-8, 2009.
94. PROPAVKO, S. Chemical Composition of Propolis, its origin and Standardization. *Pchelovodstvo*; 2:28, 1975.
95. RODRIGUES, L.B; LEITE, H.F; YOSHIDA, M.I; SALIBA, J.B; CUNHAJR, A.S; FARACO, A.A.G. *In Vitro* release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. *Int J Pharm*; 368:1-6, 2009.
96. RUSSELL, R.R. Changing concepts in caries microbiology; *Am J Dent*; 22:304-310, 2009.
97. SABIR, A.; TABBU, C.R.; AGUSTIONO, P.; SORROSENO, W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci*; 47(3): 135-138, 2005.
98. SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of brazilian propolis. *Evidence-Based Compl Altern Med*; 2: 33–38, 2005.
99. SANO, H.; SHIBASAKI, K.I.; MATSUKUBO, T.; TAKAESU, Y. Comparison of the activity of four chitosan derivates in reducing initial adherence of oral bacteria onto tooth surfaces. *Bul Tokyo Den Coll*; 42(4): 243-249, 2001.
- 100 SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol*; 80: 1-7, 2002.
- 101 SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*; 113: 1–14, 2007.

- 102 SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*; 133: 253–260, 2010
- 103 SFORCIN, J.M.; FERNANDES JR., A.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*; 73: 243–249, 2000.
- 104 SHIBASAKI, K.; MATSUKUBO, T; TAKAESU, Y. Cariostatic effect of low molecular weight chitosan in rats. *Shikwa Gakuho*; 95, 1-17, 1995.
- 105 SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C., ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evidence-Based Compl Altern Med*; 5: 313-316, 2008.
- 106 SIMÕES, C. C.; ARAÚJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Braz J Pharmacog*; 18: 84-89, 2008.
- 107 STROHMENGER, L.; BRAMBILLA, E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review. *Oral diseases*; 7: 71-80, 2001.
- 108 SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; KOWALCZYK-ZIOMEK, G.; KROL, W. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol*; 38(4):941-53, 2011.
- 109 THANOU, M.; VERHOEF, J.C.; JUNGINGER, H.E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv Drug Deliv Rev*; 52: 117-126, 2001.
- 110 TWETMAN, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res*; 38: 223-229, 2004.

- 111 UYSAL, T.; AKKURTB, M.D.; AMASYALIC, M.; OZCAND, S.; YAGCIE, A.; BASAKF, F.; SAGDICG, D. Does a chitosan-containing dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets? *Ang Orthod*; 81(2), 319-325, 2011
- 112 VAN DER MEI, H.C.; ENGELS, E.; DE VRIES, J.; DIJKSTRA, R.J.B.; BUSSCHER, H.J. Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci*; 115: 303–307, 2007
- 113 VERONESE, R. Própolis na clínica e cirurgia odontológica. *Revisão*. Disponível em: <http://www.brazilianapis.com/public/propolisclinicarespiratoriaeotorrinolarigologia.pdf>. Acesso: 13 de janeiro de 2009.
- 114 VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*; 73: 117-124, 2008.
- 115 ZHANG, Q.; VAN PALESTEIN-HELDERMAN, W.H.; VAN'T HOF, M.A.; TRUIN, G.J. Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults: a systematic review. *Eur J Oral Sci*; 114, 449-455, 2006

ANEXO 1

DESCRIÇÃO DA PATENTE

“VERNIZ POLIMÉRICO DE PRÓPOLIS”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve formulações farmacêuticas poliméricas capazes de veicular própolis, seu processo de preparação e aplicação. As formulações apresentadas podem ser produzidas a partir de polímeros naturais (por exemplo, quitosanas, celulose e derivados) ou sintéticos (por exemplo, derivados do ácido metacrílico), podendo ser utilizadas sobre a superfície do dente para a prevenção de cáries ou sobre superfícies mucosas para tratamento de doenças inflamatórias e bacterianas diversas, como aftas, periodontite e herpes.

ESTADO DA TÉCNICA

Apesar do declínio significativo em alguns países, como Estados Unidos, Canadá, Austrália e alguns países europeus, a cárie continua a ser um importante problema de saúde pública em outras partes do mundo como, por exemplo, no nordeste do Brasil. A cárie dental é a doença mais prevalente em humanos com incidência particularmente alta durante a infância (Hayacibara M F, Koo H, Rosalen P L, Duarte S, Franco E M, Bowen W H, Ikegaki M, Cury J A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development, Journal of Ethnopharmacology. v. 101. p. 110-115, 2005). A cárie é causada pela interação de múltiplos fatores relacionados como hospedeiros, micro-organismos, substrato e tempo (Libério S A, Pereira A L A, Araújo M J A M, Dutra R P, Nascimento F R F, Monteiro-Neto V, Ribeiro M N S, Gonçalves A G, Guerra R N M. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci, Journal of Ethnopharmacology. v. 125. p. 1-9, 2009). Há um número pequeno de micro-organismos que podem aderir ao dente e a microbiota cariogênica específica consiste de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* algumas espécies de *Actinomyces* (Hayacibara M F, Koo H, Rosalen P L, Duarte S, Franco E M, Bowen W H, Ikegaki M, Cury J A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development, Journal of Ethnopharmacology. v. 101. p. 110-115, 2005).

O uso de antimicrobianos para suprimir as bactérias cariogênicas é uma medida bem fundamentada (Zhang Q, Van Palestein-Helderman W H, Van't Hof M A, Truin, G J. Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults: a systematic review, *European Journal of Oral Science*. v. 114. n. 6. p. 449-455, 2006). Esses agentes interferem na colonização, no crescimento e no metabolismo bacteriano, promovendo dessa forma a desestruturação do biofilme dental (Bussadori S K, Silva, P E, Oliveira T C, Motta L J. Uso de vernizes de flúor e de clorexidina na promoção de saúde bucal, *Revista da Associação Paulista de Cirurgia Dental*. v.58. n.5. p. 359-362, 2004).

Os antimicrobianos de primeira-linha na prevenção da cárie dental são o flúor e a clorexidina, devido a sua atividade conhecida contra *Streptococcus mutans*. Esses antimicrobianos são frequentemente utilizados em pastas, enxaguatórios e géis, porém, suas atividades são significativamente reduzidas nesses veículos. Dessa forma, essas drogas têm sido usadas na forma de vernizes, que são formulações de liberação prolongada que proporcionam a formação de podem formar um filme antimicrobiano na superfície do dente formando uma barreira protetora contra cáries (STROHMENGER L, Brambilla E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review, *Oral Diseases*. n. 7. p. 71-80, 2001.)

O flúor é uma substância estudada desde 1930, como antimicrobiano conhecido e eficaz na desestruturação do biofilme e remineralização de manchas brancas cariogênicas. Após todos esses anos, seus efeitos tópicos têm dominado as medidas preventivas para o desenvolvimento da cárie. O tempo de contato entre a superfície dentária e o flúor é um fator crucial na eficácia da prevenção, o que motivou a elaboração dos vernizes fluoretados. O objetivo de um tratamento com esse material é prolongar o tempo de contato entre o flúor e a superfície do dente. (Strohmenger L, Brambilla E. The use of fluoride varnishes in the prevention of dental caries: a short review, *Oral Diseases*. n. 7. p. 71-80, 2001). No entanto, essa substância possui efeitos adversos. Se aplicado em excesso ou em jejum, pode causar reações tóxicas no organismo (náuseas, vômito) mesmo sob a forma de verniz. Hoje em dia, o uso racional do flúor fez-se necessário devido à grande incidência de fluorose nas crianças. Não é mais indicado o uso de pastas fluoretadas em crianças até 5 anos, salvo as que apresentam indicação específica para sua utilização, como quando ocorre grande incidência de cárie ou em habitantes de regiões que não possuem

água de abastecimento fluoretada(Guedes-Pinto A C. Odontopediatria, 7º Ed., Editora Santos, Santos, 2003).

A clorexidina vem sendo estudada nos últimos trinta anos como um agente antimicrobiano para o controle clínico da formação de biofilme e na prevenção de cáries. Ela pode ser encontrada numa variedade de formulações e veículos, tais como: enxaguatórios, pastas de dente, géis, fio dental impregnado e vernizes. Uma revisão da eficácia na inibição de *Streptococcus mutans* pela clorexidina concluiu que a redução mais persistente foi conseguida através dos vernizes, seguida pelo gel e enxaguatórios (Zhang Q, Van Palestein-Helderman W H, Van't Hof M A, Truin, G J. Chlorhexidine varnish for preventing dental caries in children, adolescents and young adults: a systematic review, European Journal of Oral Science. v. 114. n. 6. p. 449-455, 2006). No entanto, se utilizada em períodos prolongados sob a forma de enxaguatórios, a clorexidina pode causar o escurecimento dos dentes e gosto metálico na boca (Autio-Gold J. The role of clorexidine in caries prevention, Operative Dentistry. v. 33. n. 6. p. 710-716, 2008). Além disso, o verniz de clorexidina (Cervitec[®]) não é encontrado facilmente no mercado brasileiro além de apresentar um custo muito elevado.

Por outro lado, estudos recentes têm mostrado a atividade antimicrobiana de diferentes produtos naturais, sendo a própolis bastante conhecida pela sua atividade anticariogênica (Park Y K, Alencar S M, Aguiar C L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis, Journal of Agriculture and Food Chemistry. v. 50. n. 9. p. 2502-2506, 2002). Própolis é uma substância resinosa feita por abelhas. Ela possui diversas atividades biológicas, devido aos numerosos grupos de substâncias identificadas em própolis de diferentes localidades.

As substâncias mais comumente encontradas são chalconas, falvonóides, terpenóides e ácidos graxos. A maioria das atividades tem sido atribuída aos flavonóides (Libério S A, Pereira A L A, Araújo M J A M, Dutra R P, Nascimento F R F, Monteiro-Neto V, Ribeiro M N S, Gonçalves A G, Guerra R N M. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci, Journal of Ethnopharmacology. v. 125. p. 1-9, 2009). A atividade antimicrobiana tem sido associada aos flavonóides galadina e pirocembrina e aos ésteres de ácido fenólico (Bankova V S, Castro S L, Marcucci M C. Propolis: recent advances in chemistry and

plant origin, *Apidologie*. v. 31. p. 3-15, 2000; Burdock G A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis, *Food Chemistry and Toxicology*. v.36. n.4. p. 347-363, 1998; Cushnie T P T, Lamb A J. Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.26. n.5. p. 343-356, 2005; 14.

Grange J M, Davey R W. Antibacterial properties of propolis, *Journal of the Royal Society of Medicine*. v. 83. n. 3. p. 159-160, 1990; Koo H, Gomes B P F A, Rosalen P L, Ambrosano G M B, Park Y K, Cury J A. In vitro antimicrobial activity of propolis and arnica Montana against oral pathogens, *Archives on Oral Biology*. v. 45. n.2. p. 141-148, 2000; Koo H, Rosalen P L, Cury J A, Ambrosano G M B, Murata R M, Yatsuda R, Ikegaki M, Alencar S M, Park Y K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis against *Streptococcus mutans*, *Current Microbiology*. v. 41. n.3. p. 192-196, 2000; Koo H, Rosalen P L, Cury J A, Park Y K, Ikegaki M, Satter A. Effect of *Apis mellifera* propolis of two Brazilian regions on caries development in desalivated rats, *Caries Research*. v. 33. n.5. p. 393-400, 1999; Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, Vladmir-Knezevic S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products, *Acta Pharmaceuticalica*. s.l. v.55. p. 423-430, 2005; Marcucci M C, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova V S, De Castro S L, Dantas A P, Valente P H M, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities, *Journal of Ethnopharmacology*. v. 74. n. 2. p. 105-112, 2001).

Na propolis brasileira, também foi identificado o Artepilin C (Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), que também apresentou atividade antimicrobiana associada com a atividade anti-cariogênica da propolis verde (Aga H, Shibuya T, Sugimoto T, Kurimoto M, Nakajima S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. v. 58. n. 5. p. 945-946, 1994; Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis in dental caries in rats. *Caries Research*. v.25. p. 347-351, 1991).

A propolis possui maior poder antibacteriano sobre bactérias Gram-positivas, sendo pouco eficaz ou incapaz de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas, devido às grandes diferenças na constituição química da parede celular desses dois grupos de bactérias (Junior A F, Lopes M M R, Colombari V, Monteiro A C M, Vieira E P. Atividade antimicrobiana de propolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil, *Ciência Rural*. v. 36. p. 294-297, 2006). Um dos principais microrganismos responsáveis pela etiologia da cárie dental é o *Streptococcus mutans*. Estudos prévios

comprovaram a eficácia dos extratos etanólicos de própolis na inibição do crescimento desses microrganismos *in vitro* (Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Latsarov N, Mitov I, Krastev Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar diffusion and disc diffusion methods, *Journal of Medical Microbiology*. v. 54, p. 481-483, 2005; Park Y K, Koo M H, Abreu J A. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms, *Current Microbiology*. v. 36. p. 24-28, 1998; Paula A M B, Gomes R T, Santiago W K, Dias R S, Cortés M E, Santos V R. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to Brazilian green propolis extract, *Pharmacology online*. v. 3. p. 467-473, 2006). Em outro estudo, foi avaliado o efeito de um dos componentes do EEP, o ácido cinâmico, quanto a sua capacidade de inibir o desenvolvimento da cárie em ratos inoculados com *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus cricetus*. Concluiu-se que a cárie dental diminuiu consideravelmente nos ratos que receberam a solução de própolis, responsabilizando o ácido cinâmico por essa proteção (Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis in dental caries in rats. *Caries Research*. v.25. p. 347-351, 1991).

Como as atividades antimicrobiana e antiinflamatória da própolis têm sido amplamente relatadas na literatura, diversas formulações para aplicações odontológicas vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos, visando a utilização dessa propriedade. Na patente US 11.611.701 intitulada "Oral compositions comprising propolis", por exemplo, descreve-se a utilização de própolis associado a antimicrobianos catiônicos, agentes antiaderentes, agentes inibidores da formação de biofilme, agentes antiinflamatórios ou policarboxilatos lineares poliméricos aniônicos nas formas de enxaguatórios, dentifrícios, medicamentos ou filmes para tratamento de doenças periodontais. Já na patente US 10.450.231 intitulada "Oral compositions and use thereof" descreve-se a utilização das formulações contendo terpenóides e flavonóides (por exemplo, própolis) para prevenção ou tratamento de cáries, formação de placa, gengivite, candidíase, estomatite dental, ulcerações aftosas e infecções fúngicas. Nesse caso, as formulações patenteadas são os cremes ou géis dentais, pós, enxaguatórios, suspensões, emulsões, partículas, veículos mucoadesivos, comprimidos e gomas, nas quais se utiliza, quando necessário copolímero polivinilmetiléter com anidrido maléico e polímeros similares. A própolis também tem sido usada em formulações líquidas orais de sabor agradável em associação com

extratos de diversas plantas para promover alívio de irritações locais, promoção da saúde bucal e tratamento de doenças periondotais, com descrito na patente US 5.376.374 intitulada “Oral rinse composition”.

Como antimicrobiano natural, a própolis tem obtido bons resultados não só na área odontológica, como na farmacêutica e na médica. Com poderosas propriedades terapêuticas, ela se destaca pela ação anestésica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e cicatrizante. O extrato etanólico de própolis age inibindo o crescimento bacteriano por impedir a divisão celular e por produzir defeitos na parede celular, levando à bacteriólise parcial e à formação de bactérias pseudomulticelulares (policarióticos). Além disso, ele desorganiza o citoplasma, deixando-o cheio de espaços vazios e estruturas fibrosas, causando alteração na membrana citoplasmática e inibindo a síntese proteica (Takaisi-Kukini N B, Schilcher H. Electron microscopic investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* s.l. v. 60. p. 222-227, 1994).

Em virtude das outras atividades farmacológicas, a própolis também tem sido utilizada em associação com aloe vera, lidocaína e difenidramina no tratamento de doenças tópicas com dor e inflamação, como herpes simples, herpes labial, herpes genitais e aftas orais, dentre outras, como relatado na patente US 4.748.022, intitulada “Topical composition”. Nessa patente as formulações desenvolvidas continham apenas 1 a 2% de extrato.

Uma das diversas abordagens utilizadas na promoção da saúde bucal é o revestimento da superfície do dente ou da mucosa oral com uma formulação líquida de secagem rápida, capaz de formar uma espécie de filme. Para tal procedimento, foram desenvolvidas formulações na forma de vernizes, que possuem a propriedade de secarem rapidamente quando aplicadas em algumas superfícies. Na patente US 9.559.215 intitulada “Protective varnish for dentin” está descrita a produção de um verniz para tratamento de dentina a partir de polímeros polimerizáveis derivados de acrilato e metacrilato. O efeito antimicrobiano é obtido por 2,4,4'-tricloro-2-hidroxi-difeniléter (triclosan). Já na patente US 10.381.569 intitulada “Tooth coating composition” está relatada a produção de uma formulação capaz de promover a formação de filme na superfície do dente a partir de polímeros naturais ou sintéticos (especialmente derivados do metacrilato), solvente, modificadores reológicos e,

opcionalmente, opacificantes para uso cosmético e correção estética da superfície do dente. Na patente US 6.524.559 intitulada “Tooth coating composition” também se descreve formulações utilizadas para a cobertura de dente com boas propriedades secantes, utilizadas para estética e promoção de saúde bucal. As formulações são produzidas a base de shellac, resina e cimentos dentais. A patente 4.134.935 descreve a produção de vernizes dentais para reduzir o ataque da superfície dental pelas bactérias cariogênicas a partir de polímeros grafitizados. Na patente US 5.330.746 intitulada “Dental varnish composition, and method of use” relata-se a produção de vernizes dentais contendo antimicrobianos ou agentes antihipersensibilidade para prevenção de placa e cáries e tratamento de hipersensibilidade dental e de doenças periondotais. O agente antimicrobiano consiste em um sal de amônio quaternário e a base do verniz é um polímero acrílico.

A maioria dos trabalhos conduzidos até o momento utiliza polímeros não biodegradáveis. Além disso, copolímeros de acrilato são tóxicos (Morais F A I, Mello B A, Souza I A, Ponzi E A C, Revoredo G A. Polímeros a base de metil metacrilato. Importância em odontologia, International Journal of Dentistry v. 6. n. 2. P. 63-66, 2007). Por outro lado, polímeros biodegradáveis e atóxicos (por exemplo, quitosana) são capazes de formar filmes maleáveis e com boas propriedades (Rodrigues L B, Leite H F, Yoshida M Y, Saliba J B, Junior A S C, Faraco A A G. In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone Carrier, International Journal of Pharmaceutics. v. 368. p. 1-6, 2009).

Entre os polímeros que podem formar filmes, está a quitosana. A quitosana é um produto da desacetilação da quitina, um polímero amplamente distribuído na natureza, como, por exemplo, nos tecidos de sustentação de crustáceos e insetos. (Makino Y, Matugi H, Suzuki Y. Sustained release preparation Patent US 4,814,176; 1989) Quimicamente, a quitosana é um aminopolissacarídeo análogo à celulose, que apresenta um grupo amino no lugar da hidroxila da celulose na posição C-2. Este grupo é considerado fundamental para a sua solubilidade em meio aquoso ácido. Geralmente este grupo amino encontra-se na forma protonada, o que confere ao polímero carga positiva. A quitosana é obtida por meio da desacetilação alcalina da quitina e começou a ser usada como veículo em formulações farmacêuticas desde que foi descoberto se tratar de um polímero biodegradável, atóxico, inerte e biocompatível, características essas desejáveis e necessárias aos polímeros usados como veículos para fármacos (Liu W G, Yao K D. Chitosan and its derivatives - a

promising non viral vector for gene transfection. *Journal of Controlled Release*. v. 83, p. 1-11, 2002).

A associação de antimicrobianos a polímeros hidrofóbicos ou a polímeros hidrofílicos já foi descrita (patente US 11.931.895 intitulada “Antibiotic(s) polymer combination”) como também é conhecida a capacidade de alguns polímeros naturais em formar filmes na superfície dentaria, mas nunca foi descrita a utilização de polímeros naturais para a produção de vernizes para a veiculação de antimicrobianos, como a própolis, que poderiam ser utilizados para prevenção de carie e tratamento de outras doenças da cavidade oral e para aplicações tópicas sobre feridas expostas.

A patente JP3522186 descreve uma formulação formada a partir da incorporação de própolis em uma matriz de quitosana, a mesma se trata de um sistema emulsivo entre própolis e quitosana. Contudo, as emulsões são sistemas heterogêneos de baixa estabilidade, além de utilizarem solventes orgânicos na sua preparação. Porém, não foi descrito a obtenção de formulações contendo própolis e polímeros capazes de formar filmes na superfície do dente ou em outra superfície para a prevenção de cáries ou o tratamento tópico de doenças inflamatórias e infecciosas de origem bacteriana.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Espectro ATR-FTIR de filmes de quitosana (A), extrato de própolis seco (B) e filmes de quitosana contendo extrato de própolis (C)

Figura 2: Potencial de hidratação de filmes de quitosana (HACF) e filmes de quitosana contendo extrato de própolis (HAPF)

Figura 3: Micrografias eletrônicas de varredura da lateral do dente (a), da lateral do dente coberta com filme branco (b) e da lateral do dente coberta com verniz (c)

Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura da superfície do dente (a), da superfície do dente coberta com filme branco (b) e da superfície do dente coberta com verniz (c).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve formulações farmacêuticas poliméricas capazes de veicular própolis, seu processo de preparação e aplicação. As formulações apresentadas podem ser produzidas a partir de polímeros naturais ou sintéticos. As mesmas possuem a capacidade de secagem rápida e podem ser aplicadas sobre a superfície do dente para a prevenção de cáries ou sobre superfícies mucosas para tratamento de doenças inflamatórias e bacterianas diversas, como aftas, herpes e periodontite.

10 Exemplo 1: Preparação do verniz de própolis

Os vernizes de própolis foram preparados pela dispersão do polímero em veículo hidro-alcoólico, contendo o extrato. Inicialmente, o extrato alcoólico de própolis, diluído em álcool para a concentração de interesse, foi acidificado com ácido inorgânico, preferencialmente, HCl, H₃PO₄, H₂SO₄ ou ácido orgânico preferencialmente ácido acético,. O polímero foi, então, adicionado à mistura etanólica e, a seguir, o volume da formulação foi completado com água. A mistura foi, , agitada por 24 horas para a obtenção do verniz de própolis. Os vernizes brancos foram obtidos com o uso de etanol no lugar do extrato etanólico. A concentração do polímero nas formulações pode variar entre 0,5 e 20%, preferencialmente de 1 a 5%. A concentração final do extrato de própolis pode variar entre 0,1 a 50%, preferencialmente, de 5 a 15%. A concentração de ácido pode variar de 0,5 a 50%, sendo que, o extrato de própolis utilizado pode ser de qualquer origem botânica.

A porcentagem de álcool na formulação pode variar de 0 a 100%, preferencialmente, entre 40 e 80%. O pH das formulações foi determinado e apresentou valores compreendidos entre 1 e 7

Abaixo estão descritos exemplos de formulações:

Formulação 1: Verniz de própolis 15%

Constituinte	Quantidade
Extrato alcoólico de própolis	60,0 mL
Ácido acético	9,0 mL
Quitossana	1,0 g
Água PW q.s.p.	100 mL

Formulação 2: Verniz de própolis 10%

Constituinte	Quantidade
Extrato alcoólico de própolis	40,0 mL
Álcool absoluto	20,0 mL
Ácido acético	9,0 mL
Quitossana	1,0 g
Água PW q.s.p.	100 mL

Formulação 3: Verniz de própolis 5%

Constituinte	Quantidade
Extrato alcoólico de própolis	20,0 mL
Álcool absoluto	40,0 mL
Ácido acético	9,0 mL
Quitossana	1,0 g
Água PW q.s.p.	100 mL

Os filmes obtidos após a secagem das formulações foram posteriormente caracterizados.

Caracterização e propriedades das formulações 1, 2 e 3

5 Nos espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada, não são observadas novas bandas de absorção, indicando que não houve reação/interação entre a própolis e o polímero (Figura 1). O potencial de hidratação da formulação foi menor que 100% de ganho de peso em relação à massa inicial (Figura 2).

10 As formulações foram avaliadas quanto à capacidade de formação de filmes na superfície do dente e quanto ao tempo necessário para a formação dos mesmos, sendo que a formação dos filmes ocorreu em período inferior a 5 minutos. O verniz foi aplicado na superfície do dente e analisado por microscopia eletrônica de varredura. As imagens (Figuras 3 e 4) demonstram a formação de um filme contínuo, capaz de fechar os canalículos dentários bem como, uma perfeita adesão entre o filme e a
15 superfície do dente.

Os vernizes foram avaliados quanto à capacidade mucoadesiva através do teste de adesão a mucina porcina reconstituída. Os resultados apresentados nas tabelas 1 e 2 demonstram que as formulações apresentaram propriedades mucoadesivas. A análise estatística (ANOVA) comparando os dados entre todos os
20 grupos investigados foi conduzida através do pós-teste de Tukey, que mostrou que há diferença estatística entre todos os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 1: Teste de mucoadesão

Produto	Viscosidade média	Desvio-padrão
Formulação 1	Não mensurável	-
Formulação 2	Não mensurável	-
Formulação 3	Não mensurável	-
Mucina	3430	43
Mucina + Formulação 1	3870	35
Mucina + Formulação 2	3568	9
Mucina + Formulação 3	3720	22

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) do teste de mucoadesão com pós-teste de Turkey ($p < 0,05$)

Grupos	Valor de p
Mucina x Mucina + Formulação 1	<0,001
Mucina x Mucina + Formulação 2	<0,01
Mucina x Mucina + Formulação 3	<0,001

5

As formulações foram avaliadas quanto à atividade anti *Streptococcus mutans*, utilizando Agar Müeller-Hinton como meio de cultura, verniz de flúor e de clorexidina como controle positivo e formulações brancas como controle negativo. O halo de inibição foi medido após 48 horas de incubação (Tabela 3). A análise estatística (ANOVA) comparando os dados entre todos os grupos investigados foi conduzida através do pós-teste de Tukey, que mostrou que há diferença estatística entre os três exemplo e os vernizes branco e de flúor ($p < 0,05$), porém não há diferença entre as

10

formulações e o verniz de clorexidina ($p>0,05$). As formulações não diferem entre si ($p>0,05$) (Tabela 4).

5 Tabela 3: Halo de inibição das formulações contra *Streptococcus mutans* após 48 horas de incubação a 37 °C.

Formulação	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4
Branco	0,00	0,00	0,00	8,19
Clorexidina	23,20	17,53	20,40	19,00
Fluor	8,27	11,67	0,00	11,50
Exemplo 1	16,10	21,98	24,94	15,31
Exemplo 2	16,11	30,13	26,55	14,34
Exemplo 3	18,77	17,78	19,91	19,41

Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) do teste de atividade antimicrobiana com pós-teste de Turkey ($p<0,05$)

Grupos	Valor de p
Branco x Clorexidina	$p<0,001$
Branco x Flúor	$p>0,05$
Branco x Exemplo 1	$p<0,001$
Branco x Exemplo 2	$p<0,001$
Branco x Exemplo 3	$p<0,01$
Clorexidina x Flúor	$p<0,05$

Clorexidina x Exemplo 1	p>0,05
Clorexidina x Exemplo 2	p>0,05
Clorexidina x Exemplo 3	p>0,05
Flúor x Exemplo 1	p<0,05
Flúor x Exemplo 2	p<0,01
Flúor x Exemplo 3	p<0,05
Exemplo 1 x Exemplo 2	p>0,05
Exemplo 1 x Exemplo 3	p>0,05
Exemplo 2 x Exemplo 3	p>0,05

Os resultados apresentados demonstram que as formulações apresentaram boas propriedades de adesão ao dente, tempo de secagem reduzido, características físico-químicas e atividade antimicrobiana adequadas para a utilização.

5

Reivindicações

1. Verniz polimérico caracterizado por compreender extrato de própolis e polímero.

2. Verniz polimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela própolis ser apresentada preferencialmente na forma de extrato alcoólico.

3. Verniz polimérico de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pela própolis estar presente na concentração entre 0,1 a 50%.

4. Verniz polimérico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo polímero ser selecionado do grupo compreendendo polímeros naturais (celuloses, gomas, resinas, exudatos, gelatina, queratina, alginatos, celulose, galactomananas, quitosanas), seus derivados (metil,

10

15

- 5 hidroxipropil, acetofalato, acetado, metoxi, hidropropoxi, acetofalil), hidrolisados e sais (Li, Na, K, Ca, Mg, Al, Zn, Fe, Cu, Ni) , isolados, em associação ou na forma de co-polímeros e polímeros sintéticos (derivados do ácido acrílico - poliacrilato, poli-metilmetaacrilato, poli-etilacrilato, poli-etilmetacrilato, dentre outros).
5. Verniz polimérico de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo polímero ser preferencialmente quitosana.
- 10 6. Verniz polimérico de acordo com as reivindicações 4 e 5 , caracterizado pela concentração do polímero ser entre 0,5 a 20%.
7. Verniz polimérico de acordo com as reivindicações 1 a 6, caracterizado por apresentar pH entre 1 e 7.
- 15 8. Processo de obtenção de verniz polimérico, caracterizado por compreender as seguintes etapas:
- a) acidificação do extrato de própolis,
- b) adição de polímero,
- c) agitação por 24 horas, e
- d) aplicação em superfícies e secagem.
- 20 9. Processo de obtenção de verniz polimérico de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela própolis ser apresentada preferencialmente na na forma de extrato alcoólico.
10. Processo de obtenção de verniz polimérico de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pela própolis estar presente
- 25 na concentração entre 0,1 a 50%.
9. Processo de obtenção de verniz polimérico, de acordo com a reivindicação 7 a, caracterizado pelo ácido utilizado ser selecionado do grupo compreendo ácido acético, HCl, H₃PO₄, H₂SO₄, HNO₃, HF, HBr e HI.
- 30 10. Processo de obtenção de verniz polimérico, de acordo com a reivindicação 7 b, caracterizado pelo polímero ser

- 5 selecionado do grupo compreendo compreendo polímeros naturais (celuloses, gomas, resinas, exudatos, gelatina, queratina, alginatos, celulose, galactomananas, quitosanas), seus derivados (metil, hidroxipropil, acetofalato, acetado, metoxi, hidropropoxi, acetofalil), hidrolisados e sais (Li, Na, K, Ca, Mg, Al, Zn, Fe, Cu, Ni) , isolados, em associação ou na forma de co-polímeros e polímeros sintéticos (derivados do ácido acrílico - poliacrilato, poli-metilmetaacrilato, poli-etilacrilato, poli-etilmetacrilato, dentre outros).
- 10 11. Processo de obtenção de verniz polimérico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo polímero ser essencialmente quitosana.
- 15 12. Processo de obtenção de verniz polimérico, de acordo com as reivindicações 10 e 11, caracterizado pela concentração do polímero ser entre 0,5 a 20%.
- 20 13. Verniz polimérico, caracterizado por ser utilizado na cavidade oral para a prevenção de cáries, e no tratamento de periodontite e aftas.
14. Verniz polimérico, caracterizado por ser utilizado no tratamento e prevenção de doenças inflamatórias e infecciosas na pele e nas mucosas.

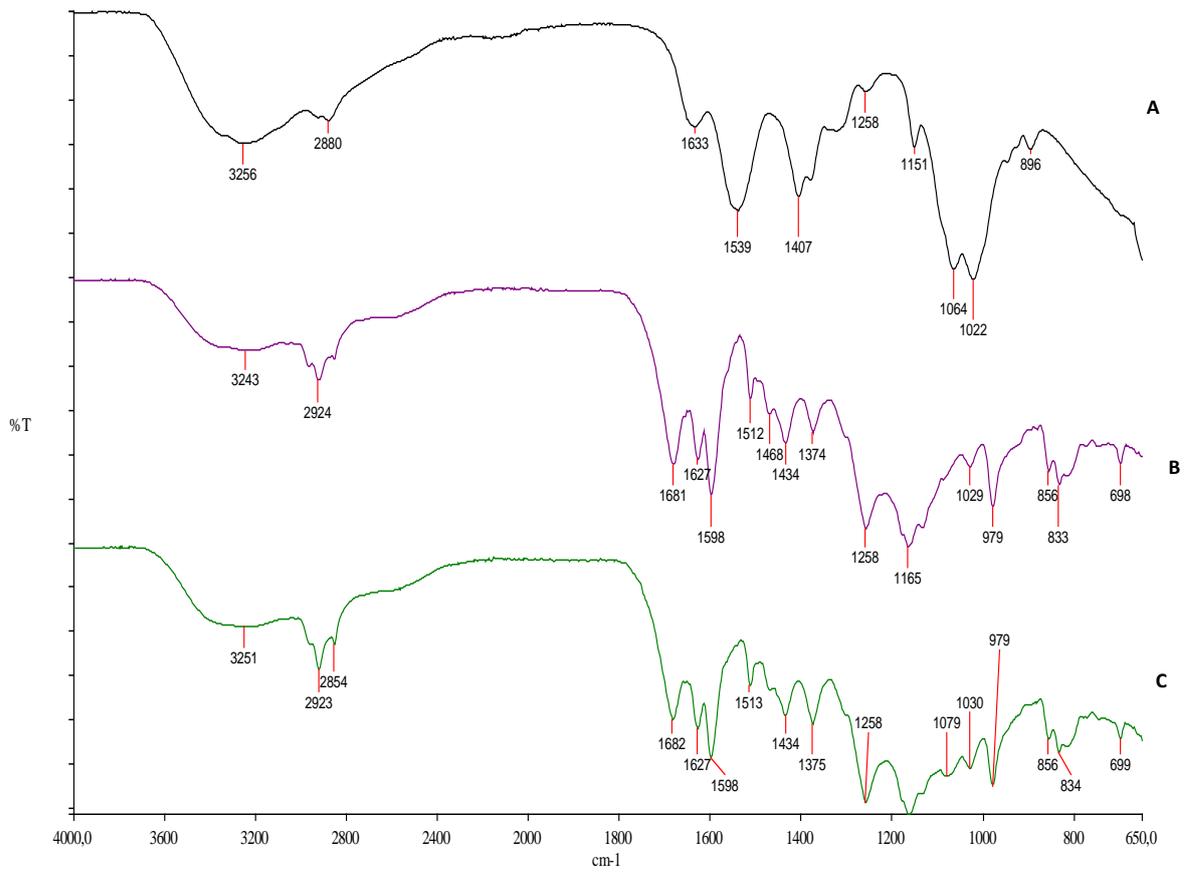
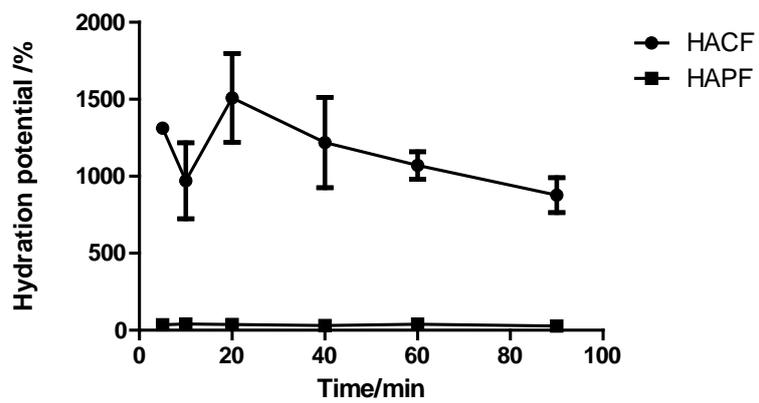
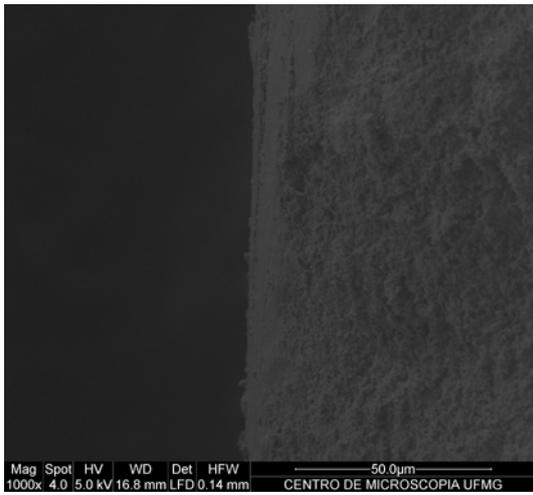


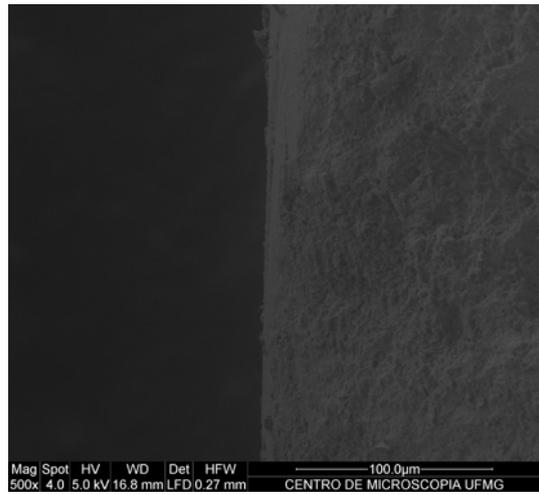
Figura 1



5 Figura 2

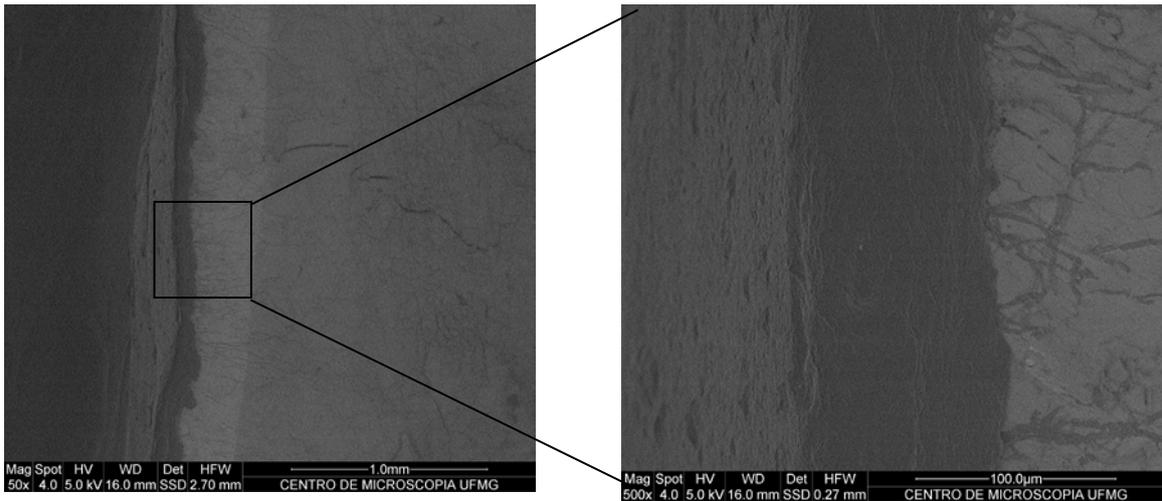


(a)



(b)

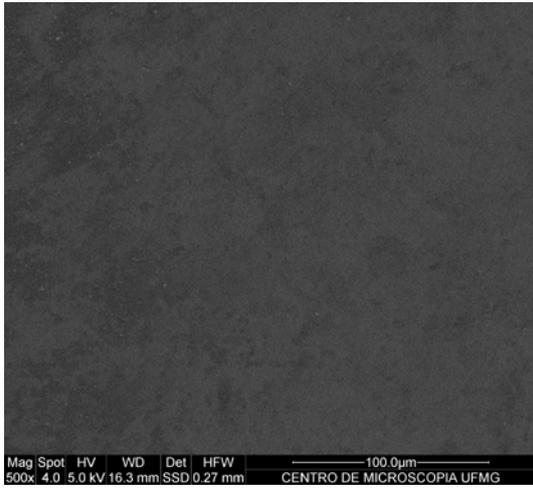
5



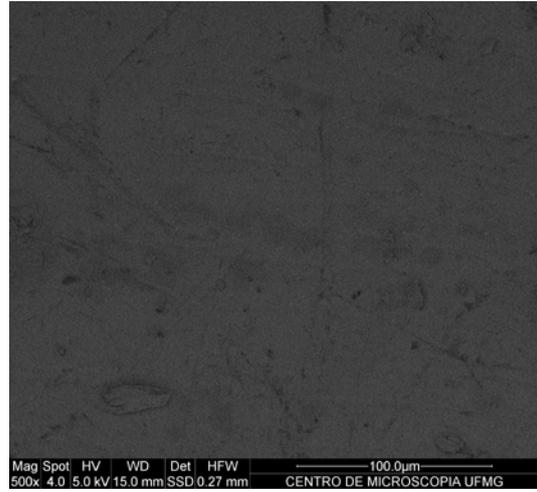
(c)

Figura 3

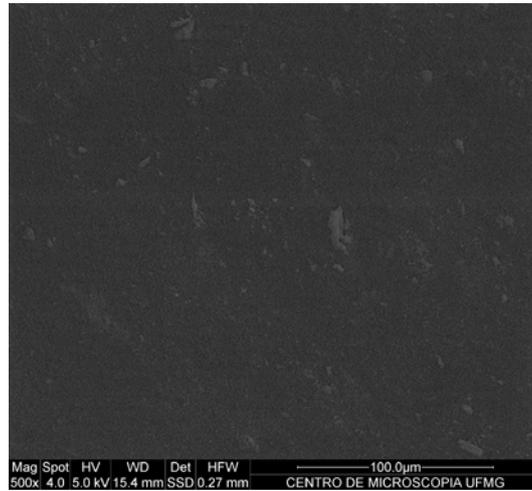
10



(a)



(b)



(c)

5

ANEXO 2

< Uso exclusivo do INPI >

 <p>13/12/2010 014100004357 14:59 DEHG 00002211039506514</p>	Espaço para etiqueta
---	----------------------

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
1.2 Qualificação: Inst. de Ensino e Pesquisa
1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
1.4 Endereço Completo: Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha - Belo Horizonte MG
1.5 CEP: 31270-901 1.6 Telefone: 31 3409-4774 1.7 Fax: 31 3409-6430
1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO**

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição (54):

VERNIZ POLIMÉRICO DE PRÓPOLIS

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº _____ Data de Depósito: _____

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Asinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: André Augusto Gomes Franco 6.3 CPF: 982895006-53
6.2 Qualificação: Professor
6.4 Endereço completo: Rua Quintino Bocaiuva, 354, Apto 604, Bairro Santa Rosa - BH - MG
6.5 CEP: 31255-550 6.6 Telefone: 31 3409-4774 6.7 Fax: 31 3409-6430
6.8 E-Mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

7. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial:** (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. **Procurador (74)**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 APVOAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. **Listagem de sequências Biológicas** (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
 Listagem de sequências em formato impresso: fis.
 Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fis.

11. **Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o n° total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	15	fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração		fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	2	fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade		fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	3	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho		fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1	fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Anexo 1, Portaria, Declaração					8	fls.

12. **Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11):** 30 fls.

13. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

BH, 13/12/10
Local e Data


Assinatura e Carimbo

Prof. Renato de Lima Santos
Pro-Reitor de Pesquisa UFMG
Delegação de Competência
Portaria nº 042 / 2010