



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DE UM
VERNIZ DENTÁRIO DE PRÓPOLIS SOBRE REDUÇÃO DE *STREPTOCOCCUS*
MUTANS EM CRIANÇAS**

**FORTALEZA
2017**

EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DE UM
VERNIZ DENTÁRIO DE PRÓPOLIS SOBRE REDUÇÃO DE *STREPTOCOCCUS
MUTANS* EM CRIANÇAS**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia

Área de concentração: Farmacologia Clínica

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

**FORTALEZA
2017**

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

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

R612d Rodrigues Neto, Edilson Martins.

DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DE UM VERNIZ
DENTÁRIO DE PRÓPOLIS SOBRE REDUÇÃO DE STREPTOCOCCUS MUTANS EM
CRIANÇAS / Edilson Martins Rodrigues Neto. – 2017.

101 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.

Coorientação: Profa. Dra. Patrícia Leal Dantas Lobo.

1. Streptococcus mutans. 2. Clorexidina. 3. Cárie. 4. Crianças. 5. Própolis Vermelha. I.
Título.

CDD 615.1

EDILSON MARTINS RODRIGUES NETO

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DE UM
VERNIZ DENTÁRIO DE PRÓPOLIS SOBRE REDUÇÃO DE STREPTOCOCCUS
MUTANS EM CRIANÇAS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia Área de concentração Farmacologia Clínica.

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Patrícia Leal Dantas Lobo (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará- UFC - *Campus Sobral*

Profa. Dra. Ana Cristina de Mello Fiallos
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Tamara Gonçalves de Araujo
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Isabel Cristina Oliveira de Morais
Centro Universitário Católica de Quixadá - Unicatólica

Profa. Dra. Regilane Matos da Silva Prado
Centro Universitário Católica de Quixadá - Unicatólica

Dedico esse trabalho a Deus, mentor de toda minha vida, por toda força e coragem durante essa jornada; a Santíssima Virgem de Fátima que nunca deixou faltar suas consolações nessa caminhada e a Santa Igreja Católica por prover um ambiente, no qual trabalho, que visa o desenvolvimento da ciência e da pessoa humana.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Dra. Marta Fonteles** que me aceitou como orientando desde os bancos da graduação em seu grupo de estudo de Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica, e que novamente me recebeu para essa nova empreitada no ramo da farmacologia clínica oral nos últimos dias de inscrição da seleção do doutorado. Sempre serei grato pela sua confiança e ajuda.

À **Dra. Patrícia Lobo** que me recebeu como orientando mesmo sem ser odontólogo e me auxiliou em toda essa via do curso de doutorado, desde antes da seleção me apresentando a sua linha de pesquisa em vernizes dentários. Agradeço pelo conhecimento proporcionado na área da Farmacologia Clínica Oral.

À **Lidia Marques**, minha companheira de pesquisas, artigos, congressos, viagens e de samba, que me inseriu de forma substancial no mundo da pesquisa científica. Obrigado por toda amizade durante a vida, esse trabalho não teria sido possível sem a sua valiosa ajuda.

AGRADECIMENTOS

À **minha Mãe, Maria das Graças Cavalcante**, que sempre apoiou minha instrução acadêmica formal, fazendo diversos sacrifícios para que mais esse sonho se tornasse realidade. Mãe, Obrigado por ter me recebido como filho e sempre apostar em mim!

Aos meus irmãos, Jessica Cavalcante e Pacellynson Cavalcante, que me apoiaram mesmo a distância nesse processo de doutorado. Amo vocês, meus irmãos.

À minha amiga, madrinha de Crisma, companheira de Pastoral Universitária e irmã em Cristo, **Profa. Kátia Gardênia da Silva Coelho**, agradeço por todas as conversas, apoio emocional, estudos bíblicos e os pelos “bailes” também, você também fez parte desse processo.

Ao meu Pastor, coordenador da Pastoral Universitária, ex-aluno, **Pe. Francisco Cleides de Oliveira**, que sempre ofereceu bons conselhos, exortações e formações cristãs para a vida acadêmica e secular. Agradeço também por todas as relíquias doadas de bom grado e orações.

À minha coordenadora e companheira do *Própolis Research*, **Profa. Karla Bruna**, que foi uma grande amiga e sempre favoreceu a liberação das atividades docentes para realização dos meus estudos de doutorado e participação de eventos científicos.

À **Dra. Tamara Gonçalves de Araujo**, pelo aceite do convite de participação da banca de qualificação e defesa de tese. Também por ter me acolhido desde a graduação nas pesquisas e na docência de tecnologia farmacêutica e cosmetologia, sendo meu espelho profissional nessas disciplinas que hoje ministro.

À **Dra. Ana Cristina de Mello Fiallos**, pelo aceite do convite de participação da banca de qualificação e defesa de tese. Pela confiança na participação de novos projetos de interação entre a Farmácia e a Odontologia.

À **Dra. Isabel Cristina Oliveira de Moraes**, minha colega de trabalho, por aceitar participar desse momento tão importante da minha vida profissional dando valiosas contribuições para melhoria desse trabalho.

À **Dra. Regilane Matos da Silva Prado**, que aceitou de modo tão repentino participar da minha banca de defesa e pelos conselhos valiosos que sempre foram importantes nos momentos em que busquei ajuda durante esse curso de doutorado.

À **Dra. Maria Augusta Drago Ferreira**, que sempre foi minha mentora acadêmica e profissional durante esses 10 anos de UFC. Obrigado por todo apoio,

conselhos e carinho maternal que me foi dado. Devo muito a da minha vida profissional a você.

Ao **Dr. Said Gonçalves**, pela elaboração da forma farmacêutica utilizada nesse trabalho e por ser sempre solícito na liberação do laboratório de farmacotécnica.

Ao meu monitor da disciplina de Química Farmacêutica, **Francisco Josimar Girão Junior**, que sempre me auxiliou na disciplina desde que foi meu aluno na primeira turma da Unicatólica, sendo também meu companheiro de pesquisas e publicações. Espero ter repassado a você o mesmo amor à docência que me foi desenvolvido por meus Mestres.

Aos queridos meus **alunos do curso de farmácia da UNICATÓLICA**, que souberam compreender minhas ausências em sala de aula para frequentar as aulas do doutorado.

À **Dra. Miriam Nunes e Dra. Marize Girão**, minhas mentoras profissionais, por demonstrarem um amor incondicional ao Sistema Único de Saúde e Assistência Farmacêutica, despertando, também, em mim esse sentimento.

À **Sociedade Civil Brasileira**, que direta e indiretamente por meio de seus tributos financiaram meu aperfeiçoamento profissional, favorecendo, desse modo, a melhoria do SUS e da educação brasileira.

À **FUNCAP** apoio financeiro para realização desse projeto.

Finalmente, sou grato aos meus dois ofícios, minhas duas profissões, que apesar de distintas são bastante complementares, gratificantes e me realizam plenamente, **a Farmácia e a Docência**.

“Dai-me almas, e ficai com todo o resto. O que me importa é juventude santa” (São João Bosco)

RESUMO

Desenvolvimento, avaliação clínica e microbiológica de um verniz dentário de própolis sobre redução de streptococcus mutans em crianças. Edilson Martins Rodrigues Neto. Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles. Tese de Doutorado em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2017.

A cárie dentária é uma condição açúcar-dependente que pode ser definida como o processo de desmineralização da matriz dentária no esmalte e/ou dentina induzida por meio ácido, apresentando múltiplos fatores que podem modular essa via. A própolis se apresenta como uma resina responsável pelo selamento das colmeias de abelhas (*Apis mellifera*), sendo proveniente da coleta delas em diversos tipos de vegetais. Atualmente se tem conhecimento de pelo menos 200 tipos de compostos identificados na própolis, a partir de amostras geográficas diferentes e da diversidade botânica. A caracterização química da própolis padronizou constituintes como: ácidos fenólicos prenilados, lignanas, terpenos e alcoóis terpênicos, além de derivados p-curmarínicos. Vernizes a base de produtos naturais vêm sendo estudados em pesquisas *in vitro* como agentes anti-cárie. Não foram encontrados, na literatura, relatos da utilização de vernizes a base de própolis vermelha brasileira, bem como ensaios clínicos comparando esses vernizes a outros. Este estudo buscou realizar o desenvolvimento, avaliação clínica e microbiológica de verniz dentário de própolis vermelha sobre redução de *streptococcus mutans* em crianças, com finalidade de prevenção da cárie dentária. Trata-se de um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego e longitudinal, controlado. Foram selecionadas, para participação do estudo, 99 crianças. Primeiramente se realizou um estudo piloto para verificar a melhor concentração do verniz de própolis para se dar seguimento ao ensaio clínico no qual os voluntários foram divididos em 3 grupos acompanhados por 360 dias: verniz de clorexidina, verniz de Fluor e verniz de própolis. Houve expressiva redução da carga microbiana, com significância estatística, de *streptococcus mutans* nos dias 90 e 180 após a aplicação do verniz de própolis em relação ao grupo tratado com o verniz de clorexidina e com o verniz de flúor. Conclui-se que verniz dentário de própolis vermelha brasileira 2,5% se mostrou eficaz no controle das unidades formadoras de colônias de *Streptococcus mutans* na cavidade oral, quando utilizado no intervalo de 90 dias.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*. Clorexidina. Cárie. Crianças. Própolis Vermelha

ABSTRACT

Development, clinical evaluation and microbiological of a dental varnish of propolis about reduction of streptococcus mutans in children. Edilson Martins Rodrigues Neto. Supervisor: Phd Professor Marta Maria from França Fonteles. Doctoral thesis in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine. Federal university of Ceará, 2017

The dental decay is a sugar-dependent condition that can be defined as the process of demineralization of the dental hard tissue in the enamel and/or dentine induced by acid middle, presenting multiples factors that can modulate that road. The própolis comes as a responsible resin for the sealing of the beehives of bees (*Apis mellifera*), being originating from his/her collection in several types of vegetables. Now knowledge is had of at least 200 types of identified compositions in the própolis, starting from different geographical samples and of the botanical diversity. The chemical characterization of the própolis standardized constituent as: fenolics prenilads acids, lignans, terpens and terpenics alcohols , besides having derived p-curmarinics. Varnish base of natural products has been studied in researches in vitro as agents anti-decay. They were not found, in the literature, reports of the varnish use the base of Brazilian red própolis, as well as clinical rehearsals comparing those varnish the other ones. This study looked for to accomplish the development, clinical evaluation and microbiological of dental varnish of red própolis about reduction of streptococcus mutans in children, with purpose of prevention of the dental decay. It is a clinical rehearsal, randomized, double-blind and longitudinal, controlled. They were selected, for participation of the study, 99 children. Firstly he/she took place a pilot study to verify the best concentration of the própolis varnish to feel continuation to the clinical rehearsal in which the volunteers were divided in 3 groups accompanied by 360 days: clorexidina varnish, Fluor varnish and própolis varnish. There was expressive reduction of the microbial load, with statistical significance, of streptococcus mutans on 90 and 180 after the application of the própolis varnish in relation to the group treated with the clorexidina varnish and with the flúor varnish. Conclui-if that dental varnish of Brazilian red própolis 2,5% were shown effective in the control of the units forming of colonies of *Streptococcus mutans* in the oral cavity, when used in the interval of 90 days.

Key words: *Streptococcus mutans*. Chlorhexidine. Dental decay. Children. Red Propolis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Pequena lesão cariiosa cavitada na superfície oclusal de um molar mandibular.....	17
Figura 2: Processo simplificado Des\Remineralização.....	21
Figura 3: Composição biológica do esmalte dentário e tecido dentinário.....	22
Figura 4: Representação química da fórmula estrutural plana do digluconato de clorexidina	26
Figura 5: Manchamento dentário causado por uso crônico de colutório bucal de clorexidina	28
Figura 6: Processo esquemático da remineralização dentária na presença do flúor	31
Figura 7: Acumulo, distribuição e efluxo de F ⁻ em bactérias orais.....	32
Figura 8: Manchas difusas e transversais da opacidade fluorótica	35
Figura 9: Representação química estrutural plana do ácido caféico e do ácido cinâmico	37
Figura 10: Extratos brutos resinosos de própolis brasileira verde, marrom e vermelha.....	38
Figura 11: Representação química estrutural plana do neovestitol e vestitol, respectivamente	40
Figura 12: Extrato de própolis vermelha brasileira ressuspendido em álcool absoluto em repouso e após a precipitação	50
Figura 13: Verniz dentário base, sem princípios ativos	50
Figura 14: Grafico da redução absoluta (média e desvio padrão) do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Streptococcus mutans</i> , mensurada nas amostras de saliva com diluição de 1:100 ou 1:1000, e tratadas com verniz de própolis nas concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%.....	56
Figura 15: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de <i>Streptococcus mutans</i> , expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação do verniz de clorexidina.....	59
Figura 16: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de <i>Streptococcus mutans</i> , expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de	

saliva com diluição de 1:100 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação do verniz de flúor..... 59

Figura 17: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação do verniz de própolis 60

Figura 18: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis..... 61

Figura 19: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação do verniz de clorexidina 63

Figura 20: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação de verniz de flúor 64

Figura 21: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação de verniz de própolis 64

Figura 22: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis..... 65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Evolução temporal do índice CPO-d no Brasil e suas Regiões em escolares..... 19
- Tabela 2: Redução absoluta do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* mensurada nas amostras de saliva de 5 ou 6 crianças, com diluição de 1:100, tratadas com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%. 55
- Tabela 3: Redução absoluta do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* mensurada nas amostras de saliva de 5 ou 6 crianças, com diluição de 1:1000, tratadas com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%. 56
- Tabela 4: Redução absoluta do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* mensurada nas amostras de saliva de 5 ou 6 crianças, com diluição de 1:100 ou 1:1000, tratadas com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%. Em cada concentração, comparações entre as duas diluições foram realizadas mediante o uso do teste *t* para amostras emparelhadas. 57
- Tabela 5: Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* verificado nas amostras de saliva de 5 ou 6 crianças, com diluição de 1:10, antes e após o tratamento com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10% 58
- Tabela 6: Quantidade de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis..... 61
- Tabela 7: Quantidade de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis..... 62
- Tabela 8: Quantidade de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis..... 66
- Tabela 9: Quantidade de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis..... 67

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ca^{2+}	Cálcio iônico
CPI	Cárie da Primeira Infância
F^-	Íon Fluoreto
H^+	Hidrogênio protonado
HF	Ácido Fluorídrico
Índice PCOd	Número médio de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados
MAPA	Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
pH	Potencial hidrogeniônico
PO_4^-	Íon Fosfato
SB BRASIL	Pesquisa Nacional de Saúde Bucal
SM	<i>Streptococcus mutans</i>
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Cárie dentária.....	17
1.2 Clorexidina	24
1.3 Flúor	29
1.4 Própolis	36
1.5 Vernizes dentários.....	41
1.6 Relevância do Estudo	42
2. OBJETIVOS	45
2.1. Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Tipo de estudo.....	47
3.2 População do estudo.....	47
3.2.1 Critérios de inclusão.....	47
3.2.2 Critérios de exclusão.....	47
3.3 Aspectos éticos	48
3.4 Examinadores	48
3.5 Obtenção, Manipulação e Identificação do extrato.....	48
3.6 Desenvolvimento dos vernizes.....	49
3.7 Estudo <i>in vivo</i> - Ensaio piloto	51
3.8 Estudo <i>in vivo</i> - divisão dos grupos e aplicação dos vernizes	51
3.9 Análise microbiológica.....	51
3.10 Exames clínicos de controle.....	52
3.11 Análise dos resultados	52
4. RESULTADOS	55

4.1 Resultados da primeira etapa do estudo: estudo piloto.....	55
4.2 Resultados da segunda etapa do estudo: ensaio clínico	58
4.2.1 Diluição 1:100	58
4.2.2 Diluição 1:1000	63
5. DISCUSSÃO	69
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
7. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	88
APÊNDICE B - FICHA DE ANAMNESE, DADOS PESSOAIS E EXAME DENTÁRIO	91
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	94
ANEXO B – DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE	97

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cárie dentária

A cárie dentária é uma condição açúcar-dependente que pode ser definida como o processo de desmineralização da matriz dentária no esmalte e/ou dentina induzida por meio ácido, apresentando múltiplos fatores que podem modular essa via (ZAFAR; HARNEKAR; SIDDIQ, 2009; TENUTA; CURY, 2010). Por sua vez, a Cárie de Primeira Infância (CPI) pode ser definida como uma doença multifatorial, que acomete a dentição decídua. Caracteriza-se pela presença de pelo menos um dente cariado (lesão com ou sem cavitação), a ausência de um dente (por cárie), ou a existência de uma restauração provisória em um dente, em uma criança de idade compreendida entre 0 e 71 meses (COSTA *et al.*, 2010; LOBO *et al.*, 2011). A Figura 1 apresenta um tipo de lesão cariosa cavitada.

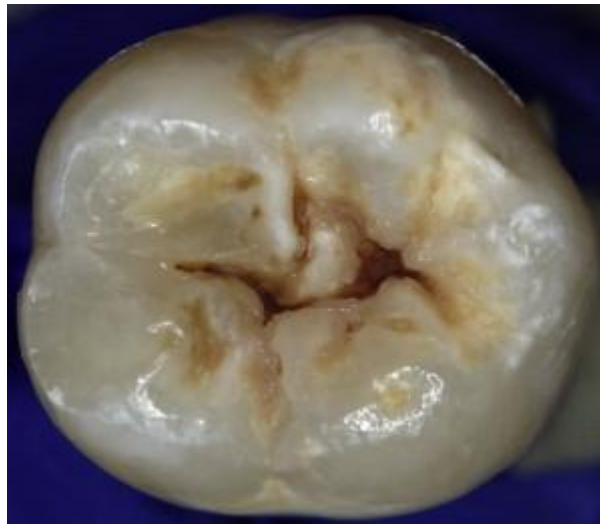


Figura 1: Pequena lesão cariosa cavitada na superfície oclusal de um molar mandibular.
(fonte: GONZÁLEZ-CABEZAS,2010)

No contexto epidemiológico, a cárie dentária é uma doença com ampla distribuição global, apresentando elevada prevalência e acometendo cerca de

80 a 99% da população mundial, sendo ela a principal causa de ausências dentárias (SEGUÉN HERNÁNDEZ *et al.*, 2010; SIMÓN-SORO; MIRA, 2015). Nos Estados Unidos, mais de 50% das crianças entre 5 a 9 anos de idade, apresentam pelo menos uma lesão cavitada ou restauração, e essa proporção aumenta para 78% entre os jovens de 17 anos; sendo que em populações de menor poder aquisitivo esses níveis encontram-se mais elevados (BAGRAMIAN *et al.*, 2009).

Um inquérito de saúde bucal, produzido na Austrália, verificou que pelo menos 37% dos escolares apresentaram uma ausência de dente decíduo, sendo que 84% desses casos se deram por carência de tratamento dentário adequado (ARROW; RAHEB; MILLER, 2013).

No Brasil, a doença cárie é verificada por meio do índice CPOd, que significa o número médio de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (ressalta-se, que, dentes obturados são referentes a restaurados e não situações de tratamento endodôntico), aos 12 anos de idade, em determinado espaço geográfico, no ano considerado. Esse índice estima a experiência presente e passada do ataque da cárie dentária à dentição permanente (BRASIL, 2011).

A idade de 12 anos é adotada internacionalmente como parâmetro básico para uso do indicador. Os valores do índice correspondem aos seguintes graus de severidade: muito baixo (0,0 a 1,1), baixo (1,2 a 2,6), moderado (2,7 a 4,4), alto (4,5 a 6,5) e muito alto (6,6 e mais). Valores elevados indicam más condições de saúde bucal da população, frequentemente associadas a condições socioeconômicas desfavoráveis, à dificuldade de acesso aos serviços e a hábitos deletérios, como alto consumo de açúcares, mas também pode indicar limitado acesso ao flúor (BRASIL, 2011).

Em território brasileiro, no ano de 2010, atingiu-se um índice CPO-d de 2,1, correspondendo a um grau de severidade baixo e obtendo-se uma redução evolutiva nesse critério desde 1986 até 2010, quando foi realizado a Pesquisa Nacional de Saúde Bucal (SB Brasil) (BRASIL, 2011). A evolução temporal do Brasil e por Região pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1: Evolução temporal do índice CPO-d no Brasil e suas Regiões em escolares.

Região	1986	1996	2003	2010
Brasil	6,7	3,1	2,8	2,1
Norte	7,5	4,3	3,1	3,2
Nordeste	6,9	2,9	3,2	2,7
Sudeste	6,0	2,1	2,3	1,7
Sul	6,3	2,4	2,3	2,0
Centro-Oeste	8,5	2,9	3,2	2,6

Fonte: Ministério da Saúde, 2011

Apesar da doença cárie ter sua prevalência diminuída, assim como os graus de severidade em países desenvolvidos, percebe-se que ela ainda é um desafio para os programas de saúde pública de países em desenvolvimento pelo alto consumo de calorias vazias, baixa exposição ao F^- , e dificuldade no acesso a serviços de saúde bucal (JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010).

O clássico postulado de Koch, uma das pedras angulares da microbiologia, descreve que uma doença infecciosa será causada por um micro-organismo patogênico, sendo esse norteador aplicado à maioria das doenças infecciosas (SIMÓN-SORO; MIRA, 2015). Na década de 1920 foram isolados os *Streptococcus mutans* (SM) em lesões cariosas, nesse contexto, seguindo o postulado de Koch, esses foram caracterizados como o agente etiológico da cárie dentária; mantendo sua importância clínica durante décadas como principal agente causador da cárie. Assim, esses micro-organismos nortearam, durante muito tempo, as condutas de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença cárie (SIMÓN-SORO; MIRA, 2015). Entretanto, com o passar do tempo, novas espécies microbianas, como *lactobacilos* e *bifidobactérias*, foram isoladas em lesões de cárie, comprovando assim, que o *Streptococcus mutans* não seria o único patógeno cariogênico, mas que as lesões cariosas eram favorecidas por uma complexa associação de micro-organismo acidogênicos presentes no biofilme bacteriano aderido a placa dentária (SIMÓN-SORO; MIRA, 2015).

No equilíbrio normal da microbiota oral, micro-organismos acidogênicos interagem metabolicamente com carboidratos fermentáveis favorecendo o fluxo da cárie dentária, tornando-se, assim, parte relevante do processo patológico. Dessa interação complexa de micro-organismos surge o biofilme bacteriano que fica aderido na superfície dentária, dessa maneira, o ambiente propício para desmineralização dentária encontra-se formado (ZAFAR; HARNEKAR; SIDDIQ, 2009; LOBO *et al.*, 2014).

O biofilme bacteriano é constituído por uma comunidade microbiológica organizada em uma matriz extracelular adesiva que fica aderida as superfícies dentárias, em condições ideais como de alto consumo de carboidratos fermentáveis, pode haver corrupção nesse microssistema culminando em alterações bioquímicas e microbiológicas que favoreceram o processo de carie dentária (CCAHUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010; SIMÓN-SORO; MIRA, 2015). O acúmulo do biofilme bacteriano é considerado um dos fatores críticos para o curso da formação da lesão cariosa. Quando ocorre a ineficácia do controle mecânico e não há desestabilização dos sítios de biofilme estagnados, haverá uma pressão natural com seleção de micro-organismos do gênero *Streptococcus* e *Lactobacilos* que se tornaram dominantes no biofilme favorecendo, assim, os processos de desmineralização da matriz dentária por produção de ácido em processos fermentativos (DE-CARLI *et al.*, 2011).

Esse processo de pressão seletiva pode ser explicado pelo seguinte fluxo: inicialmente ocorre uma grande oferta de carboidratos fermentáveis provenientes da dieta, na cavidade oral, assim os micro-organismos iniciam a produção de ácido, síntese de polissacarídeos extracelulares e de energia para seus processos bioquímicos. Após essa fase ocorre um período refratário de “fome de açúcar”, no qual pode ocorrer a seleção de micro-organismos mais tolerantes a um meio ácido (CCAHUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010).

Quando o pH atinge níveis críticos para esmalte ou dentina, estes perderão cálcio e fosfato, sofrendo desmineralização. O pH permanece crítico por um tempo que varia de 20 minutos a horas, e então retorna ao normal. O tempo para haver a reversão ao pH normal depende da forma como o açúcar é ingerido, em que período do dia, sendo também relevante a ação da saliva.

Assim, se o açúcar for ingerido na forma líquida, o pH volta ao normal mais rapidamente do que se alimentos sólidos forem consumidos. Por exemplo, biscoitos recheados, por serem mais retentivos, são 45% mais cariogênicos que açúcar puro (CCAJUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010; GONZÁLEZ-CABEZAS,2010).

Toda a perda da estrutura mineral dentária, formada majoritariamente por hidroxiapatita, faz parte do processo patológico da doença cárie. Os cristais de hidroxiapatita na superfície do dente passam regularmente por períodos naturais de ganho mineral (remineralização) e perda mineral (desmineralização), particularmente em superfícies cobertas por biofilmes (estagnados) não perturbados. Quando esse processo chega a um ponto no qual a desmineralização atinge um nível maior que o de mineralização, tem-se instalada a gênese da cárie dentária (GONZÁLEZ-CABEZAS,2010) (Figura 2).

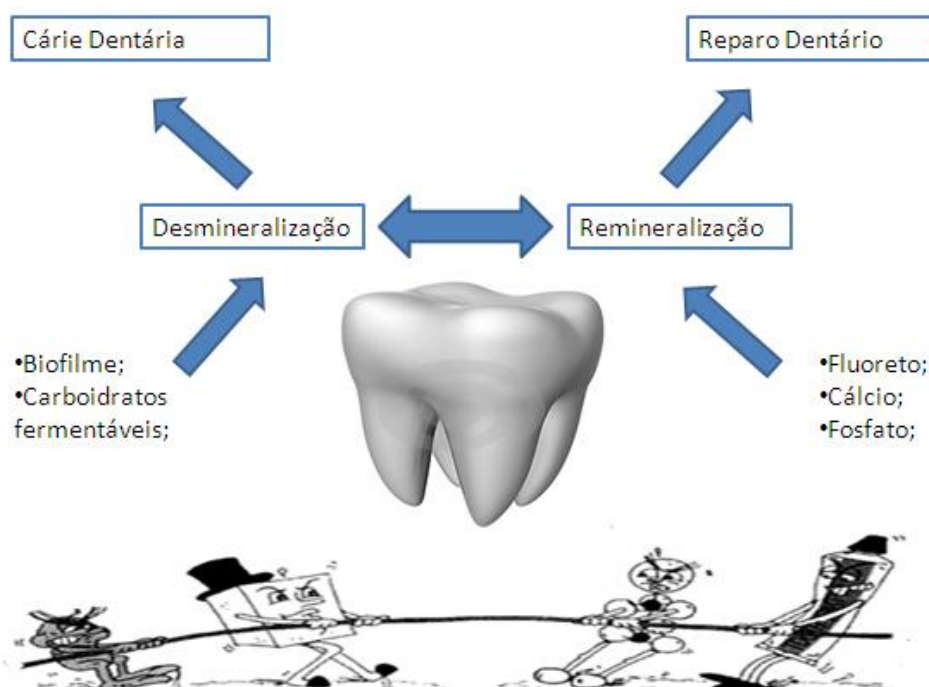


Figura 2: Processo simplificado Des\Remineralização (fonte: adaptado de <https://science.education.nih.gov/supplements/nih2/oral-health/images/guide/L5/L5-79a.gif>)

No momento que a desmineralização supera a remineralização a superfície dentária tenderá a ter sua rugosidade e porosidade aumentada. Esse

aumento de porosidade leva a formação de uma lesão subtecidual, que se diferencia de outras lesões dentárias erosivas como as causadas por desmineralização por ácidos fortes, nas quais o tecido dentário sofre perda da estrutura do esmalte camada por camada. Esse fenômeno é explicado pela maior resistência da parede externa da placa dentária devido, principalmente, o maior aporte de íons que favorecem a remineralização como F^- , Ca^{2+} e PO_4^- , deixando, assim, as camadas mais internas com maior sensibilidade a ação do H^+ produzido (GONZÁLEZ-CABEZAS, 2010; BUZALAF *et al.*, 2011).

Além disso, a composição biológica do tecido dentinário apresenta um menor percentual de hidroxiapatita, porém essa se encontra na forma de polimorfos que apresentam retículos cristalinos de pequenas dimensões e consequentemente com menor estabilidade, assim a hidroxiapatita dentinária se torna mais reativa que a do esmalte dentário, pois oferecerá uma maior superfície de contato e, portanto, necessitará de um menor grau de energia para que haja quebra do retículo cristalino do sólido pelo solvente (GONZÁLEZ-CABEZAS, 2010; BUZALAF *et al.*, 2011) (Figura 3).

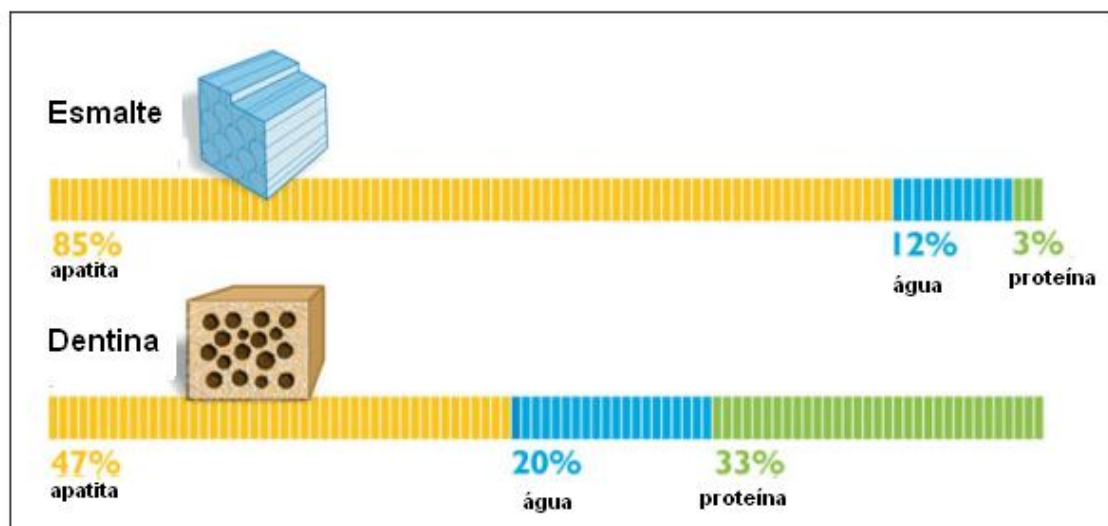


Figura 3: Composição biológica do esmalte dentário e tecido dentinário. (fonte: adaptado de BUZALAF *et al.*, 2011)

A remineralização deve ser o resultado esperado em qualquer tratamento de manejo de cárie dentária, esse fenômeno em lesões não cavitadas tem sido relatada desde o início do século XX, quando se observou

que o esmalte desmineralizado endureceu na presença de saliva. O processo de remineralização ocorre na presença de íons de Ca^{2+} e PO_4^- biodisponíveis, sendo fortemente potencializado pela presença de F^- , desse modo, o fluxo salivar, a dieta do paciente para aporte de desses íons na cavidade oral e a suplementação de F^- veiculado em diversas formas farmacêuticas como: dentifrícios fluoretados, colútorios, vernizes e géis; torna-se fundamental para o favorecimento da remineralização (GONZÁLEZ-CABEZAS,2010; TENUTA, CURY,2010).

Os açúcares fermentáveis, tais como sacarose, frutose e glicose contribuem de modo substancial para a patogênese e processo de desenvolvimento da cárie dentária. Além disso, a sacarose por ser um edulcorante barato e de fácil acesso, encontrando-se presente numa gama de alimentos processados ou não, tem a capacidade de converter alimentos não cariogênicos ou anti-cariogênicos em cariogênicos. Com esse maior aporte de carboidratos fermentáveis no biofilme ocorre uma desregulação da microbiota normal havendo uma diminuição de micro-organismos, que são capazes de controlar naturalmente o crescimento da população de outras bactérias acidogênicas (ZAFAR; HARNEKAR; SIDDIQ, 2009).

Durante o sono o fluxo salivar é reduzido culminando numa diminuição da neutralização dos ácidos produzidos no biofilme e numa menor desestabilização do mesmo, por conta da diminuição da veiculação de anticorpos, imunocomplexos, proteínas do sistema complemento e defensinas na cavidade oral. Desse modo, ocorrerá uma maior e mais efetiva interação entre o biofilme e a superfície dentária, favorecendo o processo de desmineralização. A saber: a cada unidade de pH diminuída no biofilme bacteriano aumenta-se em 10 vezes a solubilidade da hidroxiapatita (ZAFAR; HARNEKAR; SIDDIQ, 2009; BUZALAF *et al*, 2011).

Um fator importante de etiologia e diagnóstico da doença cárie é o fator relacionado ao hospedeiro. A cárie dentária ocorre de modo relativamente lento, requerendo de 1 a 2 anos para sua progressão através do esmalte, isso dependendo das condições do meio. Aparentemente, existem fatores do hospedeiro que favorecem a formação da cárie e mecanismos que inibem o

seu desenvolvimento. O primeiro fator do hospedeiro que favorece a cárie são os contornos anatômicos dos dentes e a forma da arcada. O dente molar possui muitos sulcos e fissuras profundos que favorecem o desenvolvimento da placa, e o desenvolvimento evolucionário da forma do arco humano levou ao contato proximal dos dentes e ao aparecimento de apinhamentos (HABIBIAN *et al.*, 2001; TENUTA, CURY, 2010; GONZÁLEZ-CABEZAS, 2010).

Outro componente importante é a higiene oral, pois a desorganização do biofilme, através da escovação, impede que ele se torne espesso, facilitando, assim, a auto-limpeza pela saliva e equilibrando o processo de desmineralização-remineralização. A higiene oral deficiente permite que um maior número de superfícies seja coberta por biofilme maduro, tornando-as mais susceptíveis ao desenvolvimento de lesões cariosas. Logo, se esses fatores forem encontrados no hospedeiro, serão fortemente sugestivos de alto risco à cárie, devendo ser controlados para evitar o aparecimento da doença (HABIBIAN *et al.*, 2001; TENUTA, CURY, 2010; GONZÁLEZ-CABEZAS, 2010).

Entretanto, em conceitos mais atuais e complexos, a cárie dentária pode ser caracterizada como uma condição patológica crônica multifatorial açúcar-dependente, que envolve variáveis como higiene oral, dieta cariogênica, microbiota oral, fatores relacionados ao indivíduo e socioeconômicos (TENUTA, CURY, 2010; BUZALAF *et al.*, 2011; SIMÓN-SORO; MIRA, 2015).

1.2 Clorexidina

Os agentes antimicrobianos demonstram grande valor no processo de prevenção da doença cárie, haja vista o papel da microbiota patogênica residente no biofilme oral na gênese desse processo (JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010). A clorexidina corresponde a um antimicrobiano de largo espectro e sua fórmula consiste em dois anéis simétricos de 4-clorofenil e dois grupos de biguanida conectados por uma cadeia central de hexametileno. O gluconato de clorexidina é um anti-séptico químico,

antifúngico e um composto bactericida capaz de eliminar tanto micro-organismos gram-positivos quanto micro-organismos gram-negativos, no entanto mostra-se menos eficiente contra os micro-organismos gram-negativos. Também, sendo um bacteriostático em concentrações baixas, impedindo a proliferação de bactérias. A clorexidina tem grande afinidade pelas bactérias, provavelmente em decorrência da adsorção da molécula catiônica (positiva) à parede celular aniônica (negativa) do micro-organismo. Essa adsorção aumenta a permeabilidade da membrana bacteriana, abrindo verdadeiras crateras, permitindo a penetração da clorexidina no citoplasma, causando a morte da bactéria (GREENSTEIN, 1986; MALTZ; RIBEIRO; HASHIZUME, 2007; JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010; SLOT *et al.*,2011).

É um agente antimicrobiano que apresenta alta substantividade, ou seja, alta capacidade de manutenção por um tempo prolongado na cavidade oral, demonstrando propriedades de adsorção na superfície dentária, e apresentando uma ação contra os *Streptococcus mutans*, principalmente por sua capacidade de se aderir aos polissacarídeos extracelulares. Entretanto a clorexidina não apresenta atividade viricida e nem contra bacilos álcool-ácidos resistentes. Outra limitação do uso do fármaco é a impossibilidade da sua veiculação em formas farmacêuticas que apresentem substâncias de caráter aniônico na sua composição, o que levaria a precipitação do fármaco (GREENSTEIN, 1986; MALTZ; RIBEIRO; HASHIZUME, 2007; JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010; SLOT *et al.*,2011).

Em função de suas cargas positivas, reage com a superfície da célula microbiana, destruindo a integridade da membrana celular, principalmente pela ligação dos grupos biguanida aos fosfolipídios da membrana (Figura 4). Assim, ela induz modificações estruturais que levam a um desequilíbrio osmótico na célula provocando a ruptura da membrana, o vazamento de componentes intracelulares, precipitação do citoplasma e a morte do micro-organismo (MALTZ; RIBEIRO; HASHIZUME, 2007; JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010).

O uso do fármaco se encontra consolidado na prática clínica odontológica, tendo sido exaustivamente estudado como agente terapêutico anti-placa e anti-gengivite, além de ter sido demonstrado que seu uso é favorável no processo de prevenção e controle da cárie dentária (JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010).

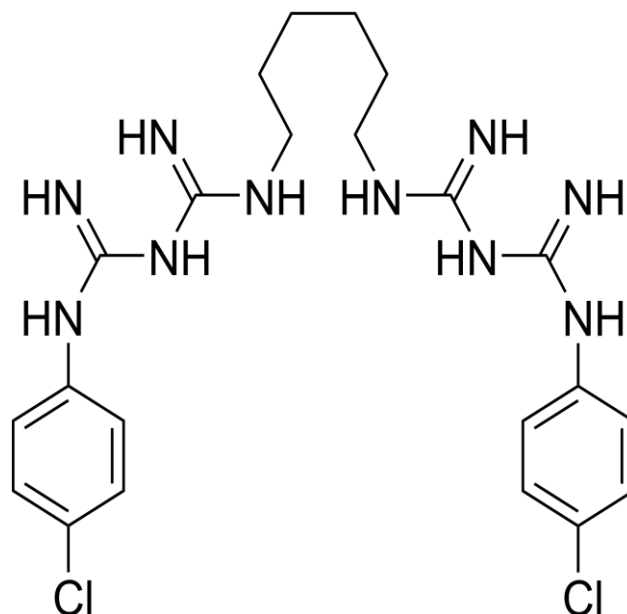


Figura 4: Representação química da fórmula estrutural plana do digluconato de clorexidina (fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5b/Chlorhexidine.png>)

Trata-se do agente quimioterápico anti-infeccioso mais utilizado pelos profissionais na prevenção da cárie dentária em crianças. Trabalhos demonstram que a aplicação clínica da clorexidina na cavidade oral, na forma de gel ou colutório, apresenta um efeito de redução dos níveis de *Streptococcus mutans* na saliva e placa dentária, ainda que, posteriormente, os níveis bacterianos eventualmente aumentem para níveis encontrados antes do tratamento. Essa substância hidrossolúvel em pH fisiológico dissocia-se, liberando o componente catiônico, apresenta alta substantividade, e a sua atuação sobre a película adquirida, em microorganismos gram-positivos e gram-negativos, leva a uma redução significativa nos níveis de placa bacteriana (FIGUEIREDO *et al.*, 2004).

A clorexidina tem sido utilizada na Odontologia em diferentes concentrações e em diferentes veículos: verniz de clorexidina a 1%, 10%, 20%,

25%, 33% e 40%, gel de clorexidina numa concentração a 1%, em enxaguatórios com uso diário em concentrações a 0,12 % e 0,2% e finalmente como goma de mascar (LOBO, 2008; SLOT *et al.*, 2011). Entretanto, cabe ressaltar que a clorexidina, por ter seu uso disseminado em ambientes de cuidados de saúde e fora deles, deve ter seu uso atrelado a uma criteriosa avaliação clínica, pois como qualquer agente antimicrobiano, seja antibiótico ou quimioterápico, o fármaco encontra-se sujeito à resistência bacteriana. Tendo esse fenômeno já sido documentado na literatura com bactérias Gram + e Gram – (HORNER; MAWER; WILCOX, 2012).

Devido à ação antimicrobiana bem estabelecida, a clorexidina tem sido utilizada, segundo demonstra a literatura, como controle positivo em diversos estudos clínicos e laboratoriais (FIGUEIREDO *et al.*, 2004). Mas, a sua necessidade de frequência de aplicação, o gosto desagradável, o manchamento dos dentes, dentre outros efeitos negativos, têm estimulado a procura por alternativas mais apropriadas para crianças jovens. Portanto, embora sendo considerada como padrão-ouro para a inibição da formação da placa bacteriana dentária, a clorexidina vem sendo questionada para uso como antimicrobiano contra cárie (VOLLMER *et al.*, 2010; LOBO *et al.*, 2014). A Figura 5 apresenta o aspecto de manchamento dentário causado pelo uso crônico com clorexidina.



Figura 5: Manchamento dentário causado por uso crônico de colutório bucal de clorexidina. (fonte: <http://www.prestige-dental-care.com.my/blog/wp-content/uploads/2011/02/chlorhexidine-staining.jpg>)

Um ensaio clínico randomizado que contou com a participação de 1101 voluntários, que utilizaram um colutório de clorexidina 0,12% (p/v) diariamente por 1 mês e, posteriormente, uma vez por semana durante 5 meses não demonstrou diferenças significativas na redução da cárie dentária frente ao placebo durante um período de acompanhamento de 5 anos (WYATT, 2007).

Em contrapartida outro ensaio clínico avaliou a eficácia de um verniz de clorexidina 10%(p/v), aplicado em consultório odontológico, em 240 pacientes com xerostomia e que apresentavam elevado risco para desenvolvimento de cárie dentária frente a um placebo de cloridrato de quinina para mimetizar o sabor amargo da clorexidina. Os pacientes receberam 4 tratamentos semanais e um quinto tratamento com 6 meses. O grupo do verniz de clorexidina apresentou uma redução relativa de 24,5% de cáries radiculares e coronais combinadas e 40,8% em cáries radiculares isoladas, além de uma diminuição de 14,4% no aumento das cáries pré-existentes (BANTING *et al*, 2000).

Em uma revisão sistemática, que reuniu 16 ensaios clínicos com verniz de clorexidina, por conta dos resultados apresentados serem conflitantes chegou-se à constatação que a evidência de eficácia do produto era inconclusiva (TWETMAN, 2004). Em outra revisão sistemática, verificou-se que o verniz de clorexidina apenas apresentava efeito na prevenção da cárie

dentária quando aplicado em intervalos de 3 a 4 meses, sendo que não foi verificado eficácia em intervalos mais longos de aplicação (ZHANG *et al*, 2006). Também foi feita a comparação dos resultados de seis ensaios clínicos, nos quais o uso do verniz de clorexidina foi comparado com o tratamento placebo ou de não intervenção. Não foi verificada redução significativa da cárie dentária com o tratamento, sendo verificada apenas redução da população de *Streptococcus mutans* (JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010).

No entanto, apesar de se documentar a atividade da clorexidina veiculada em diversas formas farmacêuticas de uso odontológico, não se pode extrapolar sua ação antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans* para um efeito anti-cariogênico propriamente dito, pois apesar do importante papel da microbiota oral no processo da gênese da cárie dentária sabe-se que a riqueza de micro-organismo no biofilme bacteriano é enorme e, ainda assim entende-se que a situação patológica apresenta uma gama de fatores que devem ser levado em consideração (TENUTA, CURY, 2010; SLOT *et al*, 2011; SIMÓN-SORO; MIRA, 2015).

1.3 Flúor

O flúor foi introduzido na prática clínica odontológica desde a década de 1970. Ainda que não se tivesse, na época, decifrado totalmente a etiologia da cárie dentária e seu papel no processo de reparo tecidual, sempre foi considerado um dos grandes responsáveis pelo declínio exponencial da prevalência da cárie dentária na população, principalmente em países desenvolvidos. Entretanto ressalta-se que uma exposição exacerbada ao íon F⁻ durante o desenvolvimento dentário pode acarretar em fluorose dentária, sendo esse o único efeito clinicamente relevante comprovado em odontologia (BUZALAF *et al.*, 2011).

O aumento da prevalência da fluorose dentária ocorreu de forma cronológica e diretamente proporcional à diminuição da cárie dentária, sendo

que a fluorose muito leve a leve é um efeito secundário a terapia que gera pouco ou nenhum efeito na qualidade de vida do paciente. Porém, é necessário que o profissional odontólogo tenha acertada cautela, necessária no seu uso, para prevenir a fluorose moderada a grave (BUZALAF *et al.*, 2011).

A suplementação da água de abastecimento público foi a primeira estratégia para prevenção de cáries que utilizou o flúor de forma terapêutica. Outra conduta inicialmente empregada foi a orientação de gestantes a utilizar a suplementação com F^- para proteção dos filhos contra cáries dentárias, sendo desaconselhada atualmente. Nas décadas 1940 a 1970 o mecanismo de ação cariostático do flúor foi baseado na sua absorção pelo esmalte dentário e consequente aumento da resistência a desmineralização, pois a fluorapatita seria mais persistente a dissolução que a hidroxiapatita em meio ácido (BUZALAF *et al.*, 2011; FRAZÃO; PERES; CURY, 2011).

Esse fenômeno poderia ser atribuído a apresentação de um retículo cristalino mais organizado e estável do sólido da fluorapatita, necessitando, conseqüentemente, de uma maior energia para que ocorresse a sua solubilização no meio. Assim, assumia-se o risco de fluorose de bom grado tendo em vista os inquestionáveis benefícios da fluoroterapia na prevenção da cárie (BUZALAF *et al.*, 2011; FRAZÃO; PERES; CURY, 2011).

Entretanto, essa proposição não elucidava totalmente o mecanismo de ação cariostático do flúor, pois na superfície do esmalte a concentração máxima de F^- é de 3.000 ppm, com substituição de cerca de 8% de hidroxiapatita por fluorapatita, sendo que esse valor decai no interior do tecido para cerca de 50 ppm. Assim, estudos adicionais concluíram que o flúor em solução nas fases fluidas do ambiente oral, mesmo em concentrações baixas como de 1 ppm pode reduzir substancialmente a solubilidade da hidroxiapatita em meio ácido e conseqüentemente a desmineralização (BUZALAF *et al.*, 2011).

Frente a um desafio ácido a saliva tenderá a alcalinizar o pH bucal, quando esse atingir um valor próximo de 5,5 a remineralização acontecerá de forma natural, uma vez que a saliva estará supersaturada de minerais em relação ao tecido dentário. Traços de F^- em solução irão favorecer esse

processo, pois o flúor irá se adsorver na matriz desmineralizada atraindo íons de Ca^{2+} , formando um núcleo de remineralização, um ponto crítico no processo de cristalização, que por sua vez será mais resistente a um desafio erosivo ácido, vide figura 06 (GONZÁLEZ-CABEZAS, 2010; BUZALAF *et al.*, 2011).

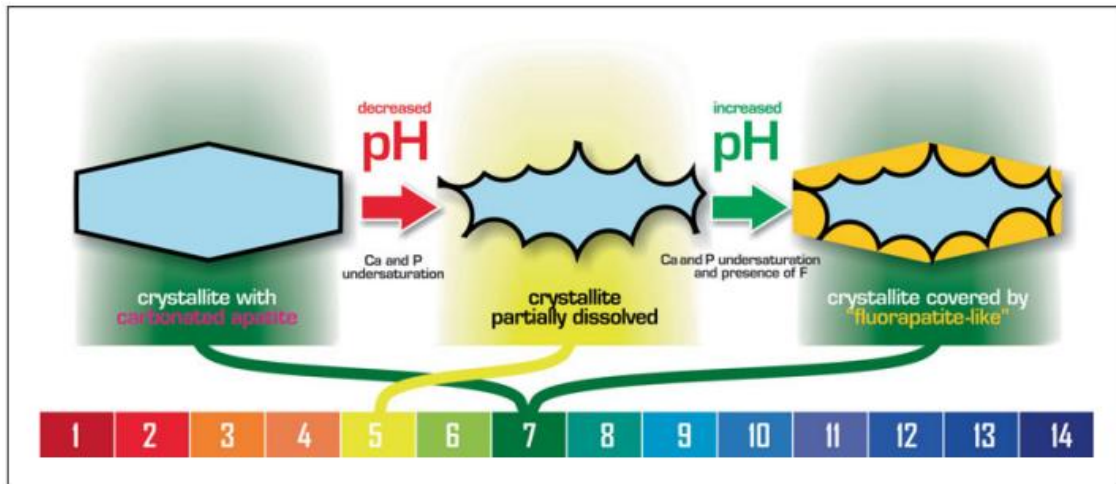


Figura 6: Processo esquemático da remineralização dentária na presença do flúor. (fonte: BUZALAF *et al.*, 2011)

O flúor ainda parece apresentar efeitos anticariogênicos quando administrado de forma sistêmica, como na água de abastecimento público, pois apesar de realmente apresentar grande efeito tópico ao se impregnar na matriz dentária e ao ficar em solução nos fluidos orais; também foi demonstrado que a exposição ao flúor num período pré-erupcional dentário gera uma adsorção do íon no esmalte dentário em formação, garantindo, assim, a formação de uma matriz dentária menos propensa a erosão e com possibilidade de liberação de fluoreto, no meio oral, frente a um desafio ácido após a erupção do dente (SINGH; SPENCER; BRENNAN, 2007).

Quando administrado de forma sistêmica parte do flúor absorvido tende a ser novamente secretado pelas glândulas salivares, favorecendo, desse modo, o enriquecimento dos fluidos orais e consequente melhora nos processos de remineralização dentária (TENUTA, CURY, 2010).

Os benefícios da fluoretação da água de abastecimento podem ser verificados, também, no preparo dos alimentos, pois ao se cozinhar feijão e arroz com água fluoretada, aumenta-se em até 4 vezes a concentração de flúor

na saliva. Esses alimentos tendem a ficar impregnado durante o preparo com o íon, havendo uma posterior liberação do F^- no momento da mastigação da refeição (TENUTA, CURY, 2010).

Em solução nos fluidos biológicos o flúor pode apresentar efeitos sobre a microbiota oral. Com a produção de ácidos pela fermentação bacteriana os íons de F^- interagem com o H^+ produzido, formando HF esse por sua vez é bastante permeável à membrana celular bacteriana e volta a se dissociar em meio citosólico, estando novamente na forma ionizável disponível para inibir algumas vias metabólicas dos micro-organismos, ajudando, assim, de forma indireta a reduzir a produção de ácido no biofilme, como demonstrado na figura 07 (KOO, 2008).

Nesse contexto, o íon fluoreto não demonstra ser um bacteriostático propriamente dito, mas causaria um *stress* metabólico sobre os micro-organismos, ao dificultar a realização de alguns processos bioquímicos como: inibição da atividade glicolítica, produção de ácido e síntese de glucano (BUZALAF *et al.*, 2011).

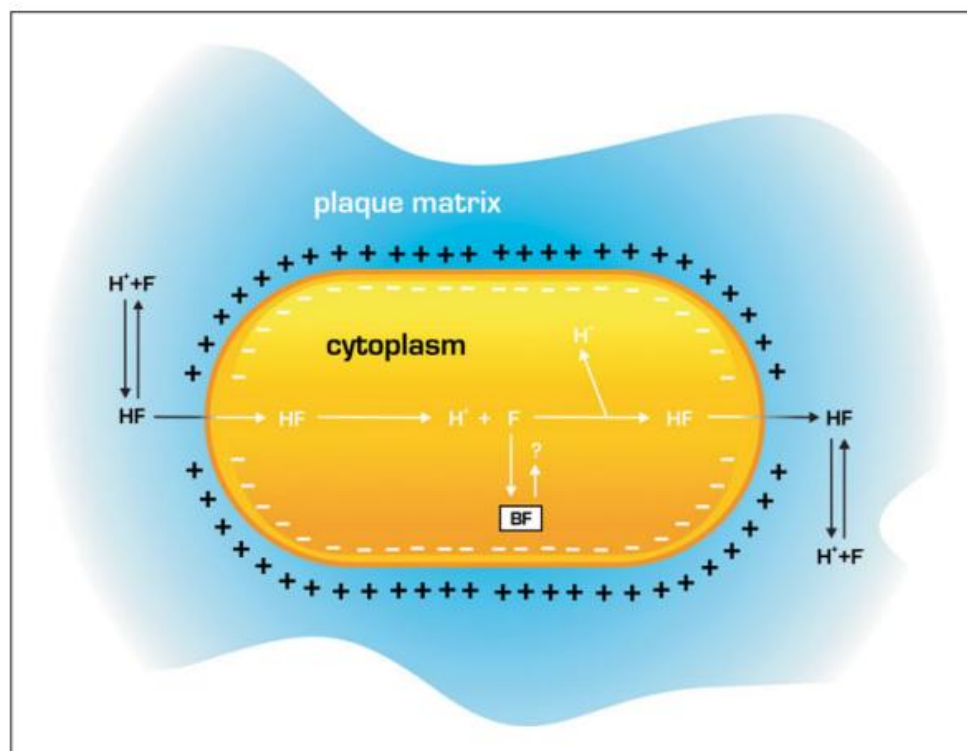


Figura 7. Acumulo, distribuição e efluxo de F^- em bactérias orais. (fonte: BUZALAF *et al.*, 2011)

Dentre as formas farmacêuticas que veiculam o F^- destacam-se os dentífrícios, pois esses conseguem combinar ação mecânica que desestabilizará o biofilme bacteriano com o aumento de flúor na cavidade oral. Quando o componente abrasivo do dentífrício é o carbonato de cálcio, ganha-se um incremento positivo na relação des/remineralização pois o aumento de Ca^{2+} intra oral também irá favorecer o processo de remineralização junto com o flúor (TENUTA, CURY, 2010; BUZALAF *et al.*, 2011).

Produtos de uso profissional com alta concentração de flúor como géis (9.000 a 12.300 ppm) e vernizes dentários (22.500 ppm) irão agir não apenas aumentando transitoriamente a concentração de flúor intraoral, mas também gerando a precipitação de sais de origem dentária formando depósitos minerais na cavidade oral como fluorapatita e fluoreto de cálcio que não irão se dissolver nos fluidos orais, mas terão sua liberação mediada pelo equilíbrio químico de dissolução, de modo lento; atuando, assim, como reservas de flúor e cálcio na cavidade oral que serão recrutadas no momento de um desafio erosivo ácido (TENUTA, CURY, 2010; BUZALAF *et al.*, 2011).

Esses métodos de uso profissional de formulações de flúor com altas concentrações se mostram bastantes úteis na prevenção e controle da cárie dentária em populações de alto risco, pois a liberação lenta e prolongada desses íons irá favorecer tanto a remineralização quanto a diminuição da produção de ácido, por stress do metabolismo bacteriano (TENUTA, CURY, 2010; BUZALAF *et al.*, 2011; SLADE *et al.*, 2011).

Num ensaio clínico conduzido com 543 crianças aborígenes australianas que foram acompanhadas por 2 anos, a cada 6 meses, com aplicação de verniz de flúor observou-se que houve uma redução de 24 a 36% na presença de cáries dentárias e uma prevenção de 31% quando comparadas com as crianças acompanhadas no grupo controle, desse modo, percebeu-se que flúor na forma de verniz é uma opção eficaz no controle da cárie em crianças (SLADE *et al.*, 2011).

Uma revisão sistemática que avaliou 23 ensaios clínicos randomizados ou não, que utilizaram verniz de flúor em concentração de 2,26% (fluoreto total), aplicados em crianças de 6 meses a 15 anos e dois desses em adultos de 44 a 79 (prevenção de cárie radicular), nos quais os vernizes foram aplicados a cada 6 meses ou anualmente. Foi demonstrado que a utilização de vernizes de flúor nessa concentração, em pacientes de 6 a 18 anos, na prevenção de cáries dentárias coronais e radiculares é recomendável, apresentando um nível evidência moderada (WEYANT, 2013). Entretanto, esse mesmo estudo avaliou outros 3 ensaios clínicos, nos quais se usou o verniz de flúor na concentração de 0,1% sendo esse confrontado com um placebo ou apenas orientações de higiene oral, a idade dos pacientes variou de 5 a 12 anos. Concluiu-se que a utilização de verniz de flúor nessa concentração não apresentou evidência de benefícios, não sendo recomendável a sua utilização com a finalidade de prevenção de cáries (WEYANT *et al*, 2013).

Uma metanálise avaliou 8 ensaios clínicos que comparavam o uso de dentifrício fluoretado padrão e com baixa concentração de flúor em crianças pré-escolares *versus* um placebo ou nenhuma intervenção. Os dados revelaram que houve redução significativa de 31% de cáries na superfície dentária e de 16% no dente, enquanto o dentifrício de baixa concentração de flúor se mostrou eficaz apenas na redução da cárie de superfície com 40%. Desse modo, concluiu-se que os dentifrícios padrão são eficazes na prevenção de cáries dentárias em pré-escolares, devendo seu uso ser recomendado nessa faixa etária (DOS SANTOS; NADANOVSKY; DE OLIVEIRA, 2013).

Dois trabalhos de revisão avaliaram o uso do flúor na forma de colutório numa concentração de 0,9% em crianças com mais de 6 anos; foi concluído que em crianças acima dessa idade o uso de colutório fluoretado se mostrou benéfico na prevenção da cárie dentária e que pelos riscos de deglutição não deve ser indicado para crianças menores (TENUTA, CURY, 2010; WEYANT *et al.*, 2013).

Em um estudo de revisão que avaliou a qualidade e consumo da água fluoretada descreve-se que a flouretação da água se mostrou efetiva na prevenção da cárie dentária, com uma mediana de 14,6% na redução de

crianças com cárie e com 40% de prevenção a novas cáries, entretanto os autores alertam para o risco de fluorose dentária e outros problemas de saúde, como lesões renais, por conta do consumo de água com teor maior de 0,9 mg/L de F⁻ (FRAZÃO; PERES; CURY, 2011).

A fluorose dentária é caracterizada pela exposição excessiva e/ou crônica de flúor levando a sua deposição no esmalte dentário, que ocorre durante o processo de odontogênese provocando, desse modo, um manchamento dos dentes. As manchas se caracterizam clinicamente por coloração branca a castanho escuro e presença de um esmalte dentário opaco, podendo inferir também em ocorrência de áreas hipoplásicas e de erosão; figura 08 (BEVILACQUA; SACRAMENTO; FELÍCIO, 2015).

É importante ressaltar que quando essas manchas fluoróticas atingem de 25 a 50% da superfície dentária serão classificadas com fluorose leve, ou seja, sem significância clínica e estética (FRAZÃO; PERES; CURY, 2011).



Figura 8: Manchas difusas e transversais da opacidade fluorótica. (fonte: FRAZÃO; PERES; CURY, 2011)

O tratamento estético da fluorose consiste na remoção mecânica da camada superficial do esmalte defeituoso até que se atinja uma camada de esmalte normal. Também podem ser eleitas condutas terapêuticas como o

clareamento e restaurações, a depender da gravidade das lesões (BEVILACQUA; SACRAMENTO; FELÍCIO, 2015).

1.4 Própolis

O termo própolis é derivado do grego *pro-* em defesa e *polis-* cidade, assim, a própolis é o componente resinoso utilizado para proteger a colmeia das abelhas criando um ambiente quase estéril e sendo utilizada para mumificar insetos e outros animais que venham morrer dentro da colmeia (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A própolis se apresenta como uma resina responsável pelo selamento das colmeias de abelhas (*Apis mellifera*), sendo proveniente da coleta delas em diversos tipos de vegetais. Atualmente se tem conhecimento de pelo menos 200 tipos de compostos identificados na própolis, a partir de amostras geográficas diferentes e da diversidade botânica. A caracterização química da própolis padronizou constituintes como: ácidos fenólicos prenilados, lignanas, terpenos e alcoóis terpênicos, além de derivados p-curmarinicos (ANAUTTE NETO *et al.*, 2013). Trata-se de um derivado formado por secreção mandibular das abelhas, e resina de diversos vegetais, assim quanto maior a variedade de amostras coletadas maior será a atividade terapêutica da própolis, pois essa apresenta a capacidade de incorporar as propriedades terapêuticas dos vegetais coletados (LUSTOSA *et al.*, 2008).

Nesse contexto, cita-se o caso da própolis proveniente da Europa cuja principal fonte de coleta das abelhas é o exudato de flores do gênero *Populus*, garantindo, assim, uma maior uniformidade na composição química dessa própolis, mas, no entanto, essa apresenta potencial terapêutico bastante limitado sendo pouco explorada economicamente (LIBERIO *et al.*, 2009).

No Brasil, a própolis é considerada um alimento tendo sua produção e comercialização regida pela portaria N° 6, de 25 de julho de 1985 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), apresentando assim sua segurança comprovada pelo amplo uso popular tradicional (BRASIL, 1985).

Para que medicamentos a base de própolis sejam registrados deve-se seguir a “Nota técnica para o registro de produtos contendo própolis” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) de 2005 (BRASIL, 2005b).

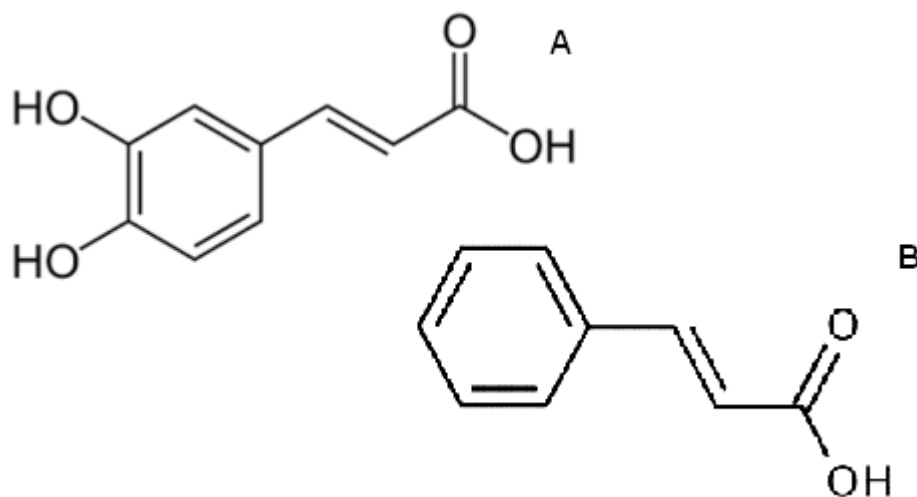


Figura 9: Representação química estrutural plana do ácido caféico (A) e do ácido cinâmico (B) (fonte: Autor via ChemsSketch®)

Sua composição química centesimal de modo geral é caracterizada por 50- 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos voláteis, 5% de pólen e 5% de outras substâncias que variam de acordo com flora local e a espécie da abelha produtora (LIBERIO *et al.*, 2009).

A própolis é uma resina não tóxica que demonstrou ter aplicações clínicas em uma gama de distúrbios de saúde, mas por apresentar grande variação da sua composição química, cada tipo de própolis tenderá a apresentar diferentes atividades terapêuticas. No mundo, foram padronizados quimicamente 12 tipos de própolis, sendo o tipo 3 proveniente da região sul do Brasil, o 6 do nordeste e o 12 da sudeste (DUARTE *et al*, 2006).

A Figura 10 apresenta as três variedades de própolis brasileira, denominadas, popularmente, conforme a cor que a sua resina apresenta, e pelo principal vegetal que é coletada. Assim, tem-se a: própolis ‘vermelha’, derivada de *Dalbergia ecastophyllum* (rabo-de-bugio), a ‘verde’, da *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), e a própolis ‘marrom’, da *Copaifera sp* (copaiba) (DA SILVA *et al*, 2013).



Figura 10: Extratos brutos resinosos de própolis brasileira verde (A), marrom (B) e vermelha (C). (Fonte: adaptada de <http://www.apiarioboaesperanca.com.br/loja/c/propolis>)

Dentre os efeitos farmacológicos da própolis pode-se listar: atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus; atividade anti-inflamatória, imunomoduladora e cicatrizante (LONGHINI *et al.*, 2007; LUSTOSA *et al.*, 2008; ANAUTTE NETO *et al.*, 2013). Particularmente, o efeito antibiótico da própolis pode ser explicado por dois mecanismos distintos: um regulado, principalmente, pela flavonona pinocembrina, pelo flavonol galagina e ao éster feniletil do ácido caféico que agirão, num mecanismo não elucidado completamente, na inibição da RNA-polimerase bacteriana e os flavonoides como: o ácido caféico, ácido benzóico, ácido cinâmico irão atuar via produção de danos nas paredes ou membranas celulares dos micro-organismos. Entretanto, observa-se atividade antimicrobiana maior frente a bactérias Gram + quando comparado com a Gram -. Esse fato pode ser explicado, de modo teórico, pela maior complexidade da parede celular das bactérias Gram- e o maior teor de lipídeos presente em sua estrutura que dificultariam a ação dos organocomplexos (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A própolis também demonstrou excelente atividade fungistática e fungicida *in vitro* contra leveduras causadora de onicomicoses (LONGHINI *et al.*, 2007). Além disso, um ensaio clínico comparou a eficácia de uma pomada

de própolis canadense, contra aciclovir em pomada e placebo no tratamento do Herpes genital do tipo II recorrente. A formulação com própolis demonstrou resultados mais efetivos que os dois outros grupos levando a um menor tempo de cicatrização das lesões e redução dos sintomas locais (VYNOGRAD; VYNOGRAD; SOSNOWSKI, 2000).

A atividade anti-inflamatória da própolis explica-se por dois mecanismos: no primeiro ocorre a inibição das ciclooxigenase e lipooxigenases com consequente diminuição da produção de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano; já um segundo efeito será coordenado pela inibição da fosfolipase-A2 que levará a uma redução na produção do ácido aracdônico, bloqueando, dessa forma, toda a cascata da inflamação. Essas duas ações são mediadas, principalmente, pela galangina e pelo ácido fenil éster caféico, respectivamente (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A própolis tem demonstrado ainda efeito imunomodulador, pois além de inibir a síntese de prostanoídes inflamatórios, ela também irá estimular o timo potenciando a imunidade celular de modo inespecífico e promovendo aumento da atividade fagocítica de polimorfonucleares (KOSALEC *et al.*, 2005).

As três variedades de própolis brasileira demonstram atividade farmacológica antiplaca e anticáries, sendo que a própolis nordestina vermelha, tipo 6, apresenta maior atividade anticariogênica *in vitro* e *in vivo* (DUARTE *et al.*, 2006).

Dentre os constituintes químicos presentes na própolis vermelha do nordeste pode-se citar o vestitol e neovestitol, isoflavonoides que demonstraram atividade antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces naeslundii* e atividade anti-inflamatória (BUENO-SILVA *et al.*, 2013a). Esses dados corroboram com a literatura que descreve que os principais agentes anticariogênicos presentes na própolis são de caráter apolar, sendo assim a solução hidroalcoólica um veículo extrator ideal (HAYACIBARA *et al.*, 2005).

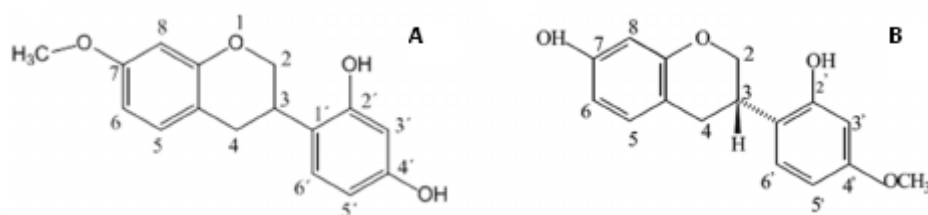


Figura 11: Representação química estrutural plana do neovestitol (A) e vestitol (B), respectivamente. (fonte: BUENO-SILVA *et al.*, 2013a)

Em odontologia, diversos estudos demonstra a atividade da própolis contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus Salivarius* corroborando ainda mais com a atividade anticariogênica da própolis vermelha (LIBÉRIO *et al.*, 2009; ANAUTTE NETO *et al.*, 2013; BUENO-SILVA *et al.*, 2013a).

Outro estudo realizado com ratos utilizou a produção de um biofilme bacteriano oral induzido pela infecção de *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* e dieta cariogênica. Os animais foram tratados por 5 semanas com extrato de própolis. Ao final conclui-se que os extratos não apresentaram redução significativa da carga microbiana, mas verificou-se que houve um decréscimo na produção de ácido no biofilme, assim como, diminuição na incidência de cárie superficial e sua gravidade. O estudo sugere que o extrato de própolis demonstra um potencial cariostático (DUARTE *et al.*, 2006).

Um trabalho realizado *in vitro* testou três extratos de própolis, provenientes dos estados do Paraná, Minas Gerais e São Paulo, contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*. As três amostras de própolis apresentaram atividade contra *S. mutans*, sendo a originária de Minas Gerais a mais potente, entretanto nenhum dos extratos exibiu atividade contra *L. casei* (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Dados de um trabalho com própolis nigeriana, no qual testou-se sua atividade frente a *Streptococcus mutans* isolados de lesões cáries *in vitro*, demonstraram que os extratos nas concentrações de 4, 8, 16 e 32 µg /mL apresentaram uma forte inibição do crescimento microbiano quando comparada a solução alcoólica e água pura usadas como branco. Dessa forma

o efeito antibiótico pode realmente ser atribuído à própolis e não ao etanol (OPHORI; ERIAGBONYE; UGBODAGA, 2010).

Num estudo realizado para verificação de efeito antimicrobiano contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*, utilizaram-se 3 extratos de própolis brasileira; a verde, a vermelha e a marrom, de forma isolada ou em associação de extratos. Percebeu-se que todas apresentavam atividade frente aos micro-organismos testados, mas que a vermelha foi mais potente de forma isolada e também quando associada com verde (DA SILVA *et al.*, 2013).

Um ensaio clínico comparou a utilização de própolis a 2% num colutório não alcoólico, com a clorexida 0,12% colutório e um placebo. Os pacientes foram acompanhados por 45 dias, utilizando o colutório específico por 28 dias. Verificou-se a carga microbiana de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus salivarius* nos dias 14 e 28, o colutório de própolis se mostrou mais efetivo na redução dos micro-organismos que a clorexidina e o placebo (ANAUATE NETTO *et al.*, 2013).

Em outro ensaio clínico foi avaliada a ação do extrato hidroalcoólico de própolis a 5% e o extrato associado com fluoreto de sódio, ambas com a forma farmacêutica de gel, sobre o acúmulo de biofilme dentário. Verificou-se que ambas as formulações conseguiram suprimir a carga microbiana de *Streptococcus mutans* e o acúmulo do biofilme sem diferenças significativas, porém apenas o gel em associação com fluoreto de sódio foi capaz de inativar manchas brancas de maneira significativa. Esses dados demonstram que a possibilidade de associação entre o fluoreto de sódio e o extrato de própolis parece ser bastante promissora como agente anticáries (DE-CARLI *et al.*, 2011).

1.5 Vernizes dentários

Vernizes dentários são formas farmacêuticas de uso odontológico. Geralmente, sendo compostos por uma matriz polimérica, excipientes

farmacêuticos e um princípio ativo, normalmente flúor ou clorexidina. Os polímeros mais utilizados são a etilcelulose, a quitosana e acrilato ou acetato de vinila, esses podem ser utilizados na forma de polímeros isolados ou em combinação (DE LUCA *et al.*, 2014).

Essas formulações apresentam como vantagens a grande adesão na parede dentária e a liberação lenta e gradual dos princípios ativos, desse modo, ocorre um prolongamento do efeito do agente terapêutico veiculado nessa forma farmacêutica seja ele um antimicrobiano ou anticariogênico (FRANCA *et al.*, 2014). Além disso, a forma farmacêutica de verniz dentário permite uma maior superfície de contato entre o ativo e a placa dentária, favorecendo desse modo uma maior interação entre o ativo e o dente (TANIKAWA-VERGILIO *et al.*, 2008).

Como as crianças menores de seis anos ainda não possuem o hábito adequado de “cuspir”, as formulações mais adequadas para a prevenção da doença cárie nessa idade seriam os vernizes, ao invés de enxaguatório ou gel, e também devido a sua alta capacidade retentiva e de liberação lenta do princípio ativo (WEYANT *et al.*, 2013).

1.6 Relevância do Estudo

A incidência de cárie em crianças na faixa etária de 36 a 71 meses, apesar da diminuição histórica que ocorreu de forma exponencial, ainda é muito alta, bem como o consumo de açúcares fermentáveis na forma de balas, chicletes, bombons e outras formas alimentares de “calorias vazias”, por conta de seu preço acessível, facilidade de aquisição e praticidade de consumo. Uma alternativa terapêutica interessante seria a utilização de vernizes dentários que veiculassem algum agente antimicrobiano. Ao se reduzir a quantidade de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus mutans*, haveria a possibilidade de maior controle da microbiota oral, dificultando o aparecimento das lesões de cárie.

Vernizes a base de produtos naturais vêm sendo estudados em pesquisas *in vitro* como agentes anti-cárie. Não foram encontrados, na literatura, relatos da utilização de vernizes a base de própolis vermelha brasileira, bem como ensaios clínicos comparando esses vernizes a outros existentes no mercado, que já apresentam eficácia comprovada na prevenção da cárie.

Em consequência do exposto, essa forma farmacêutica teria uma boa utilização nos pacientes infantis, com a finalidade de auxiliar no controle da doença cárie, através de uma possível atividade antimicrobiana desses vernizes a base do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha brasileira.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar o desenvolvimento, avaliação clínica e microbiológica de verniz dentário de própolis vermelha sobre redução de *streptococcus mutans* em crianças, com finalidade de prevenção da cárie dentária

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver a formulação de um verniz dentário capaz de veicular o extrato alcoólico de própolis vermelha brasileira;
- Realizar um ensaio clínico piloto com vernizes dentários de própolis vermelha brasileira, de diferentes concentrações, para nortear a escolha do mais efetivo na diminuição da carga microbiana de *Streptococcus mutans*;
- Avaliar a ação antimicrobiana dos vernizes *in vivo*, por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônias de *Streptococcus mutans*, antes e após os tratamentos propostos, na saliva de escolares;
- Verificar o aparecimento de lesões de cárie em crianças que receberam tratamento dentário com vernizes à base de própolis vermelha, de flúor (Fluorniz®), controle negativo, e de clorexidina a 1% (Cervitec®), o controle positivo.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego e longitudinal, controlado.

3.2 População do estudo

Foram selecionadas, para participação do estudo, 99 crianças, matriculadas em escolas públicas do Estado do Ceará. A triagem foi feita por meio de um exame clínico odontológico, feito em clínica específica, por profissional qualificado.

3.2.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: crianças com idade de 36 a 71 meses, ambos os gêneros, pertencentes a escolas públicas, e que apresentaram molares decíduos hígidos, bem como ausência de lesão cáriosa. Ainda, com anuência dos pais/responsáveis e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

3.2.2 Critérios de exclusão

Como critérios de exclusão foram adotados: presença de alguma doença sistêmica ou a aplicação ou uso de algum antibiótico ou quimioterápico

anti-infeccioso, três meses previamente ao início da pesquisa, histórico de alguma alergia, e presença de lesão cariosa ativa.

3.3 Aspectos éticos

O referido projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará sob o Nº 195.096 (ANEXO A), tendo sua elaboração sido norteadada pela Resolução CNS/MS 466/12 e pela Declaração de Helsinque na sua última atualização em 2013. Os pais foram convidados a participarem da pesquisa e informados sobre a mesma para posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.4 Examinadores

A coleta das amostras, anamnese, aplicação do tratamento, exame clínico para avaliação inicial, e avaliações subsequentes para verificação do aparecimento de novas lesões, foram realizadas por um profissional odontólogo, caracterizando seu vínculo como pesquisador adjunto, contando com o auxílio de alunos de odontologia, de iniciação científica, envolvidos no projeto de pesquisa.

Para minimizar os vieses de diagnóstico entre os grupos, foi realizada uma calibração do pesquisador adjunto dentista, de acordo com critérios recomendados pela *World Health Organization* (1993), obtendo-se o índice de kappa entre 0,8-1.

3.5 Obtenção, Manipulação e Identificação do extrato

Para esse estudo foi selecionado o extrato de própolis vermelha brasileira, que é a mais abundante no nordeste e a que tem documentada a melhor atividade contra micro-organismos presentes no biofilme bacteriano

dentário (LIBERIO *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2013).

O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha brasileira foi obtido a partir da empresa Natural Pharma, e manipulado no laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará (UFC) de maneira padronizada, visando à eliminação de toda umidade presente no extrato, por conta da incompatibilidade da água, com a matriz polimérica do verniz, findando na produção de um extrato alcoólico absoluto.

Em seguida, uma amostra do extrato alcoólico absoluto foi submetida à identificação química de seus constituintes no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará. Para devida caracterização química foi utilizada a técnica analítica de Ressonância Magnética Nuclear, por espectros de hidrogênio, padronizando os constituintes químicos Quercetina, Vestitol e neovestitol. Desse modo, buscou-se garantir a qualidade do extrato utilizado e a reprodutibilidade do estudo.

3.6 Desenvolvimento dos vernizes

Na preparação dos vernizes de própolis, buscou-se obter produtos farmacêuticos semelhantes aos disponíveis no mercado, de forma a se obter similaridade de cor, odor, consistência e sabor. Os vernizes foram manipulados com o extrato padronizado de própolis vermelha (ressuspendido em álcool absoluto), etilcelulose e álcool etílico absoluto, no laboratório de Farmacotécnica do curso de Farmácia, da Universidade Federal do Ceará.

Inicialmente, evaporou-se, em temperatura controlada, todo o solvente do extrato hidroalcoólico de própolis até que restasse apenas uma matéria resinosa, e essa foi ressuspendida em álcool etílico absoluto (Figura 12).



Figura 12: Extrato de própolis vermelha brasileira ressuspendido em álcool absoluto em repouso e após a precipitação. (fonte: o Autor)

Posteriormente, a etilcelulose foi dissolvida no álcool etílico absoluto com o auxílio de um sonicador, dando origem a um verniz base (Figura13). Num terceiro momento o verniz base foi incorporado com o sobrenadante do extrato de própolis vermelha brasileira nas diversas concentrações testadas.

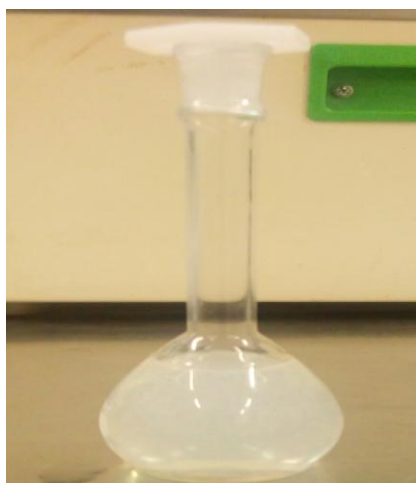


Figura 13: Verniz dentário base, sem princípios ativos. (Fonte: o Autor)

3.7 Estudo *in vivo* - Ensaio piloto

Para o ensaio piloto foram selecionadas 24 crianças, divididas em quatro grupos, para utilização do verniz dentário de própolis vermelha brasileira nas concentrações de 1%; 2,5%, 5% e 10%. Foram realizadas duas coletas de saliva, uma antes da aplicação do verniz, e uma logo após. Nessas amostras foram quantificadas a carga microbiana de *Streptococcus mutans*, e verificou-se qual das formulações foi capaz de gerar a maior redução dessa população de micro-organismos; assim, pode-se escolher a melhor opção de concentração do própolis no verniz dentário.

3.8 Estudo *in vivo* - divisão dos grupos e aplicação dos vernizes

Após o ensaio piloto, foram selecionadas 75 crianças e divididas em três grupos, com 25 crianças cada. O grupo I recebeu aplicação do verniz de própolis vermelha brasileira, o grupo II de clorexidina a 1% (Cervitec®), o grupo III de verniz de flúor a 2,26% (Fluorniz®). Cada paciente recebeu a aplicação do verniz correspondente ao seu grupo nos quatro segundos molares decíduos. Antes da aplicação dos vernizes, os dentes foram limpos profissionalmente com uma escova tipo Robinson e pedra-pomes. Os vernizes foram aplicados, com isolamento relativo, no dente selecionado usando um microbrush. Após 10s, o verniz foi sutilmente seco pelo ar da seringa tríplice. Os rolos de algodão foram retirados após 25 s para evitar a contaminação da saliva. O verniz foi aplicado 4 vezes para cada dente: no *baseline*, após 3 meses, 6 meses e após 1 ano do início do tratamento. Durante a avaliação, foi, também, registrada a presença ou ausência de cárie nos dentes avaliados.

3.9 Análise microbiológica

A saliva de cada paciente foi coletada em quatro momentos: no *baseline*, após 3, 6 e 12 meses do início do tratamento. Os pacientes mascaram um

fragmento de Parafilm® (3x3 cm), durante 60 segundos, para estimular a produção de saliva e liberar as bactérias do biofilme dentário. Esta foi coletada por meio de uma pipeta descartável e armazenada em Eppendorfs® estéreis para subsequente análise. As amostras foram transportadas ao laboratório em um isopor, contendo gelo, e analisadas em não mais do que 2 horas depois de coletadas. Um volume de 0,1 mL de cada amostra foi transferido para um tubo de hemólise estéril, contendo 0,9mL de solução salina. Esse processo foi repetido duas vezes, estabelecendo diluições de 1:100 e de 1:1000. Um volume correspondente a 10µL de cada diluição foi semeado em um meio de agar *mitis salivarius* bacitracina (MSB) em triplicatas. As placas foram incubadas a 37° C, durante 48 horas, em jarras de microaerofilia, e colocadas em estufa. Após esse período, colônias com características morfológicas dos SM foram contadas. As bactérias foram expressas na forma de UFC/mL de saliva.

3.10 Exames clínicos de controle

Foram realizados exames clínicos antes do início do tratamento e antes das aplicações dos vernizes que ocorreram com 3, 6 e 12 meses, com o objetivo de avaliar o impacto da terapia antimicrobiana no surgimento de lesões de cárie. Durante a avaliação, foi registrada a presença de cárie nos dentes avaliados. Também foram observados aspectos como sulco pigmentado sem retenção à sonda (selamento biológico), mancha branca por cárie dentária e ausência de cárie dentária.

3.11 Análise dos resultados

Para o estudo piloto as variáveis quantitativas, número de unidades formadoras de colônia (UFC) e redução absoluta das UFCs, foram inicialmente analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da

distribuição. Como tal requisito foi observado em todos os casos, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão, assim como foram empregados testes paramétricos para a estatística analítica. Para comparar as quatro concentrações (1, 2,5, 5 e 10%), utilizou-se a análise de variância (ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre as concentrações aos pares. Comparações entre o pré e pós-tratamento, considerando uma dada concentração, foram feitas pelo teste t para amostras emparelhadas.

Para o ensaio clínico, os dados relativos ao número de UFC foram inicialmente transformados com o propósito de homogeneizar as variâncias e tornar a distribuição mais próxima da normalidade. Para tanto, utilizou-se uma transformação logarítmica conforme a seguinte equação:

$$y = \log_{10}(x) = \log(x).$$

Em virtude de existirem valores iguais a zero, adicionou-se 1 a x , uma vez que a função logarítmica está definida apenas para $x > 0$.

Os valores transformados do número de UFC foram inicialmente analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Assim, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão, bem como foram usados empregados testes paramétricos para a análise dos dados. A análise de variância (ANOVA) foi usada para comparar os três grupos em cada tempo (análise intergrupos), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos aos pares. Comparações entre os diversos tempos dentro de cada grupo (análise intragrupo) foram feitas pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os tempos aos pares. Em todas as análises, estabeleceu-se o nível de significância em 0,05 (5%), sendo considerado como estatisticamente significativo um valor P menor que 0,05. O *software* GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi usado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Resultados da primeira etapa do estudo: estudo piloto

O estudo piloto contou com a participação de 24 crianças voluntárias, de ambos os sexos; entretanto, uma amostra foi perdida, pois não se pode evidenciar o crescimento de colônias no meio de cultura. Assim, o estudo seguiu com a manutenção de três grupos, com amostra de seis pacientes, e um grupo de cinco.

Na Tabela 2 pode-se verificar a redução absoluta de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans*, nas amostras, após o tratamento com os vernizes, nas concentrações testadas numa diluição de 1:100. Observa-se uma redução da carga microbiana na saliva nos pacientes tratados com o verniz de própolis vermelha brasileira a 2,5%.

Tabela 2: Redução absoluta do número de unidades formadoras de colônia (UFC) , de *Streptococcus mutans* mensurada nas amostras de saliva de 5 ou 6 crianças, com diluição de 1:100, tratadas com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%.

Diluição 1:100			
1%	2,5%	5%	10%
2,34	15,33	7,33	4,00
7,00	12,00	1,66	1,00
12,00	8,34		20,67
7,00	23,67	3,67	1,00
0,34	-0,33	0,33	0,00
1,34	0,67	11,33	18,00

Ao avaliar a Tabela 3, pode-se verificar valores de diminuição na redução da carga microbiana de *Streptococcus mutans*, na saliva, numa

diluição de 1:1000. O tratamento com os vernizes de própolis nas concentrações de 1% e 2,5% alcançaram a mesma média de redução.

Tabela 3: Redução absoluta do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* mensurada nas amostras de saliva de 5 ou 6 crianças, com diluição de 1:1000, tratadas com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%.

Diluição 1:1000			
1%	2,5%	5%	10%
4,33	10,66	5,00	1,00
0,33	1,33	0,67	1,00
11,00	1,67	0,33	1,00
0,00	7,33	0,33	1,00
5,67	0,33	0,00	
0,33	0,33	0,67	2,67

A Figura 14 demonstra, graficamente, as médias de reduções de UFC de *Streptococcus mutans*, após o tratamento com as concentrações testadas nos pacientes. Nota-se uma maior redução com a utilização do verniz na concentração de 2,5%.

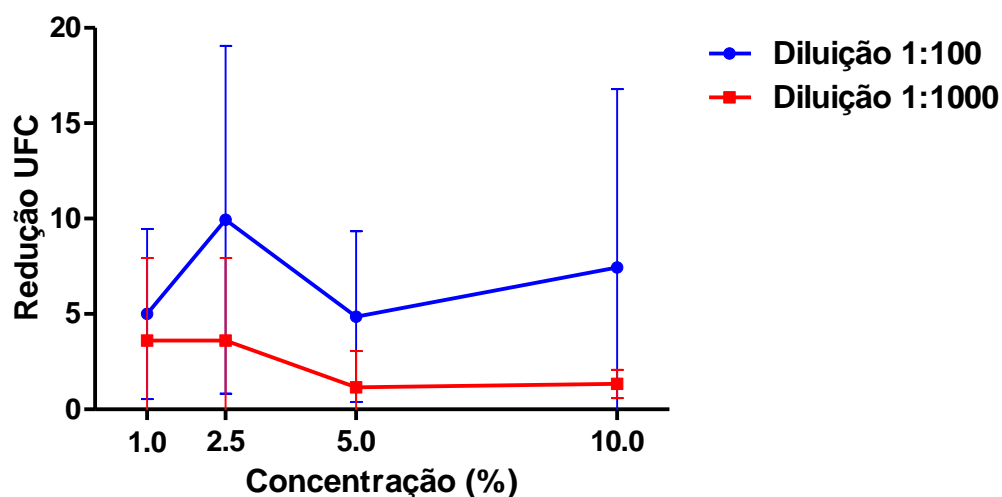


Figura 14: Gráfico da redução absoluta (média e desvio padrão) do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* mensurada nas amostras de saliva com diluição de 1:100 ou 1:1000 e tratadas com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%.

Na Tabela 4 são expressos os valores de média e desvio padrão da redução da carga microbiana na saliva, após o tratamento com os vernizes nas concentrações testadas. Verifica-se que o verniz de própolis vermelha brasileira, na concentração de 2,5%, apresentou a maior redução nos testes de ambas as diluições; entretanto, também, não apresentou significância estatística (Teste T) mas, ainda assim, foi o que mais se aproximou do valor de $p < 0,05$. Dessa forma a formulação com 2,5% de própolis vermelha brasileira foi a escolhida para dar continuidade ao estudo clínico.

Tabela 4: Redução absoluta do número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* mensurada nas amostras de saliva de 5 ou 6 crianças, com diluição de 1:100 ou 1:1000, tratadas com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%. Em cada concentração, comparações entre as duas diluições foram realizadas mediante o uso do teste *t* para amostras emparelhadas.

Concentração (%)	Diluição 1:100		Diluição 1:1000		Significância (Teste <i>t</i>)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
1	5,00	4,45	3,61	4,33	$p = 0,5106$
2,5	9,95	9,12	3,61	4,34	$p = 0,0605$
5	4,86	4,48	1,17	1,89	$p = 0,1302$
10	7,45	9,35	1,33	0,75	$p = 0,1400$

A escolha da concentração do verniz de própolis vermelha brasileira, a 2,5%, pode, também, ser amparada pela análise da Tabela 5, na qual verifica-se que houve uma maior redução, com significância estatística em relação aos outros grupos testados, numa diluição da amostra de 1:10.

Tabela 5: Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans* verificado nas amostras de saliva de 5 ou 6 crianças, com diluição de 1:10, antes e após o tratamento com verniz de própolis nas seguintes concentrações: 1, 2,5, 5 e 10%

Concentração (%)	Pré-tratamento		Pós-tratamento		Significância (Teste t)
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
1 (n=6)	8,22	5,21	3,22	3,30	p = 0,0402
2,5 (n=6)	11,06	8,23	1,11	1,69	p = 0,0443
5 (n=5)	8,06	6,94	3,20	3,02	p = 0,0720
10 (n=6)	9,67	12,64	2,22	4,81	p = 0,1085

Durante a realização do estudo piloto não foram verificadas ocorrências de reações adversas. Apenas foi relatado, pelos pacientes, o incômodo, considerado 'leve', pelo forte cheiro do álcool no verniz dentário.

4.2 Resultados da segunda etapa do estudo: ensaio clínico

O ensaio clínico contou com a participação de 75 voluntários sendo divididos em três grupos de tratamento: verniz de clorexidina, verniz de flúor e verniz de própolis. Entretanto, um paciente do grupo verniz de própolis foi perdido, pois a criança havia se mudado para outro país, ficando esse grupo com 24 pacientes.

4.2.1 Diluição 1:100

Na Figura 15, observa-se à média e desvio padrão da carga microbiana de *Streptococcus mutans* efetuadas nas amostras de saliva de 25 pacientes tratados com verniz de clorexidina. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi usada para comparar os diversos tempos, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os tempos aos pares. Observa-se que houve diferença estatisticamente significativa no dia 180 em relação ao *baseline*.

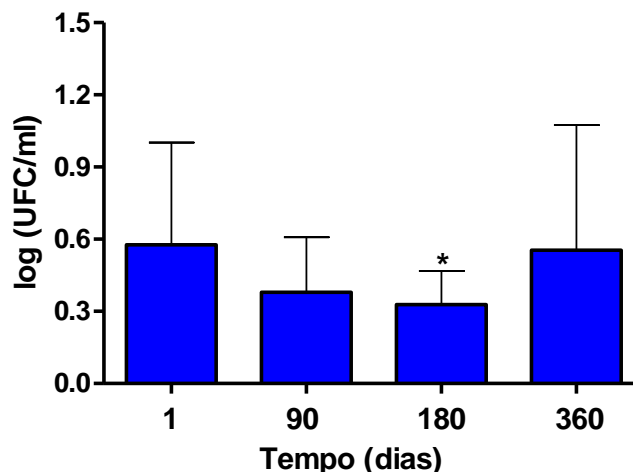


Figura 15: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação do verniz de clorexidina. (* $p < 0,05$)

Ao se analisar a Figura 16, percebe-se que houve diferença significativa na carga microbiana de *Streptococcus mutans*, resultando em uma diminuição dessa carga, em todos os períodos pós-tratamento com o verniz de flúor.

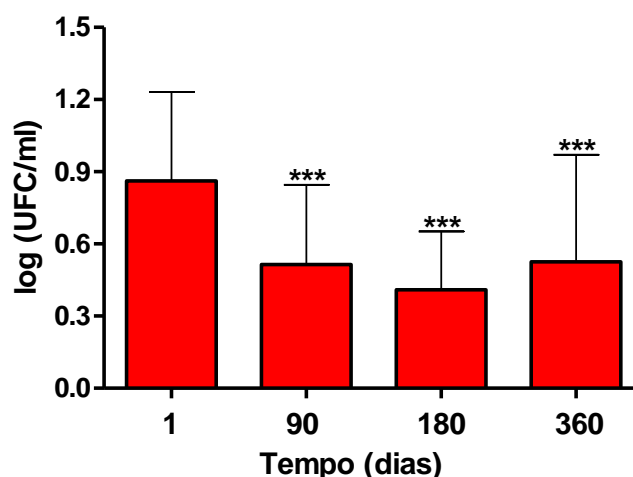


Figura 16: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por mL de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação do verniz de flúor (***) $P < 0,001$)

No gráfico a seguir (Figura 17), observa-se a diminuição da carga microbiana nas amostras de saliva diluídas de 1:100 em todos os períodos nos

pacientes tratados com o verniz de própolis vermelha brasileira; entretanto, apenas as reduções nos períodos de 90 e 180 dias foram consideradas estatisticamente significativas.

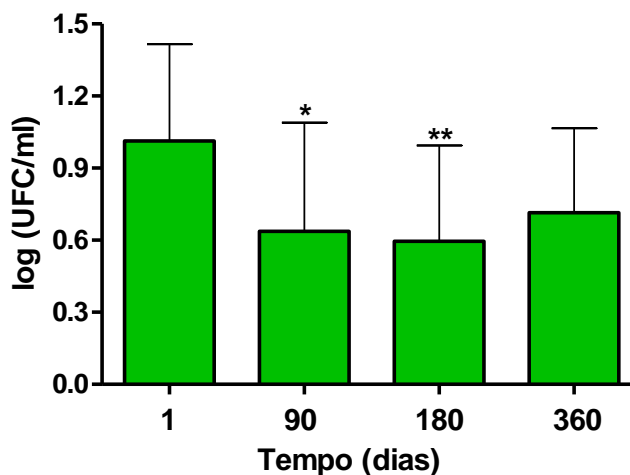


Figura 17: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação do verniz de própolis. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$)

A Figura 18 apresenta a comparação estatística dos três tratamentos, com os diferentes vernizes, no período de acompanhamento dos pacientes. Observa-se que o grupo tratado com o verniz de própolis vermelha brasileira apresentou redução no quantitativo de carga microbiana, estatisticamente significativo, em relação aos demais nos períodos de 1, 90 e 180 dias. Por sua vez, o grupo do verniz de flúor só demonstrou significância estatística no primeiro período.

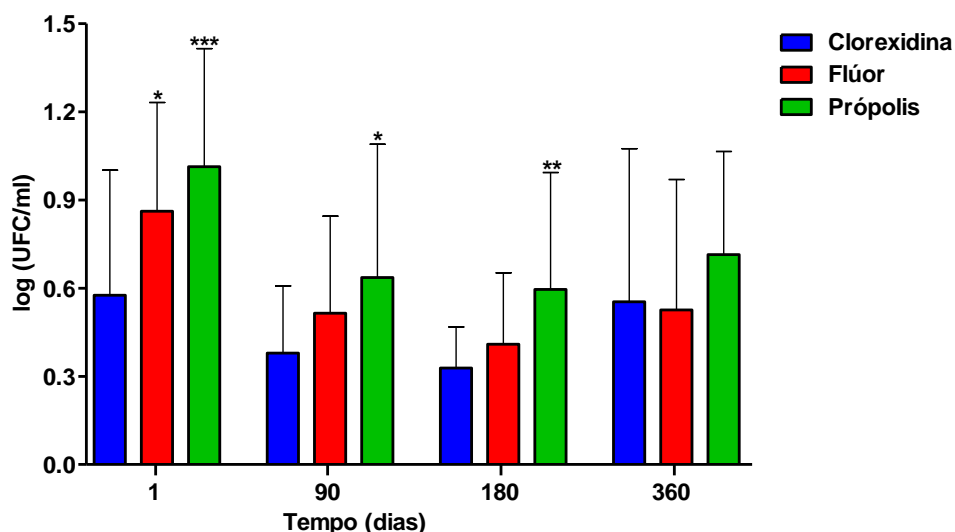


Figura 18: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis. (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001)

A Tabela 6 apresenta análise de período de tratamento entre os três grupos de vernizes. Observou-se a significância estatística na média das concentrações de *Streptococcus mutans*, no grupo verniz de própolis, nos períodos de 1, 90 e 180 dias, e no dia 1, para o verniz de flúor.

Tabela 6. Quantidade de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis.

Dia	Clorexidina	Flúor	Própolis	Significância (ANOVA)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
1	0,58 ± 0,43	0,86 ± 0,37 ^a	1,01 ± 0,40 ^c	p=0,0010
90	0,38 ± 0,23	0,51 ± 0,33	0,64 ± 0,45 ^a	p=0,0403
180	0,33 ± 0,14	0,41 ± 0,24	0,60 ± 0,40 ^b	p=0,0042
360	0,55 ± 0,52	0,53 ± 0,44	0,71 ± 0,35	p=0,2869

* ^a(p<0,05), ^b(p<0,01) e ^c(p<0,001) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao verniz de clorexidina no mesmo dia (teste de Tukey).

Ao se analisar a Tabela 7 é exposta a comparação entre os períodos de tratamento dos grupos de diferentes vernizes. Percebe-se que o grupo verniz de clorexidina apresentou diminuição da carga microbiana com significância estatística no dia 180; o grupo verniz de flúor nos três períodos de tratamento e o grupo verniz de própolis vermelha brasileira nos dias 90 e 180.

Tabela 7: Quantidade de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis.

Dia	Clorexidina	Flúor	Própolis
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
1	0,58 ± 0,43	0,86 ± 0,37	1,01 ± 0,40
90	0,38 ± 0,23	0,51 ± 0,33 ^c	0,64 ± 0,45 ^a
180	0,33 ± 0,14 ^a	0,41 ± 0,24 ^c	0,60 ± 0,40 ^b
360	0,55 ± 0,52	0,53 ± 0,44 ^c	0,71 ± 0,35
Significância (ANOVA)	P=0,0107	P<0,0001	P=0,0036

^a(P<0,05), ^b(P<0,01) e ^c(P<0,001) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao dia 1 (teste de Tukey).

Pelo exposto, ao se analisar, comparativamente, a redução da carga microbiana gerada pelo tratamento com os vernizes testados, observa-se um desempenho satisfatório do tratamento com o verniz de própolis vermelha brasileira, na redução da carga de *Streptococcus mutans*, principalmente nos períodos intermediários 90 e 180 dias, por conta da redução, estatisticamente significativa, na análise de saliva, na diluição de 1:100.

4.2.2 Diluição 1:1000

Os dados apresentados na Figura 19 correspondem à média e desvio padrão das medições efetuadas nas amostras de saliva de 25 pacientes tratados com verniz de clorexidina. A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi usada para comparar os diversos tempos, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os tempos aos pares. Os símbolos *($p < 0,05$) e **($p < 0,01$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao dia 1. Verifica-se esse fenômeno nos dias 180 e 360.

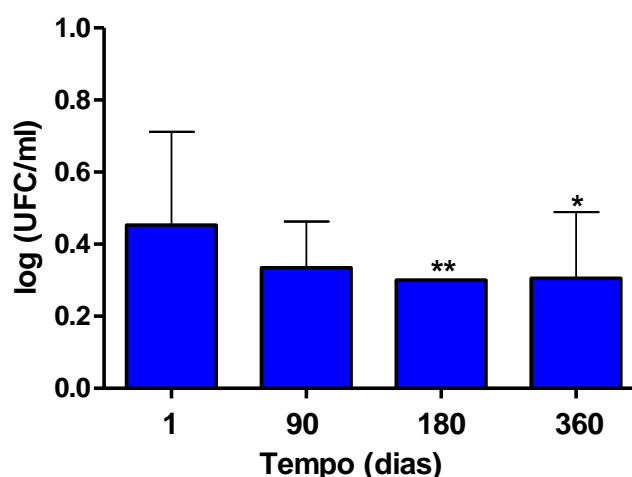


Figura 19: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação do verniz de clorexidina. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Pelo exposto no gráfico da Figura 20, observa-se que o tratamento com verniz de flúor conseguiu reduzir a carga microbiana salivar quando essa foi semeada numa concentração de 1:1000. Essa redução se manteve durante todos os períodos do estudo, no entanto apenas no dia 180 essa diferença se mostrou estatisticamente significativa com um valor de $p < 0,05$.

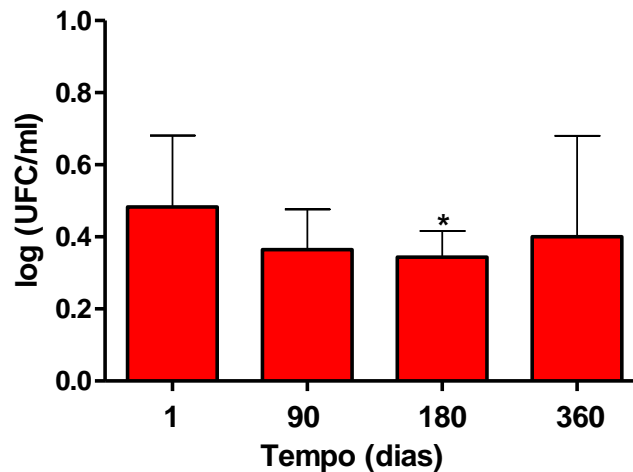


Figura 20: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação de verniz de flúor. (* $p < 0,05$)

Na Figura 21 é demonstrada, graficamente, a evolução da contagem microbiana em amostras de saliva numa diluição de 1:1000 durante o tratamento com o verniz de própolis vermelha brasileira. Verifica-se que houve uma diminuição em todos os períodos em relação ao *baseline*, mas sendo apenas estatisticamente significativa nos dias 90 e 180. No dia 360 houve um aumento da carga microbiana, sendo esse estatisticamente significativo em relação ao dia 180.

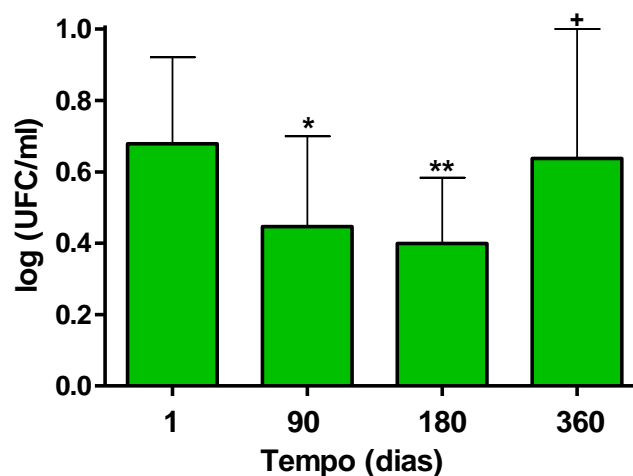


Figura 21: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva

com diluição de 1:1000 no pré-tratamento (dia 1) e nos dias 90, 180 e 360 após a aplicação de verniz de própolis. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; +(p<0,05) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 180)

O gráfico seguinte (Figura 22) apresenta a comparação estatística dos três tratamentos com os diferentes vernizes no período de acompanhamento dos pacientes. Pelo exposto, constata-se que o grupo tratado com o verniz de própolis denota diferenças estatisticamente significantes em relação ao verniz de clorexidina no *baseline*, dia 180 e 360, contudo ao ser comparado com o grupo tratado com o verniz de flúor, foi encontrada significância estatística no início do tratamento e no dia 360.

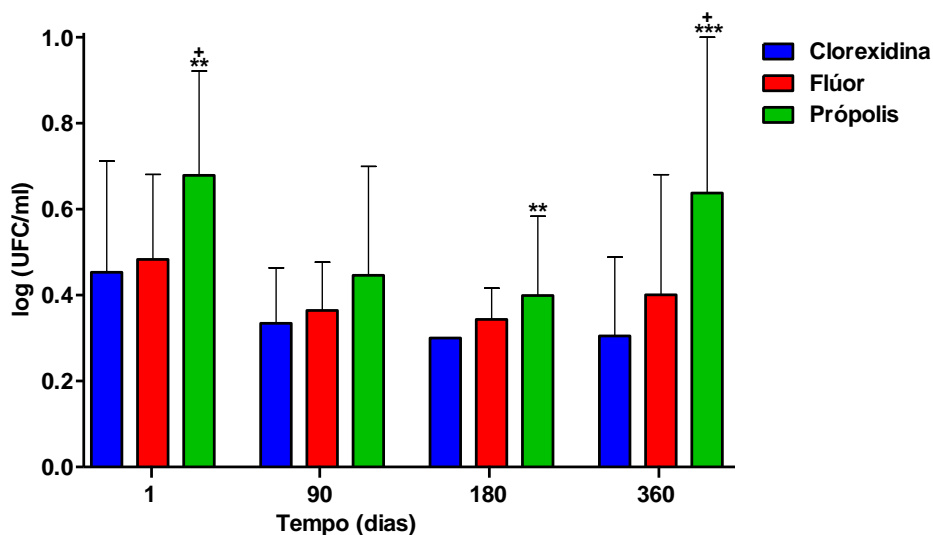


Figura 22: Gráfico da quantidade (média e desvio padrão) de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação a clorexidina; + $p < 0,05$ em relação a flúor)

Na Tabela 8 são expressas as comparações, durante o tratamento com os diferentes vernizes, da carga microbiana nas amostras de saliva por período de tratamento. Verifica-se que no dia 1, o grupo tratado com verniz de própolis apresentou diferenças estatísticas significantes frente ao grupo tratado com verniz de flúor e de clorexidina. Essa diferença estabeleceu-se apenas para

com o grupo da clorexidina, no dia 180, e voltando a aparecer, para ambos os grupos, no dia 360.

Tabela 8. Quantidade de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:1000 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis.

Dia	Clorexidina	Flúor	Própolis	Significância (ANOVA)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
1	0,45 ± 0,26	0,48 ± 0,20	0,68 ± 0,24 ^{a,c}	p=0,0023
90	0,33 ± 0,13	0,36 ± 0,11	0,45 ± 0,25	p=0,0766
180	0,30 ± 0,00	0,34 ± 0,07	0,40 ± 0,18 ^a	p=0,0120
360	0,31 ± 0,18	0,40 ± 0,28	0,64 ± 0,36 ^{b,c}	p=0,0004

^a(p<0,01) e ^b(p<0,001) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao verniz de clorexidina no mesmo dia, enquanto a letra ^c(p<0,05) corresponde a diferença estatisticamente significativa em relação ao verniz de flúor no mesmo dia (teste de Tukey).

A comparação entre os períodos de tratamento dos grupos de diferentes vernizes é demonstrada na Tabela 9. Observa-se que no grupo tratado com o verniz de clorexidina houve uma redução da carga microbiana de modo estatisticamente significativo nos dias 180 e 360. No grupo tratado com verniz de flúor no dia 180. Por sua vez, no grupo tratado com o verniz de própolis, nos dias 90 e 180, houve, no entanto, um aumento estatisticamente significativo, quando se compara o dia 180 com o dia 360; mesmo assim, apresentado um valor menor que o *baseline*.

Tabela 9: Quantidade de *Streptococcus mutans*, expressa como log (número de UFC por ml de saliva), mensurada em amostras de saliva com diluição de 1:100 nos dias 1 (pré-tratamento), 90, 180 e 360 nos pacientes tratados com os vernizes de clorexidina, flúor e própolis

Dia	Clorexidina	Flúor	Própolis
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
1	0,45 ± 0,26	0,48 ± 0,20	0,68 ± 0,24
90	0,33 ± 0,13	0,36 ± 0,11	0,45 ± 0,25 ^a
180	0,30 ± 0,00 ^b	0,34 ± 0,07 ^a	0,40 ± 0,18 ^b
360	0,31 ± 0,18 ^a	0,40 ± 0,28	0,64 ± 0,36 ^c
Significância (ANOVA)	p=0,0037	p=0,0417	p=0,0021

^a(p<0,05) e ^b(p<0,01) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao dia 1, enquanto a letra e ^c(p<0,05) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 180

Ao final do estudo foi verificada a presença de cáries em cinco crianças tratadas com o verniz de clorexidina; no grupo tratado com o verniz de própolis vermelha brasileira foram evidenciadas lesões cariosas em duas crianças, apesar dessas não estarem localizadas nos molares. Já no grupo tratado com o verniz de flúor, não foram desenvolvidas lesões cariosas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A prospecção de recursos alternativos para o controle da doença cárie é uma realidade atualmente. Nesse contexto analisa-se que a cárie dentária é uma doença modulada por múltiplos fatores, entre eles os micro-organismos acidogênicos. Desse modo, ao se controlar a população microbiana cariogênica no biofilme dentário pode-se ter uma alternativa para o controle da cárie dentária (LOBO *et al.*, 2008).

Assim, verifica-se a necessidade de estudar a ação de novos agentes de origem natural. A própolis vermelha brasileira já vem sendo estudada em diversos trabalhos nos quais demonstrou atividade frente a micro-organismo que estão envolvidos no processo da cárie dentária (LIBÉRIO *et al.*, 2009; ANAUTTE NETO *et al.*, 2013; BUENO-SILVA *et al.*, 2013a). Entretanto, ainda há necessidade de estudos de avaliação da veiculação da própolis em outras formas farmacêuticas, como os vernizes dentários, pois esses apresentam uma característica bastante peculiar; a liberação lenta dos princípios ativos na cavidade oral, gerando, desse modo, um sistema de liberação prolongada na boca.

Como não se observou referências na literatura sobre a concentração mais adequada para veiculação da própolis vermelha brasileira, na forma farmacêutica de verniz dentário, foi necessário a realização de um estudo piloto preliminar para que essa concentração pudesse ser estabelecida para uso em odontopediatria, viabilizando que o estudo clínico pudesse prosseguir.

Estudos *in vitro* e *in vivo* serviram de suporte para a utilização da própolis vermelha brasileira. Num estudo *in vitro* foi verificada a ação do extrato alcoólico da própolis vermelha brasileira frente ao *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, além disso, ainda foi constatada a capacidade do extrato de inibir a produção de ácido pelos micro-organismos testados, fato que será benéfico no processo de gênese da cárie dentária. Essa diminuição da produção de ácido foi atribuída a inibição enzimática da F-ATPase citosólica (DUARTE *et al.*, 2006).

A ação *in vitro* dos extratos de própolis frente ao *Streptococcus mutans* também foi confirmada em outros estudos. Dados do estudo de Nogueira *et al.* (2007) demonstram a ação dos extratos de própolis brasileira coletados de diversas regiões frente ao *Streptococcus mutans*. No trabalho de Ophori, Eriagbonye e Ugbodaga (2010), testou-se, exitosamente, o extrato de própolis nigeriana que, assim como as variedades brasileiras, apresenta grande diversidade de constituintes químicos.

No presente estudo o verniz de própolis vermelha brasileira apresentou a melhor concentração de 2,5%; essa foi verificada após a realização do estudo piloto. Acredita-se que pelo fato da grande complexidade de constituintes químicos presentes na própolis vermelha brasileira uma forma farmacêutica com menor concentração apresentaria uma menor interação entre os excipientes farmacêuticos utilizados na formulação. Entretanto, é necessária a posterior realização de estudos de pré-formulações como compatibilidade entre os excipientes farmacêuticos e o extrato de própolis que pode ser verificado por metodologia de estresse térmico, a citar: *Differential scanning calorimetry* (DSC) [calorimetria exploratória diferencial] e termogravimetria (BRASIL, 2005a). Outra análise farmacêutica que seria interessante para melhoria da *performance* do produto seria a realização de ensaio de liberação do princípio ativo no qual seria possível verificar a taxa de liberação do extrato de própolis pela matriz polimérica do verniz dentário (BRASIL, 2005a).

Além disso, durante a realização do estudo piloto, não foram verificadas a ocorrência de reações adversas nos pacientes tratados com o verniz dentário de própolis vermelha brasileira, mesmo em concentrações diferentes. A única queixa correlata das crianças foi o sabor forte de álcool, por conta da alta graduação alcoólica da formulação. Entretanto, essa percepção era transitória, pois rapidamente o álcool contido no verniz evaporava.

Os vernizes dentários são formas farmacêuticas de uso odontológico que apresentam uma boa aceitação por parte do paciente pediátrico. Apresentando como vantagem uma aplicação relativamente rápida (variando de 1 a 4 minutos e logo após a criança pode fechar a boca), simples e segura para o profissional odontopediatra, no consultório, e sendo oportuna também pelo fato da criança

pequena não sofrer o risco da deglutição do produto como no uso de colutórios e géis dentários (CARVALHO *et al.*, 2010; WEYANT *et al.*, 2013).

No presente estudo o verniz de própolis vermelha brasileira foi capaz de atuar na redução da carga microbiana de *Streptococcus mutans* salivar, sendo eficaz nos períodos de 90 e 180 dias após a sua aplicação, apesar ter gerado redução no dia 360 essa não se mostrou estatisticamente significativa.

Numa revisão sistemática é descrito que vários estudos que foram avaliados utilizam, na sua metodologia, a aplicação do verniz de clorexidina em pacientes pediátricos a cada 2/3 meses (JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010). Em outra revisão sistemática, verificou-se que o verniz de clorexidina apenas apresentava efeito na prevenção da cárie dentária quando aplicado em intervalos de 3 a 4 meses (ZHANG *et al.*, 2006). Num ensaio clínico realizado com pacientes hebiátricos, com utilização de vernizes de clorexidina, as aplicações dos grupos foram divididas em mensais, a cada dois meses, e a cada quatro meses (DERKS *et al.*, 2008).

Nesse contexto, aplicações do verniz dentário de própolis vermelha brasileira a 2,5% demonstrariam maior eficácia, caso fossem repetidas com menor espaço de tempo. Pelos dados apresentados no estudo, uma aplicação a cada 3 meses seria mais interessante para inclusão do produto farmacêutico na prática clínica odontológica.

Outro fator relevante foi a expressiva carga microbiana inicial de *Streptococcus mutans* apresentada pelos pacientes do grupo tratado com o verniz dentário de própolis, quando comparada aos pacientes tratados nos outros dois grupos. Dados da literatura correlacionam uma alta carga microbiana em pacientes pediátricos com hábitos deficitários de higiene oral por parte dos pais, uma vez que as crianças não são responsáveis o suficiente para realizar essa rotina de limpeza e higienização (LOSSO *et al.*, 2009). Tendo em vista que o controle da população microbiana no biofilme é apenas um dos fatores que devem nortear o controle da cárie dentária, esse pode ter sido um viés do nosso estudo, por conta da falta de uniformidade desse parâmetro entre os grupos de tratamento dos diferentes vernizes.

Entretanto, o índice de pacientes que apresentaram cárie dentária no grupo tratado com o verniz de própolis foi relativamente baixo, mesmo com a elevação da carga microbiana no dia 360. Esse fato pode ser explicado, em parte, pela presença de pelo menos dois constituintes químicos na própolis vermelha brasileira: o vestitol e neovestitol (BUENO-SILVA *et al.*, 2013a; BUENO-SILVA *et al.*, 2013b). Esses isoflavonoides apresentam grande efeito antioxidante e antimicrobiano. Dados de um estudo *in vitro* no qual foram isolados os dois constituintes químicos, foi demonstrado que eles possuem a capacidade de diminuir a produção de polissacarídeos extracelulares solúveis e insolúveis. Desse modo, a produção e a adesividade do biofilme bacteriano, na matriz dentária, estaria diminuída; o que seria benéfico para o processo de cariogênese, pois ocorreria menor interação do biofilme com a placa dentária (BUENO-SILVA *et al.*, 2013b).

Outro resultado desse estudo de Bueno-Silva e colaboradores (2013) revelou que esses compostos possuem a capacidade de gerar um *stress* no metabolismo do *Streptococcus mutans* diminuindo a atividades de diversas enzimas, dentre elas as glicosiltransferases, que auxiliam na formação do biofilme, e também de outras rotas metabólicas envolvidas na produção de ácido pelos microorganismos. Contudo, os compostos não apresentaram atividade microbicida expressiva frente ao *Streptococcus mutans*.

Essas ações do vestitol e neovestitol podem ser bastante promissoras no processo cariogênico, pois parecem diminuir o acúmulo do biofilme na matriz dentária e a sua virulência.

Um estudo *in vitro* avaliou a atividade antimicrobiana de vernizes de própolis verde nas concentrações de 5, 10 e 15% com quitosana. Os vernizes foram testados frente aos micro-organismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida albicans*, *Candida lusitaniae* e *Candida dubliniensis*, sendo comparados com a clorexidina e nistatina. Contra todos os micro-organismos testados, o verniz de própolis verde e quitosana em

diferentes concentrações demonstraram ação superior que a clorexidina e a nistatina (FRANCA *et al.*, 2014). Além disso, esse estudo também verificou que a própolis consegue ser liberada pela forma farmacêutica de verniz dentário por até nove semanas, com liberação de 20 a 30% da própolis nas primeiras 24h. Pelo exposto, verifica-se um perfil de ação semelhante ao encontrado no verniz de própolis estudado no nosso presente ensaio, que conseguiu apresentar resultados satisfatórios até em um intervalo de 90 dias da aplicação, no dia 180.

Outro estudo *in vitro* também avaliou a ação de vernizes de própolis verde nas concentrações de 5, 10 e 15% com quitosana frente a micro-organismo cariogênicos. Foram testados os micro-organismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* e *Lactobacillus casei*. Os vernizes de própolis verde e quitosana de diferentes concentrações inibiram o crescimento dos micro-organismos de modo significativo, de modo semelhante ao extrato de própolis puro, demonstrando não haver, uma possível, incompatibilidade na liberação da própolis pelo verniz. Além disso, os vernizes de própolis em todas as concentrações apresentaram maior inibição do crescimento microbiano que a clorexidina (DE LUCA *et al.*, 2014). Ainda, o trabalho de De Luca e colaboradores também realizou o teste citotoxicidade dos vernizes, em diferentes concentrações; verificou-se que o verniz de própolis verde e quitosana apresentou uma citotoxicidade muito baixa de acordo com a ISO 10993-5 de 2009, que rege os ensaios de citotoxicidade de dispositivos com finalidade clínica .

Diferentemente do estudo anterior o verniz de própolis utilizado liberou, quase que na sua totalidade, flavonoides, nas primeiras 24h, não sendo essa uma característica desejada numa forma farmacêutica de verniz dentário, na qual se busca uma liberação prolongada e sustentada dos princípios ativos conforme menciona DE LUCA *et al.*, 2014.

O grupo tratado com o verniz de clorexidina, como esperado, apresentou redução estatisticamente significativa da carga microbiana de *Streptococcus mutans* nas amostras de saliva, no dia 180, na diluição de 1:100, e nos dias

180 e 360, na diluição de 1:1000. Entretanto, ao final do estudo cinco crianças foram diagnosticadas com cárie dentária.

Atualmente não há um consenso na literatura sobre a real utilidade do verniz de clorexidina na prevenção de cáries dentárias. Uma revisão sistemática avaliou a eficácia de vernizes de clorexidina na prevenção da cárie dentária em crianças. Um total de 12 estudos foi incluído e chegou-se ao veredito que a eficácia do verniz de clorexidina para prevenção de cáries é inconclusiva (JAMES; PARNELL; WHELTON, 2010).

Outra revisão sistemática feita por SLOT e colaboradores, 2011, avaliou a eficácia do verniz de clorexidina na prevenção de cáries radiculares. Nessa revisão, foram selecionados 6 estudos publicados, nos quais foi verificado que o verniz de clorexidina é eficaz quando a profilaxia dentária é realizada por profissional, e que pode apresentar benefício quando utilizado para prevenção em pacientes com alto risco de cáries (pacientes geriátricos e com xerostomia). Desse modo, a revisão concluiu que o verniz de clorexidina se mostra benéfico quando há limpeza profissional regular, e em pacientes com necessidades especiais; entretanto, o nível dessa recomendação foi classificada como fraca conforme os critérios de avaliação de evidência estabelecidos por SLOT e colaboradores.

Apesar da clorexidina diminuir de modo efetivo a carga microbiana no biofilme dentário, novamente leva-se em consideração que a cárie é uma doença açúcar-dependente mediada por múltiplos fatores. Assim, torna-se necessária uma abordagem mais ampla para melhor controle dessa condição clínica (ZAFAR; HARNEKAR; SIDDIQ, 2009; TENUTA, CURY, 2010).

O grupo tratado com o verniz de flúor apresentou uma redução significativa da carga microbiana de modo sustentado durante o estudo, nos dias 90,180 e 360, quando verificada na diluição de 1:100. Entretanto quando se realizou a contagem de unidades formadoras de colônias na diluição de 1:1000 da saliva apenas foi evidenciado uma redução da carga microbiana estatisticamente significativa no dia 180. Essa diminuição pode ser explicada pelo efeito residual do flúor na cavidade oral, assim o fármaco não apresentaria efeito antimicrobiano especificamente, mas pela capacidade de causar *stress* no

metabolismo do *Streptococcus mutans* controlando assim a população do micro-organismo na cavidade oral (BUZALAF *et al.*, 2011).

Esses resultados corroboram com os de um ensaio clínico que avaliou a atividade antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* de um verniz de flúor em crianças. Nesse estudo houve extensiva redução da carga microbiana após o tratamento. No entanto, no referido estudo realizou-se a coleta de material biológico dos pacientes somente 24h após a aplicação do verniz. Diferenciando, assim, da metodologia do presente estudo, pois é sabido que o fluoreto presente no verniz sofre uma grande liberação nas primeiras horas, apresentando, desse modo, um potencial antimicrobiano propriamente dito (JEEVARATHAN *et al.*, 2007).

Em outro estudo, realizado *in vitro* se avaliou o efeito antimicrobiano do verniz de flúor frente a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* por difusão em biofilme experimental. Nos resultados foi verificado que o fluoreto liberado pelo verniz foi capaz de inibir o crescimento microbiano, principalmente nas primeiras 24h e sendo sustentado por até 96h (ERDEM *et al.*, 2012). Esses dados também apoiam os do presente estudo.

Dados de um estudo *in vitro* que avaliaram a atividade antimicrobiana do verniz de flúor sobre *Streptococcus mutans* durante 94h, revelaram que o fluoreto liberado pelo verniz foi capaz de reduzir a adesividade dos micro-organismos no disco de hidroxiapatita. Entretanto como era de se esperar o efeito inibitório sobre o crescimento dos *Streptococcus mutans*, a produção de polissacarídeos insolúveis extracelulares e produção de ácido foi diminuído com o passar do tempo. Quando esses dados são extrapolados para clínica verifica-se a necessidade da reaplicação do verniz dentário para sustentação do seu efeito sobre a microbiota oral (CHAU *et al.*, 2014).

Apesar de todos os dados apresentados, ressalta-se que o principal efeito anticariogênico do flúor, na cavidade oral, será representado pelo reforço positivo no processo de des/remineralização, no qual se diminuirá a desmineralização da matriz dentária pela formação da fluorapatita, mais resistente à dissolução em meio ácido. Ocorrerá, então, o favorecimento da remineralização, pela formação do núcleo de fluorapatita na matriz desgastada

que recrutará os minerais em solução nos fluidos orais para a placa dentária (GONZÁLEZ-CABEZAS, 2010; BUZALAF *et al.*, 2011).

Um ensaio clínico avaliou a atividade antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans*, o acúmulo de biofilme e quantificação das manchas brancas ativas de um gel dentário de própolis e um gel dentário de própolis com fluoreto de sódio. Foi verificado que ambos os géis apresentaram efeitos benéficos na redução da carga microbiana de *Streptococcus mutans* e em relação ao acúmulo de biofilme, sem apresentar diferenças estatisticamente significantes. Contudo, apenas o gel associado de própolis e fluoreto de sódio foi capaz de inativar de modo significativo as manchas brancas (DE-CARLI *et al.*, 2011). Esses dados são bastante relevantes, pois demonstram uma associação que pode ser explorada em estudos posteriores, para desenvolvimento de um novo produto farmacêutico anticariogênico, uma vez que ele atuará em duas vias do controle da doença cárie: na redução da carga microbiana de bactérias acidogênicas e de maneira a modular positivamente o processo des/remineralização.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio da realização do estudo piloto foi verificado que a melhor concentração para o verniz de própolis vermelha brasileira é de 2,5%.

Durante a segunda etapa do estudo apurou-se que o verniz de própolis vermelha brasileira 2,5% apresentou ótima atividade antimicrobiana frente ao *Streptococcus mutans* nos dias 90 e 180, ao final do estudo duas crianças apresentaram cáries dentárias em incisivos centrais. O verniz de clorexidina só gerou redução estatisticamente significativa nos dias 180 e 360 e ao fim do estudo cinco crianças apresentaram cáries dentárias, inclusive nos molares em que o verniz foi aplicado. O verniz de flúor gerou uma menor redução da carga microbiana frente aos outros grupos, mas teve seu efeito sustentado até o último atendimento do paciente, no qual nenhuma criança apresentou cárie dentária.

Para melhor ação clínica do verniz dentário de própolis vermelha brasileira recomenda-se sua utilização em intervalos de reaplicações a cada 90 dias.

O verniz de própolis vermelha brasileira poderia ser uma alternativa farmacoeconomicamente viável como adjuvante na prevenção da carie dentária, podendo futuramente ser incluído no Sistema Único de Saúde.

Foi realizado o depósito de pedido de patente do verniz de própolis vermelha testado no estudo (ANEXO B).

Recomenda-se a realização de estudo de pré-formulação do verniz dentário de própolis vermelha brasileira a 2,5% a fim de melhorar a performance do produto desenvolvido.

Recomenda-se a realização de novos estudos com essa e outras formas farmacêuticas de uso odontológico associando a própolis vermelha brasileira e o fluoreto de sódio para prevenção de cáries dentárias.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O verniz dentário de própolis vermelha brasileira 2,5% mostrou-se eficaz no controle das unidades formadoras de colônias de *Streptococcus mutans* na cavidade oral, quando utilizado no intervalo de 90 dias.

REFERÊNCIAS

ANAUATE NETTO, C., MARCUCCI, M. C., PAULINO, N., et al. Effects of typified propolis on mutans streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. **Brazilian Dental Science**, 16(2), 31–36, 2013.

ARROW, P; RAHEB, J; MILLER, M. Brief oral health promotion intervention among parents of young children to reduce early childhood dental decay. **BMC Public Health**, v. 13, n. 1, p. 245, 2013.

BAGRAMIAN, R.A. et al. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. **Am J Dent**, v. 22, n. 1, p. 3-8, 2009.

BANTING D.W; PAPAS A.; CLARK D.C; PROSKIN, H.M; SCHULTZ, M; PERRY, R: The effectiveness of 10% chlorhexidine varnish treatment on dental caries incidence in adults with dry mouth. **Gerodontology**, 17:67-76, 2000

BEVILACQUA; F.M; SACRAMENTO, T; FELÍCIO, CM; Amelogênese Imperfeita, Hipoplasia de Esmalte e Fluorose Dental–Revisão da Literatura. **ReBraM**, v. 13, n. 2, p. 136-148, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica para o registro de produtos contendo própolis. 2005a**. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>>. Acesso em Acesso em 06 mar. 2017

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 1, de 29 de julho de 2005b. **Guia para a realização de estudos de estabilidade**. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/01_05_re_comentada.pdf>. Acesso em Acesso em 12 mar. 2017

_____. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. portaria nº 6, de 25 de julho de 1985. **Normas Higiénico-Sanitárias e Tecnológicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados**. Disponível em:<

<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/portaria-6-de-1985-mel.pdf>>.

Acesso em 06 mar. 2017.

_____. Ministério da Saúde. DATASUS. **Índice CPO-D. 2011**. Disponível em:< http://fichas.ripsa.org.br/2011/g-17/?l=en_US> . Acesso em: 25 fev. 2017.

BUENO-SILVA, B. et al. Effect of Neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on biofilm accumulation in vitro and dental caries development in vivo. **Biofouling**, v. 29, n. 10, 2013a.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 19, p. 4546-4550, 2013b.

BUZALAF, M.A.R et al. Mechanisms of action of fluoride for caries control. In: **Fluoride and the oral environment**. Karger Publishers. p. 97-114. 2011

CARVALHO, D.M et al . O uso de vernizes fluoretados e a redução da incidência de cárie dentária em pré-escolares: uma revisão sistemática. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo , v. 13, n. 1, p. 139-149, Mar. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2010000100013&lng=en&nrm=iso . acesso em: 12 Mar. 2017.

CCAHUANA-VÁSQUEZ, R.Alberto; CURY, J.A. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Brazilian oral research**, v. 24, n. 2, p. 135-141, 2010.

CHAU, N.P.T et al. Evaluation of Streptococcus mutans adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. **Journal of dentistry**, v. 42, n. 6, p. 726-734, 2014.

COSTA, D.P.; MOTA, A.C.M.; BRUNO, G.B.; ALMEIDA, M.E.L.; FONTELES, C.S.R. Protein-energy malnutrition and early childhood carie. **Rev. Nutr.**, v. 23, p. 119-126, 2010.

DA SILVA, J.L.D.C et al. Synergic effect of associated green, red and brown Brazilian propolis extract onto Streptococcus mutans and Streptococcus

sanguinis. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 29, p. 2006-2010, 2013.

DE LUCA, M.P. et al. Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

DE-CARLI, A.D et al. Ação da própolis de apis mellifera associada ao fluoreto de sódio sobre o biofilme dental: ensaio clínico duplo cego randomizado. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 19, n. 51, 2011.

DERKS, A et al. Effect of chlorhexidine varnish application on mutans streptococci counts in orthodontic patients. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 133, n. 3, p. 435-439, 2008.

DOS SANTOS, A.P.P; NADANOVSKY, P; DE OLIVEIRA, B.H. A systematic review and meta-analysis of the effects of fluoride toothpastes on the prevention of dental caries in the primary dentition of preschool children. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 1-12, 2013.

DUARTE, S et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 1, p. 15-22, 2006.

ERDEM, A. et al. Effects of two fluoride varnishes and one fluoride/chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation in vitro. **Int J Med Sci**, v. 9, n. 2, p. 129-136, 2012.

FIGUEIREDO, L. C.; CORTELLI, S. C.; ARAUJO, M. W. B.; COELHO, M. H. M.; BARRETO, I. M. Q.; FERES, M. Ação antimicrobiana de extratos vegetais sobre a microbiota da placa dentária e saliva: estudo *in vitro*. **Rev. Odontol. Unicid**, v. 16, n. 1, p.15-20, 2004.

FRANCA, J.R. et al. Propolis-based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 478, 2014.

FRAZÃO, P; PERES, M.A.; CURY, J.A. Qualidade da água para consumo humano e concentração de fluoreto. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 5, p. 964-973, 2011.

GONZÁLEZ-CABEZAS, C. The chemistry of caries: remineralization and demineralization events with direct clinical relevance. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 3, p. 469-478, 2010.

GREENSTEIN, G. Chlorhexidine. An Adjunct to periodontol teraphy. **J. Periodontol.**, v. 57, n. 6, p.370-377, June 1986.

HABIBIAN, M.; ROBERTS, G.; LAWSON, M.; STEVENSON, R.; HARRIS, S. Dietary habits and dental health over the first 18 months of life. **Community Dent. Oral. Epidemiol.**, v. 29, n. 4, p. 239-246, 2001.

HAYACIBARA, M.F et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1, p. 110-115, 2005.

HORNER, C; MAWER, D; WILCOX, M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter?. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, p. dks284, 2012.

JAMES, P; PARNELL, C.; WHELTON, H. The caries-preventive effect of chlorhexidine varnish in children and adolescents: a systematic review.**Caries research**, v. 44, n. 4, p. 333-340, 2010.

JEEVARATHAN, J. et al. Effect of fluoride varnish on Streptococcus mutans counts in plaque of caries-free children using Dentocult SM strip mutans test: a randomized controlled triple blind study. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 25, n. 4, p. 157, 2007.

Koo H: Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. **Adv Dent Res** 2008;20:17– 21

Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, Vladimir-Knezevic S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm** 55: 423-430, 2005.

LIBÉRIO, S A. et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. **Journal of ethnopharmacology**, v. 125, n. 1, p. 1-9, 2009.

LOBO, P. L. D.; CARVALHO, C. B. M.; FONSECA, S. G. C.; MONTEIRO, A. J.; SA-LEITAO, R. C.; FONTELES, M. C.; FONTELES, C. S. R. Sodium fluoride and chlorhexidine effect in the inhibition of mutans streptococci in children with dental caries: a randomized, double-blind clinical trial. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, n. 6, p. 486-491, 2008.

LOBO, P. L. D; FONTELES, C.S.R.;FECHINE, F.V.; FONSECA, S.G.C;CARVALHO, C.B.M; MORAES,M.E.A. Dose–response evaluation of a novel essential oil against Mutans streptococci in vivo. **Phytomedicine**, v. 18, n. 7, p. 551-556, 2011

LOBO, P.L.D et al. The efficacy of three formulations of Lippia sidoides Cham. essential oil in the reduction of salivary Streptococcus mutans in children with caries: a randomized, double-blind, controlled study.**Phytomedicine**, v. 21, n. 8, p. 1043-1047, 2014.

LONGHINI, R; RAKSA, S.M; OLIVEIRA, A.C.P; SVIDZINSKI, T.I.E; FRANCO S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev Bras Farmacogn** 17: 388-395, 2007

LOSSO, E.M et al. Cárie precoce e severa na infância: uma abordagem integral. **J Pediatr**, v. 85, n. 4, p. 295-300, 2009.

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

MALTZ, M.; RIBEIRO, L. G. M.; HASHIZUME, N. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. **J. Dent.**, v. 35, n. 5, p. 359-370, 2007.

NOGUEIRA, M. A. et al. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 93-97, 2007.

OPHORI, E. A.; ERIAGBONYE, B. N.; UGBODAGA, P. Antimicrobial activity of propolis against *Streptococcus mutans*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4966-4969, 2010.

SEGUÉN HERNÁNDEZ, J et al. Epidemiología de la caries en adolescentes de un consultorio odontológico venezolano. **Medisan**, v. 14, n. 1, p. 0-0, 2010.

SIMÓN-SORO, A; MIRA, AI. Solving the etiology of dental caries. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 2, p. 76-82, 2015.

SINGH, K.A; SPENCER, A.J; BRENNAN, D.S. Effects of water fluoride exposure at crown completion and maturation on caries of permanent first molars. **Caries Res** 2007;41:34– 42.

SLADE, G.D. et al. Effect of health promotion and fluoride varnish on dental caries among Australian Aboriginal children: results from a community-randomized controlled trial. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 39, n. 1, p. 29-43, 2011.

SLOT, D. E. et al. The effect of chlorhexidine varnish on root caries: a systematic review. **Caries research**, v. 45, n. 2, p. 162-173, 2011.

TANIKAWA-VERGILIO, K.L et al. Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de cinco tipos diferentes de vernizes de flúor e clorexidina. **ConScientiae Saúde**, v. 7, n. 1, p. 55-60, 2008.

TENUTA, L.M.A; CURY, J.A. Fluoride: its role in dentistry. **Brazilian oral research**, v. 24, p. 9-17, 2010.

TWETMAN, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. **Caries Res**; 38:223–229, 2004.

VOLLMER, W.M. et al. Design of the Prevention of Adult Caries Study (PACS): a randomized clinical trial assessing the effect of a chlorhexidine dental coating for the prevention of adult caries. **BMC oral health**, v. 10, n. 1, p. 23, 2010.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I; SOSNOWSKI, Z.A. Comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine** 7: 1-6, 2000.

WEYANT, R.J. et al. Topical fluoride for caries prevention. **The Journal of the American Dental Association**, v. 144, n. 11, p. 1279-1291, 2013.

WYATT, C.C; MAUPOME, G.; HUJOEL, P.P; MACENTEE, M.I; PERSSON, G.R; PERSSON, R.E; KIYAK, H.A. Chlorhexidine and preservation of sound tooth structure in older adults. A placebo-controlled trial. **Caries Res** 41:93-101, 2007.

ZAFAR, S; HARNEKAR, S.Y; SIDDIQI, A. Early childhood caries: etiology, clinical considerations, consequences and management. **Int Dent SA**, v. 11, p. 24-36, 2009.

ZHANG, Q; VAN'T HOF, M.A; TRUIN, G.J; BRONKHORST, E.M; VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W.H. Caries inhibiting effect of chlorhexidine varnish in pits and fissures. **J Dent Res**;85:469– 474, 2006.

APÊNDICE A
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DO USO DE VERNIZES CONTENDO PRODUTOS DE PLANTAS NATURAIS PARA PREVENÇÃO DE CÁRIE EM CRIANÇAS”

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

a) O objetivo da pesquisa é testar o uso tópico (aplicado aos dentes), na forma de verniz, de um medicamento no tratamento da cárie

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

c) A participação neste estudo consistirá de:

- Exame dentário de seu filho ou filha,
- Utilização de um medicamento sobre os dentes de seu filho ou filha (aplicação tópica) de um “remédio”, por 3 vezes: inicialmente, após 3 meses e após 6 meses, com frequência de 1 (uma) vez ao dia.
- Coleta de saliva de seu filho ou filha por 4 vezes: inicialmente, após três meses, após 6 meses e após 1 ano. Para que seja feita a coleta seu filho ou filha terá que mastigar um pequeno pedaço de “chiclete” por um minuto, e a mesma se encontrará ligada a um pedaço de fio dental para evitar que o seu filho ou filha venha a engolir material. Depois de decorrido o tempo o mesmo será

retirado da boca e colocado em um pequeno frasco.

d) A aplicação do “remédio”, a coleta de saliva e o exame dentário NÃO causarão DOR ao seu filho ou filha.

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

g) Essa pesquisa oferece o raro risco de seu filho(a) ter alergia ao medicamento (remédio). Para diminuir as chances de alergias solicitamos informações sobre a saúde dele ou dela, estando preparados para suspender o tratamento, e usar remédios para alergia caso isso ocorra. Qualquer falta de informação de sua parte (responsável pela criança) a respeito das condições de saúde do seu filho (a) exclui totalmente a responsabilidade da equipe de pesquisa.

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

i) A participação neste estudo lhe dá o direito de seu filho ou filha ser acompanhado (a) por um aluno estagiário para prevenção de novas cáries.

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

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

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

m) Caso venham a surgir dúvidas ou perguntas, sinta-se livre para contactar a Dra. Patrícia Lobo (responsável pelo projeto) no telefone (85)

99845353.

Ao assinar este termo, você estará declarando que por meio de livre e espontânea vontade sua e de seu filho ou filha, ele(a) estará participando como voluntário do projeto de pesquisa citado acima, de responsabilidade da Dra Patrícia Leal Dantas Lobo do Curso de Odontologia, da Universidade Federal do Ceará. Comitê de Ética em Pesquisa (COMEPE/UFC- TELEFONE (85) 33668344,

Fortaleza, ____ de _____ de 20 ____.

Nome da criança _____ Data de Nascimento _____

_____ RG: _____

Assinatura do pai ou responsável

Assinatura da Testemunha1

Assinatura da Testemunha 2

Assinatura do responsável pelo projeto

APÊNDICE B
FICHA DE ANAMNESE
DADOS PESSOAIS E EXAME DENTÁRIO

NOME: _____

IDADE _____

DATA DE NASCIMENTO _____

NOME DO PAI _____

NOME DA MÃE _____

RESPONSÁVEL LEGAL _____

ENDEREÇO _____

TELEFONE PARA CONTATO _____

NOME DA ESCOLA _____

ENDEREÇO DA ESCOLA _____

ESTADO DE SAÚDE GERAL DA CRIANÇA
FAVOR LER E RESPONDER COM ATENÇÃO.

1) O seu filho ou filha se encontra sob tratamento médico? SIM NÃO

Especifique. Caso a sua resposta tenha sido
SIM. _____

2) O seu filho ou filha tem alguma doença crônica? SIM NÃO

Especifique. Caso a sua resposta tenha sido SIM.

- 3) O seu filho ou filha está tomando algum medicamento (remédio)? SIM
NÃO

Especifique. Caso a sua resposta tenha sido SIM.

- 4) O seu filho ou filha tem algum tipo de doença alérgica? SIM NÃO

Especifique. Caso a sua resposta tenha sido SIM.

- 5) O seu filho ou filha já apresentou alergia a algum tipo de medicamento? SIM
NÃO

Identifique o(s) medicamento(s). Caso sua resposta tenha sido SIM.

- 5) O seu filho ou filha já esteve hospitalizado (a)? SIM NÃO

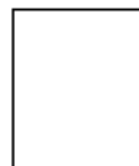
Especifique o motivo. Caso a sua resposta tenha sido SIM.

Afirmo que as informações acima são verdadeiras.

Data _____

Assinatura _____

RG: _____



Testemunha1:

Testemunha2: _____

Pesquisador: _____

EXAME DENTÁRIO

NOME DA CRIANÇA _____

IDADE _____ DATA DE NASCIMENTO _____

DATA _____

EXAME EXTRA-ORAL

LINFADENOPATIA: PRESENTE AUSENTE

ASSIMETRIA FACIAL POR INFECÇÃO: PRESENTE AUSENTE

EXAME INTRA – ORAL

TECIDOS MOLES: NORMAIS PATOLÓGICOS

EXAME INTRA-ORAL

55	54	53	52	51	61	62	63	64	65
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
85	84	83	82	81	71	72	73	74	75

- Cor vermelha - corresponde a superfícies cariadas.
- Cor azul - - corresponde a superfícies restauradas.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DO USO DE VERNIZES CONTENDO PRODUTOS DE PLANTAS NATURAIS PARA PREVENÇÃO DE CÁRIE EM

Pesquisador: Patrícia Leal Dantas Lobo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06987312.3.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 195.096

Data da Relatoria: 28/11/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto em questão é um trabalho vinculado ao PIBIC/UFC e será realizado nas dependências da UFC/Campus Fortaleza com a participação de professores dos Cursos de Odontologia do Campus de Sobral e Fortaleza.

Neste trabalho, serão aplicados vários agentes antimicrobianos formulados como vernizes de aplicação tópica nos dentes de crianças na idade de 36 a 71 meses. Os agentes aplicados serão: verniz de fluor a 5%, verniz de clorexidina a 1%, verniz com extrato alcoólico de própolis a 15%, verniz de timol a 10% e carvacol a 10%, verniz com extrato alcóólico de copaíba e verniz com extrato glico-alcóólico de calêndula. A concentração dos vernizes de copaíba e calêndula será determinada em estudo antes do início dos testes entre os vernizes, através da análise da tolerabilidade e curva dose-resposta das concentrações de 1%, 5%, 10% e 20%.

Na fase de estudo clínico, os vernizes serão aplicados no início, após 3 e 6 meses e serão realizadas análises microbiológicas da saliva destes pacientes, de forma a verificar alterações na contagem de *S.mutans*. Serão feitos exames clínicos para determinar a ocorrência de cárie dentária nestas crianças.

Objetivo da Pesquisa:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-270
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **Fax:** (85)3223-2903 **E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ PROPESQ



Objetivo Primário:

Avaliar clinicamente e microbiologicamente a eficácia de diferentes vernizes contendo produtos de plantas naturais em crianças de 36 a 71 meses na prevenção da cárie dentária, comparados a vernizes a base de Fluor e Clorexidina.

Objetivo Secundário:

Avaliar o aparecimento de lesões de carie em segundos molares deciduos em crianças recebendo quatro vernizes a base de plantas naturais (Baccharis dracunculifolia, Timol e Carvacrol, Copaifera multijuga, e Calendula officinalis) e dois vernizes disponíveis comercialmente: verniz de fluor a 5% (Fluorniz®) e clorexidina a 1% (Cervitec®); Avaliar a ação antimicrobiana dos diferentes vernizes através da contagem do número de unidades formadoras de colônias de Streptococcus mutans antes e após os tratamentos propostos, na saliva de pré-escolares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os autores, os riscos referem-se ao gosto desagradável dos produtos e os benefícios, a redução do número de Streptococcus mutans e consequente prevenção da carie.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem delineada, com metodologia e análise estatística adequada.

Acredito ser necessário incluir na revisão da literatura artigos que atestem a segurança no uso dos produtos cujas concentrações ainda serão determinadas, como a copaíba e calêndula, para assegurar que mesmo em concentrações altas (10%) o único risco é o gosto desagradável.

É importante também incluir um item de que na ocorrência de cáries, os pais dos pacientes serão informados e as crianças, encaminhadas para tratamento, nem que seja no Sistema Único de Saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos termos foram satisfatoriamente.

Recomendações:

Recomenda-se a atualização do cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 Fax: (85)3223-2903 E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 07 de Fevereiro de 2013

Assinador por:

FERNANDO ANTONIO FROTA

BEZERRA (Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA



Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903


E-mail: comepe@ufc.br

ANEXO B – DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE

< Uso exclusivo do INPI >


INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 PROTOCOLO GERAL
 17/08/2016 013160000172
 14:15 DECE

 BR 10 2016 019014 2

Espaço reservado para o protocolo
Espaço reservado para a etiqueta
Espaço reservado para o código QR


INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 Sistema de Gestão da Qualidade
 Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

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 DO CEARÁ
 - 1.2 Qualificação: INSTITUIÇÃO DE ENSINO SUPERIOR
 - 1.3 CNPJ/CPF: 07272636000131
 - 1.4 Endereço Completo: AV. DA UNIVERSIDADE, 2853 BENFICA
 - 1.5 CEP: 60020-180
 - 1.6 Telefone: 85-33669434
 - 1.7 Fax:
 - 1.8 E-mail: javam@ufc.br

continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**
 "DESENVOLVIMENTO DE VERNIZ DENTÁRIO DE PROPOLIS VERMELHA PARA CONTROLE DE CÁRIE DENTÁRIA"

continua em folha anexa

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

5. **Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

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

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data do depósito

continua em folha anexa



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	2/3
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código:	FQ001
				Procedimento:	2
				DIRPA-PQ006	

6. **Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: PATRÍCIA LEAL DANTAS LOBO

6.2 Qualificação: DOUTORA

6.3 CPF: 76864316300

6.4 Endereço Completo: RUA NUNES VALENTE, 1560 ALDEOTA FORTALEZA-CE

6.5 CEP: 60125070

6.6 Telefone: 85999845353 6.7 FAX:

6.8 E-mail: patriciadantas2@gmail.com

continua em folha anexa

7. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial.**

Artigo 12 da LPI – período de graça.
Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. **Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:**

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.

9. **Procurador (74):**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF: 9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone: 9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. **Listagem de sequências biológicas.**

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.


INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:			Código:	Versão:
Depósito de Pedido de Patente			Procedimento:		
			DIRPA-PQ006		

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	04
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	01
<input type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n.º, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	
<input type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	01
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: _____ n.º de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de seqüências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de seqüências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) CONTINUAÇÃO DA FOLHA DE INVENTORES	03

12. Total de folhas anexadas: 10 **fls.**
13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

FORTALEZA, 05 DE AGOSTO DE 2016

Local e Data

Assinatura e Carimbo

 Prof. Dr. Custódio Luís Silva de Almeida
Vice-Reitor no exercício da Reitoria