



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102020003558-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102020003558-4

(22) Data do Depósito: 20/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 31/08/2021

(51) Classificação Internacional: A61K 6/884; A61K 6/40; A61K 6/50.

(52) Classificação CPC: A61K 6/884; A61K 6/40; A61K 6/50.

(54) Título: ADESIVO DENTAL FOTOPOLIMERIZÁVEL À BASE DE METACRILATOS COM PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS, QUERCETINA E RESVERATROL

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 24464109000148. Endereço: AV. LOURIVAL MELO MOTA, S/N, TABULEIRO DO MARTINS, MACEIÓ, AL, BRASIL(BR), 57072-970, Brasileira

(72) Inventor: ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO; TICIANO GOMES DO NASCIMENTO; WANDERSON DA SILVA DOS SANTOS; ADLA FERNANDA LISBOA MOURA; CYNTHIA CAVALCANTE CORREIA; KAROL ELEN DE OMENA PINTO; JOSÉ MARCOS DOS SANTOS OLIVEIRA; TERESA DE LISIEUX GUEDES FERREIRA LÔBO; JENIFFER MCLAIN DUARTE DE FREITAS; JOSEALDO TONHOLO; JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 20/02/2020, observadas as condições legais

Expedida em: 14/01/2025

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**Adesivo dental fotopolimerizável à base de metacrilatos com própolis vermelha de Alagoas, quercetina e resveratrol**”

[001] A presente invenção compreende um dispositivo de adesivo dentinário experimental de fabricação laboratorial, cuja composição é a mistura dos monômeros hidroxietilmetacrilato (HEMA) e 2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi)fenil]-propano (BisGMA) 40/60 (m/m), etanol, canforoquinona (0.5%) e etil 4-(dimetilamino) benzoato (0.5%), quercetina, resveratrol e PVA nas concentrações de 10µg/mL, 20µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL e 1000µg/mL.

[002] Dentre os efeitos técnicos da presente invenção, destacam-se a atividade antioxidante, que indica seu uso como inibidor de metaloproteinases da matriz (MMPs), contribuindo com a longevidade das restaurações adesivas.

[003] O produto possui, também, atividade antimicrobiana, impedindo assim que bactérias proliferem e iniciem o processo cariogênico nas margens da restauração.

[004] - Em uma realização preferencial, o adesivo produzido é do tipo convencional de dois passos, ativado com luz no comprimento de onda de 450 nm $\pm$ 20.

[005] - Os objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos a seguir em detalhes suficientes para sua reprodução.

PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER

[006] Os sistemas adesivos atuais, são hidrofílicos e atuam como membranas semipermeáveis que atraem água (Itthagarun & Tay. Self-contamination of deep dentin by dentin fluid. **Am J Dent** 2000; 13:195-200) o que favorece sua degradação.

[007] Como desvantagens presentes nessas tecnologias existentes no mercado, podemos enumerar as seguintes:

[008] A degradação da camada híbrida é a principal causa da limitada durabilidade das restaurações de resina e é resultado da degradação hidrolítica da resina adesiva e da proteólise das fibrilas de colágeno.

[009] A degradação da camada híbrida, por consequência, facilita a passagem de bactérias e substrato, favorecendo o início e desenvolvimento de cáries secundárias.

[010] Falta de um produto contendo própolis e polifenóis isolados que exerçam suas funções (inibição de MMPs, antimicrobiana, etc) na interface dentina/resina.

[011] Falta de um produto que proteja as fibrilas de colágeno expostas.

[012] Falta de um produto que tenha ação antioxidante benéfica para o substrato dental.

[013] Assim, a metodologia embarcada no dispositivo dessa presente invenção é inovadora, porque possui três componentes (quercetina, resveratrol e própolis vermelha de Alagoas) que inibem as enzimas metaloproteinases da matriz e possuem atividade antioxidante e antimicrobiana.

[014] -A utilização de inibidores de MMPs tem sido aceita como uma estratégia efetiva para aumentar a durabilidade da interface adesiva.

[015] -O interesse no estudo da quercetina, resveratrol e própolis vermelha de Alagoas é devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres e por isso, inibir MMPs.

[016] -Quercetina e resveratrol têm demonstrado ser eficazes na inibição da atividade das MMPs, evitando a degradação do colágeno em humanos.

[017] -Própolis vermelha de Alagoas tem ação antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, bactérias responsáveis pelo início e progressão da cárie dentária, respectivamente.

CAMPO DE ATUAÇÃO

[018] A presente invenção se situa no campo da produção de biomateriais odontológicos. Mais especificamente, a presente invenção proporciona um material dentário contendo extratos de produto natural ou dos flavonoides, quercetina e resveratrol, para uso odontológico. Esses compostos possuem alta

capacidade antioxidante, antimicrobiana e outras propriedades que favorecem a longevidade das restaurações em resina composta. O processo da invenção compreende que esses materiais adicionados ao adesivo dentinário, inibem as enzimas metaloproteinases da matriz (MMPs), que degradam o colágeno do dente, bem como, elimina bactérias cariogênicas, que são responsáveis pela instalação e progressão da cárie dentária. Assim nosso adesivo contribui positivamente para o fortalecimento da interface adesiva dentina/resina em restaurações dentárias de resina composta, impedindo ou reduzindo a degradação enzimática e também cáries secundárias, aumentando a durabilidade das restaurações adesivas.

ESTADO DA TÉCNICA

[019] Adesão, em Odontologia, é um conjunto de ações por meio do qual se une materiais restauradores aos substratos dentais. Dois processos fundamentais estão envolvidos na adesão à dentina: a remoção da fase mineral da dentina sem alteração da matriz de colágeno, e o preenchimento dos espaços deixados pelo mineral com monômeros resinosos que polimerizam *in situ* e formam uma camada mista chamada camada híbrida. A camada híbrida ideal seria formada por ligações contínuas e estáveis entre o adesivo resinoso e o substrato dentinário. No entanto essa ligação estável a longo prazo ainda não é alcançada (Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive dentin interface with wet bonding. **J Dent Res** 2003; 82:141–145. Wang Y, Spencer P. Overestimating hybrid layer quality in polished adhesive/dentin interfaces. **J Biomed Mater Res** 2004; 68A:735–746. Wang Y, Spencer P. Physicochemical interactions at the interfaces between self-etch adhesive systems and dentin. **J Dent** 2004; 32:567–579). A degradação da camada híbrida é a principal causa da limitada durabilidade da união dentina/resina (De Munck J et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. **J Dent Res** 2009; 88:1101-1106), e é resultado da degradação hidrolítica da resina adesiva e da proteólise das fibrilas de colágeno (Okuda M et al. Long-term durability of resin dentin

interface: nanoleakage vs. microtensile bond strength. **Oper Dent** 2002; 27:289-296).

[020] Catepsinas cisteína e metaloproteinases da matriz (MMPs) são endopeptidases presentes na dentina como proenzimas inativas (zimogênios) que contribuem para a organização e mineralização da matriz de dentina (Liu CF et al. Cytoprotection by propolis ethanol extract of acute absolute ethanol-induced gastric mucosal lesions. **Am J Chin Med** 2002; 30:245-54. Tersariol IL et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. **J Endod** 2010; 36:475-481). O condicionamento ácido (baixo pH) da superfície dentinária estimula os zimogênios ativando enzimas proteolíticas como as MMPs, que podem degradar o colágeno exposto e incompletamente infiltrado na camada híbrida, prejudicando a longevidade das restaurações adesivas (De Munck J et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. **J Dent Res** 2009; 88:1101-1106. Liu Y, Tjäderhane L et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. **J Dent Res** 2011; 90:953-968. Tejäderhane L et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. **Dent Mater** 2013; 29:116-135).

[021] A utilização de inibidores de metaloproteinases tem sido aceita como uma estratégia efetiva para aumentar a durabilidade da interface adesiva (Louguercio AD et al. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. **Eur J Oral Sci** 2009; 117:587-596) A inibição de enzimas colagenolíticas com digluconato de clorexidina tem sido comprovada em diversos estudos (Gendron R et al. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases-2, -8, and -9 by chlorhexidine. **Clin Diagn Lab Immunol** 1999; 6:437-439. Scaffa PM et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. **J Dent Res** 2012; 91:420-425). A Clorexidina inibe efetivamente MMP-2, MMP-9 e MMP-8 (Gendron R et al. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin Diagn Lab Immunol** 1999; 6:437-439), e também as catepsinas cisteínas (Scaffa PM

et al. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. **J Dent Res** 2012; 91:420–425). Entretanto, a clorexidina pode induzir reação inflamatória Onçağ O et al. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. **Int Endod J** 2003; 36:423-432) e necrose tecidual associada com a resposta inflamatória (Faria G, Celes MR et al. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured I929 fibroblasts. **J Endod** 2007; 33:715-722), por isso, novos inibidores de MMPs mais biocompatíveis devem ser investigados.

[022] O resveratrol e a Quercetina são polifenóis com potente atividade antioxidante, que mostram capacidade inibitória sobre MMPs em outros sítios (Lee & Kim. Resveratrol with antioxidant activity inhibits matrix metalloproteinase via modulation of SIRT1 in human fibrosarcoma cells. **Life Sci** 2011;88:465-472. Pandey et al. Resveratrol inhibits matrix metalloproteinases to attenuate neuronal damage in cerebral ischemia: a molecular docking study exploring possible neuroprotection. **Neural Regen Res** 2015;10:568, 2015. Lee et al. Quercetin suppresses intracellular ROS formation, MMP activation, and cell motility in human fibrosarcoma cells. **J Food Sci** 2013;78:1464-1469) e também proteção das fibrilas de colágeno da dentina (Porto *et al.* Use of polyphenols as a strategy to prevent bond degradation in the dentin–resin interface. **Eur J Oral Sci** 2018;126:146-158).

[023] A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas *Apis mellifera* a partir de brotos de plantas, que apresenta grande diversidade de propriedades farmacêuticas (Tilburt & Kaptchuk. Herbal medicine research and global health: an ethical analysis. **Bull World Health Org** 2008;86:594-599). Os componentes químicos farmacologicamente ativos mais conhecidos são os flavonoides, isoflavonoides, ácidos fenólicos, ácidos cafeico e aromático, responsáveis por sua ação antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, dentre outras (Porto et al. Mechanical and aesthetics compatibility of Brazilian red propolis micellar nanocomposite as a cavity cleaning agent. **BMC Complement Altern Med**

2018;18:219. Dausch et al. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **Evi Based Complement Alternat Med** 2008; 5:435-441. Cavalcante. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. **Braz J Otorhinolaryng** 2010;77:278-284).

[024] Algumas patentes já foram depositadas visando melhorar a condição bucal, evitando a proliferação de bactérias, aumentando a resistência da dentina com aplicações de outros materiais, fortalecimento de resinas e materiais dentários, elevando nível do grau de conversão da dentina com outros tipos de materiais. Mas não foram encontrados registros de produtos com quercetina, resveratrol e própolis vermelha de Alagoas em adesivo dentinário.

[025] O documento US 20180008553 A1, revela uma nova forma de micro partículas solúveis de flavonoides, e sua síntese. A invenção também inclui novas formulações de tais flavonoides. Além disso, a invenção inclui novos métodos de fabricação das formulações de flavonoides. A invenção também se refere a uma ampla variedade de aplicações das formulações flavonoides

[026] O documento WO 2017/049617 A1, fornece composições orais para o tratamento de várias doenças dentárias comuns, como cárie dentária, gengivite e periodontite. Além disso, a invenção fornece composições que permanecem na cavidade oral por períodos prolongados de tempo, em comparação com as composições aceitáveis por via oral atualmente disponíveis usadas na prevenção ou tratamento de distúrbios e doenças da cavidade oral, incluindo aquelas que envolvem dentes e gengiva. Além disso, a invenção fornece composições que penetram nos dentes através de fendas, túbulos dentinários, cárie e junção cimento-esmalte. São fornecidas outras composições que facilitam ou aprimoram a entrega de cálcio, zinco e outros elementos aos dentes para a prevenção ou tratamento de vários distúrbios e doenças dentárias. Além disso, a invenção fornece métodos de uso e métodos de fabricação, as composições da invenção (bem como kits compreendendo as composições).

[027] O documento US009889098B2, refere-se a novas formas microparticuladas e solúveis de flavonoides e sua síntese. A invenção também

inclui novas formulações de tais flavonoides. Além disso, a invenção inclui novos métodos de fabricação das formulações de flavonoides. A invenção também se refere a uma ampla variedade de aplicações das formulações flavonoides.

[028] O documento US008857058B2, refere-se a um sistema para fazer uma restauração dentária, compreendendo um digitalizador 3D para produzir uma representação digital de modelo 3D de um modelo de restauração dentária, um computador em comunicação com o digitalizador 3D e capaz de criar uma trajetória de fresamento de restauração dentária para um bloco selecionado de determinada dimensão e dado material de restauração dentária, com base no modelo 3D, e um aparelho de trituração a laser em comunicação com o computador e capaz de triturar a laser a restauração dentária a partir do bloco selecionado posicionado no mesmo usando a trajetória de trituração criada pelo computador. O aparelho de trituração a laser inclui um ou mais sensores para monitorar continuamente a trituração a laser do bloco selecionado e fornecer feedback ao computador, de modo que a trajetória de trituração seja continuamente ajustada pelo computador usando o feedback de um ou mais sensores.

[029] Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta, aos olhos dos inventores, possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[030] - A **Figura 1** contempla o percentual médio do grau de conversão dos adesivos odontológicos contendo quercetina, resveratrol e PVA nas concentrações de 10µg/mL, 20µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL e 1000µg/mL.

[031] **Figura 1** - Valores médios do grau de conversão $\pm$ desvio padrão dos adesivos experimentais, controle e branco.

[032] Símbolos diferentes representam diferença estatística significativa entre os adesivos.

[033] **Controle:** Adesivo puro; **Branco:** Adesivo + etanol; **Q:** Adesivo com quercetina; **PV:** Adesivo com própolis vermelha; **R:** Adesivo com resveratrol.

[034] A **Figura 2** contempla o desenho esquemático do preparo das amostras para o teste de resistência ao microcisalhamento.

[035] **Figura 2** - Representação esquemática da metodologia utilizada para a análise da resistência ao cisalhamento da interface adesiva esmalte/resina. **1,2 e 3:** Amostras retangulares da coroa de dentes bovinos foram embutidas em cilindros de PVC com resina acrílica. **4:** Aplicação de ácido e adesivo. **5:** Tubos de Tygon preenchidos com resina composta unidos ao esmalte dental. **6:** Cilindros de resina composta unidos ao esmalte dental. **7:** Dispositivo pronto para o teste de microcisalhamento.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[036] Foram utilizadas quercetina dihidratada $\geq 98\%$ (HPLC) e Trans-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbeno). A própolis vermelha bruta foi coletada no apiário da Ilha do Porto (coordenadas geográficas 9° 44.555' S, 35° 52.080' W e 18.1 m acima do nível do mar), na cidade de Marechal Deodoro, estado de Alagoas, Brasil.

Síntese do adesivo base

[037] Um adesivo experimental de dois passos foi preparado misturando-se os monômeros hidroxietilmetacrilato (HEMA) e 2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi)fenil]-propano (BisGMA) com uma razão de massas de 40:60 (m/m). O etanol foi utilizado como solvente na concentração de 30% (m/m) e o sistema fotoiniciador de três componentes: canforoquinona (0.5%, n/n), etil (4-dimetilamino) benzoato (0.5%, n/n) e difeniliodonium hexafluorofosfato (1.0%, m/m) foi acrescentado. O produto resultante é um líquido de cor amarela, translúcido e baixa viscosidade, que é fotoativado com luz no comprimento de onda de 450 nm $\pm$ 20.

Composição química dos adesivos dentinários (tabela 01):

BisGMA	2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi)fenil]-propano	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$
HEMA	2-hidroxietilmetacrilato	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$
Álcool etílico	Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
Canforoquinona	dl-2,3-diceto-1,7,7-trimetilnorcanfano	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$
EDMAB	Etil 4-(dimetilamino)benzoato	$(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$
DPIHFP	Difeniliodonium hexafluorofosfato	$(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{I}(\text{PF}_6)$
Quercetina	3,3',4',5,7-petahidroxiflavona diihratada	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Resveratrol	3,4',5-trihidroxi- <i>trans</i> -stilbeno	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$
Própolis vermelha de Alagoas	Fração hexânica do extrato etanólico de PVA. Componentes principais: Daidzeina Liquiritigenina Pinobanksina Isoliquiritigenina Formononetina Pinocembrina Biocanina A	 - $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ - $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ - $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$ - $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ - $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ - $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ - $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$

[038] Própolis, quercetina e resveratrol foram incorporadas ao adesivo dentinário, separadamente, na forma de solução etanólica, para se obter adesivos dentinários com quercetina, resveratrol e PVA nas concentrações 10µg/mL, 20µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL e 1000 µg/mL.

Preparo do extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (EEP) e sua fração hexânica.

[039] Inicialmente foi **preparado um extrato etanólico de própolis**. A extração foi feita por maceração com uso de etanol 80%. A própolis bruta (250g) foi manualmente moída e colocada em um balão com 600mL de etanol 80% (etanol:água, v.v.), depois levada a um agitador (Thornton, Modelo T14, Thornton Inpec Eletrônica Ltda., Vinhedo, Brasil) por 48 horas. O macerado (a porção líquida) foi removido com uma pipeta, e a porção sólida (cera) foi descartada. A maceração foi misturada novamente com 600mL de etanol 80% (etanol:água, v.v.) em um balão de vidro e agitada durante 24 horas. A maceração resultante foi misturada mais uma vez com 600mL de etanol 80% (etanol:água, v.v.) e deixada durante 24 horas sem agitação. Em seguida, a maceração foi removida com pipeta, filtrada através de papel de filtro e submetida à destilação sob pressão reduzida em um evaporador rotativo (modelo 801/802; Fisatom, São Paulo, Brasil) em banho-maria a 80-90°C (pressão 650mmHg e velocidade 80rpm) para remover o solvente. O extrato de própolis vermelha foi então colocado num recipiente de vidro e deixado durante aproximadamente 3 dias para evaporar o solvente residual. Foram obtidos 162g de extrato etanólico de própolis vermelha (EEP).

[040] Extrato etanólico de própolis vermelha (10g) foi fracionado por meio de partição líquido-líquido. Para esse efeito, o extrato foi dissolvido em metanol e água na proporção de 8:2 (volume v/v). Adicionou-se 15mL de água e após agitação vigorosa a mistura permaneceu em repouso durante 30 minutos. A fase metanol/água foi utilizada como base para a partição, utilizando 100mL de extrato hexânico. Nesse procedimento, utilizou-se uma agitação suave para evitar a emergência de emulsões e retirou-se a fase hexânica do funil de

separação, resultando na fração hexânica. O volume da fração foi submetido à destilação sob pressão reduzida em um evaporador rotativo, semelhante ao procedimento do extrato etanólico de própolis vermelha, obtendo-se uma massa sólida de fração hexânica após evaporação total de solventes.

[041] Inicialmente preparou-se uma solução mãe (1000µg/mL) de cada produto testado adicionando-se 48mg de quercetina ou 50mg da fração hexânica do extrato etanólico de PVA ou 50mg de resveratrol a 5mL de etanol, que foram completamente solubilizadas em ultrassom (UltraCleaner 700, Unique) durante 1 minuto.

[042] A partir da solução mãe foram preparadas mais cinco soluções de cada produto a ser adicionado ao adesivo: solução 1 (500µg/mL), solução 2 (250µg/mL), a solução 3 (100 µg/mL), a solução 4 (20µg/mL), solução 5 (10 µg/mL) de etanol com resveratrol, quercetina e PVA.

[043] Para formulação dos adesivos contendo 1000µg/ml de quercetina, resveratrol ou PVA, uma alíquota de 24µL da solução mãe (1000µg/mL) de cada produto foi acrescentada a 230mg de adesivo.

[044] Para formulação dos adesivos contendo 500µg/ml de quercetina, resveratrol ou PVA, 500µL da solução mãe foi adicionada a 500µL de etanol, obtendo-se a Solução 1. Uma alíquota de 24µL da solução 1 (500µg/mL), de cada produto, foi acrescentada a 230mg de adesivo.

[045] Para fazer os adesivos contendo 250µg/ml de quercetina, resveratrol ou PVA, 250µL da solução mãe foi adicionada a 750µL de etanol, obtendo-se a solução 2 (250µg/ml). A seguir, uma alíquota de 24µL da solução 2 foi adicionada a 230mg de adesivo.

[046] Para fazer os adesivos contendo 100 µg/mL de quercetina, resveratrol ou PVA, 100µL da solução mãe foi adicionada a 900µL de etanol, obtendo-se a solução 3 (100µg/ml). A seguir, uma alíquota de 24µL da solução 3 foi adicionada a 230mg de adesivo.

[047] Para obtenção dos adesivos com 20µg/ml de quercetina, resveratrol ou PVA, tomou-se 80µL da solução 2 e adicionou-se a 920µL de etanol, obtendo-se a solução 4. Dessa última solução foram retirados 24µL e adicionados a 230 mg de adesivo.

[048] Para obtenção dos adesivos com 10 µg/mL de quercetina, resveratrol ou PVA, tomou-se 40µL da solução 3 e adicionou-se a 960µL de etanol, obtendo-se a solução 5. Dessa última solução foram retirados 24µL e adicionados a 230 mg de adesivo.

[049] Os adesivos foram mantidos em frascos âmbar, em local refrigerado, até a análise em FTIR.

Análise do grau de conversão

[050] Para análise do grau de conversão foram obtidos espectros FTIR. Amostras dos adesivos polimerizados foram preparadas depositando-se 25µL de cada adesivo modificado sobre uma película de poliéster e depois de 30 segundos o adesivo foi irradiado por 20 segundos com uma fonte de luz LED (1500mW/cm²). Foram obtidos espectros FTIR (IRAFFINITY-1 SERIAL N° A213749, SHIMADZU) de amostras polimerizadas e não polimerizadas (n=5) dos adesivos com quercetina, resveratrol e PVA nas concentrações 10µg/mL, 20µg/mL, 100µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL, adesivo puro e o branco (Adesivo + 25µL etanol). Os espectros foram obtidos na região entre 4000 a 700 cm⁻¹, com 128 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹ no modo refletância total atenuada (ATR). Para análise dos espectros dos adesivos, foi considerado o intervalo de 1555 a 1660 cm⁻¹, para observações da absorbância em 1608 e 1638 cm⁻¹ que sinalizam, respectivamente, as ligações vinílicas aromáticas e alifáticas do grupamento funcional metacrilato. A técnica consistiu em coletar a radiação refletida a partir da interface entre a solução e o cristal (ATR), mostrando a redução das ligações duplas de carbono (C=C) na faixa de intensidade de 1638 cm⁻¹ característica do grau de conversão das resinas a base de metacrilato. O valor do grau de conversão (GC) foi obtido aplicando-se equação:

[051] *Grau de conversão (%) = 100[1 - R(polimerizada)/R(não polimerizada)]*.

[052] Onde, para as resinas de metacrilato, R é a razão entre a altura do pico da dupla ligação carbono-carbono alifático (C=C) 1640 cm^{-1} , e a altura do pico da dupla ligação (C=C) do grupo benzeno aromático a 1610 cm^{-1} , cuja intensidade não se modifica durante a polimerização.

Teste de resistência ao microcisalramento

[053] Para testar a resistência ao microcisalramento da união do adesivo ao esmalte dentário foram utilizados incisivos bovinos hígidos. Os dentes foram limpos com uma pasta de pedra pomes e água aplicada com taça de borracha em baixa rotação e armazenados em água destilada, 4°C . As raízes foram separadas da coroa por um corte transversal na região amelocementária. E depois obteve-se um retângulo da face vestibular, cortando-se na região incisal e laterais com disco de carborundum (American Burrs, Palhoça, Santa Catarina, BR) instalada em peça reta (Kavo Dental, Joinville, BR). O esmalte vestibular foi planificado em lixa de carbetto de silício (600Grit) e as amostras foram embutidas em resina acrílica autopolimerizável (Clássico, São Paulo, Brasil) de modo que a região vestibular ficasse exposta. Novamente a superfície foi lixada para remover quaisquer resíduos de resina utilizando-se lixas de granulação 400 e 600 (3M ESPE, Minnessota, EUA) por 60 segundos. Após a planificação do esmalte vestibular, todas as amostras foram examinadas em microscópio estereoscópico com aumento de 40X para certificação de que não havia dentina exposta na superfície adesiva.

[054] O esmalte da região vestibular das amostras foi condicionado com ácido fosfórico 37% (Condac 37%, Joinville, Brasil), por 15s, lavados com água por 15s e secos com jato de ar para receber duas camadas do adesivo experimental. Cada camada de adesivo foi aplicada no esmalte sob agitação por 15s, seguida de um leve jato de ar aplicado para remoção do solvente residual e a seguir fotoativado por 20 segundos (LED Emitter B; Schuster Com. Equip. Odontológicos Ltda, RS, Brasil - 1150 mW cm^2). Essa é a técnica padrão recomendada para aplicação desse tipo de adesivo em odontologia. A seguir quatro microcilindros (3mm de altura x 0,9 mm de diâmetro) de resina composta

(Vittra APS, cor A1, FGM Ind, Joinville, BR) foram unidos ao esmalte de cada amostra e fotoativados por 20 segundos. Para confecção dos cilindros de resina composta utilizou-se uma matriz tubular de silicone com 0,9 mm de diâmetro interno, que foi removida com dois cortes paralelos ao longo eixo feitos com lâmina de bisturi n.11.

[055] Depois de 24h em água destilada a 37 °C, cada amostra foi colocada em um dispositivo de microcisalhamento adaptado a uma máquina de testes (Microtensile OM 100, ODEME, Santa Catarina, BR) por meio de um fio ortodôntico (Morelli Ortodontia, Sorocaba, Brasil), raio de 0,1 mm) posicionado exatamente na interface esmalte/resina. A Figura 2 mostra uma sequência do preparo das amostras e teste de resistência adesiva. O carregamento cisalhante foi aplicado a uma velocidade de 1 mm/min até a fratura do cilindro de resina. Os valores dados em kgf foram convertidos para MPa.

Análise da atividade antioxidante

[056] A atividade antioxidante (AA) da quercetina, resveratrol e PVA foi determinada pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH). Preparou-se uma solução de DPPH^{*} (0,1 mM) em etanol e soluções estoques de extrato bruto e fração acetato de etila de PVA, quercetina, resveratrol e trolox (controle positivo), na concentração 500 µg/mL, em etanol. As soluções de reação foram compostas de 2 mL de DPPH^{*} a 0,1 mM, uma alíquota das soluções de PVA, quercetina e resveratrol nas diferentes concentrações a serem analisadas e etanol q.s.p. 5 mL. As soluções foram preparadas em triplicata e mantidas em temperatura ambiente sob o abrigo de luz durante 30 minutos. A seguir, as soluções foram depositadas, uma por vez, em uma cubeta de cristal de quartzo e inseridas no espectrofotômetro UV-Vis da marca SHIMADZU 1240, no modo fotometria, em um comprimento de onda de 518nm. Etanol puro foi usado como branco e o controle negativo foi DPPH^{*} 0,1 mM (em etanol q.s.p. 5 mL). A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação: $(A_{controle} - A_{amostra}) / A_{controle}$

)x100. Em que: *Acontrole(-)* = absorvância da solução de DPPH sem a amostra; *Aamostra* = absorvância da amostra com o DPPH.

Atividade antimicrobiana

[057] Foram testadas cepas de *Candida albicans* ATCC 36801, *Candida albicans* ATCC 36802, *Streptococcus mutans* CCT 3440 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. O teste para estabelecer a concentração inibitória mínima foi realizado pelo método de microdiluição seriada, para bactérias de acordo com o CLSI (CLSI, 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. M100–S20–U. CLSI, Wayne, PA, 2010) e LIMA et al. (Lima et al. Halistanol Sulfate A and Rodriguesines A and B are Antimicrobial and Antibiofilm Agents Against the Cariogenic Bacterium *Streptococcus mutans*. **Braz J Pharmacog** 2014;24:651-659) e para leveduras seguiu-se EUCAST (EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT EDef 7.2 Revision. Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. *Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID*) com algumas modificações. Realizou-se o acerto da concentração de células pela Escala McFarland 0,5. Inóculos padronizados contendo cerca de 10^6 bactérias/mL ou 10^5 leveduras/mL de uma cultura pura *overnight* foram utilizados nos testes. O extrato de própolis foi serialmente diluído (15, 62 a 1000 µg/mL) em 80 µL de caldo BHI ou caldo YPD, em microplacas de poliestireno com 96 poços. Diluições seriadas do veículo (placebo) também foram testadas. Adicionalmente, clorexidina 0,12% e triclosan 0,2% foram usados como controles positivos. Alíquotas de 20 µL dos inóculos padronizados foram inseridos nos poços, exceto nos controles negativos (meio de cultura + extrato ou veículo controle). As microplacas foram submetidas à leitura de densidade óptica em leitor de Elisa a 500-600 nm antes e após a incubação em aerofilia à 37 °C por 24 h. *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus* foram incubados em microaerofilia, à 37 °C por 24 h. Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), calculou-se a

diferença entre as densidades ópticas antes e após a incubação das microplacas. A CIM foi definida como a menor faixa de concentração do extrato necessária para inibir 100% do crescimento microbiano, em relação ao controle positivo (meio de cultura + micro-organismo). Os testes foram realizados em quadruplicata, em três experimentos independentes.

RESULTADOS OBTIDOS

Grau de conversão

[058] Os dados foram submetidos ao teste F ANOVA seguido do teste de Tukey para comparações pareadas ($\alpha=0.05$). O grau de conversão dos adesivos experimentais, controle e branco (adesivo + etanol) estão apresentados na Figura 1. Os valores do grau de conversão dos adesivos estão de acordo com os padrões estabelecidos para essa categoria de material, que deve estar acima de 55% (Alshali RZ et al. Degree of conversion of bulk-fill compared to conventional resin-composites at two time intervals. **Dental Materials** 2013).

[059] Os adesivos com propolis não apresentaram diferença significativa nos valores de GC quando comparados ao grupo controle ($P>0,05$). Dentre os adesivos com quercetina, aquele com concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentou redução significativa ($p=0,015$) no valor do grau de conversão (57,80%), quando comparado ao grupo controle (77,26%). Em todos os outros adesivos com quercetina testados o grau de conversão foi semelhante ao controle ($p>0,05$). Esses resultados são corroborados pelo estudo de Yang et al. (YANG, H et al. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive–dentin interfaces. **Scientific Reports**, 2017), embora aqueles autores tenham testado apenas as concentrações de 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. A literatura não registra estudos com esses adesivos com quercetina nas concentrações 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$.

[060] O grau de conversão dos adesivos com resveratrol variou de 61,74% (1000 $\mu\text{g/mL}$) a 75,86% (20 $\mu\text{g/mL}$). Comparado ao grupo controle (77,26%), apenas o adesivo com 1000 $\mu\text{g/mL}$ de resveratrol apresentou redução significativa no grau de conversão ($p=0.001$).

[061] Ainda não existem estudos publicados sobre o grau de conversão de adesivos com resveratrol, e por esse motivo não foi possível comparar os resultados dessa pesquisa com a literatura. Mas, considerando-se como valores de referência o grupo controle, é possível dizer que a incorporação de resveratrol em um sistema adesivo, nas concentrações utilizadas, é possível e promissora, uma vez que se manteve dentro dos padrões aceitáveis (Alshali RZ et al. Degree of conversion of bulk-fill compared to conventional resin-composites at two time intervals. **Dental Materials** 2013).

[062] O adesivo produzido nesse experimento tem a mesma base monomérica do adesivo comercial 3M-Single Bond 2 (3M, Saint Paul, MN, USA) e apresentou valor médio de GC semelhante (77,26%) àqueles registrados nos estudos de Almeida et al. (Almeida, GS et al. ZnCl₂ Incorporated into Experimental Adhesives: Selected Physicochemical Properties and Resin-Dentin Bonding Stability. **Biomed Research International**, 2017) e Brianezzi et al. (Brianezzi, LFF et al. Does laser diode irradiation improve the degree of conversion of simplified dentin bonding systems? **Journal Of Applied Oral Science**, 2017), que obtiveram, respectivamente, os valores de 73,50% e 73,00%.

Resistência ao microcisoramento

[063] Os dados foram submetidos ao teste F ANOVA seguido do teste de Tukey para comparações pareadas ($\alpha=0.05$). Os resultados da resistência adesiva estão apresentados na Tabela 1.

[064] Tabela 2 – Médias $\pm$ desvio padrão da resistência ao microcisoramento da interface resina/esmalte (Mpa).

Concentrações	Resistência ao microcisoramento (MPa)				
	Quercetina	Resveratrol	Própolis	Controle	Branco
		I			

10 µg/mL	4,08 ± A 1,07	15,11 ± E 7,16	13,62 ± 4,09 ^{DE}	14,20 ± 5,23 ^E	11,08 ± 4,63 ^{CDE}
20 µg/mL	5,22 ± AB 1,96	14,83 ± E 5,94	14,27 ± 5,44 ^E		
100 µg/mL	7,52 ± ABCD 2,73	12,67 ± CDE 3,85	9,10 ± 2,66 ^{ABCDE}		
250 µg/mL	6,42 ± ABC 2,66	15,43 ± E 5,71	10,94 ± 1,97 ^{BCDE}		
500 µg/mL	10,49 ± ABCDE 4,10	10,56 ± ABCDE 3,03	11,95 ± 3,85 ^{CDE}		
1000 µg/mL	11,97 ± CDE 3,07	11,88 ± CDE 4,55	12,28 ± 4,12 ^{CDE}		

[065] Letras maiúsculas distintas indica diferença significativa entre os adesivos correspondentes através de comparações pareadas de Tukey.

[066] Os valores mais elevados foram registrados para o grupo controle (14,20 MPa). Esse valor está próximo do registrado nos estudos de Elkassas et al (Elkassas DW et al. The effect of cavity disinfectants on the micro-shear bond strength of dentin adhesives, **Eur J Dent** 2014), Sinha et al (Sinha DJ et al. Comparative evaluation of the effect of different disinfecting agents on bond strength of composite resin to dentin using two-step self-etch and etch and rinse bonding systems: An in-vitro study. **J Conserv Dent**, 2018) e Villela-Rosa et al (Villela-Rosa ACM et al. Shear bond strength of self-etch and total-etch bonding systems at different dentin depths. **Braz Oral Res**, 2011) usando o adesivo

comercial Single Bond (3M/ESPE), que variou de 13,01 a 18,76 e que pode ser creditado às nanopartículas de sílica (5nm) incorporadas nesse adesivo (Villela-Rosa ACM et al. Shear bond strength of self-etch and total-etch bonding systems at different dentin depths. **Braz Oral Res**, 2011). Essas partículas de carga desempenham um papel importante na formação do filme de adesivo e contribui para a estabilização da camada híbrida (Miyazaki et al. Influence of filler addition to bonding agents on shear bond strength to bovine dentin. **Dent Mater**, 1995). Assim, podemos considerar os resultados alcançados pelo grupo controle (adesivo experimental) adequado, uma vez que este, tem matriz monomérica semelhante à matriz do adesivo Single Bond.

[067] Nenhum estudo foi encontrado na literatura científica sobre a resistência ao microcissalhamento de adesivos dentinários com adição de quercetina, resveratrol ou própolis, o que inviabiliza comparações com os resultados dessa pesquisa.

[068] Os resultados da AA estão apresentados na Tabela 1 e comprovam a atividade antioxidante da PVA, da quercetina e do resveratrol.

Atividade antioxidante

[069] **Tabela 3** – Percentual da Atividade antioxidante (AA%) da quercetina, resveratrol, Extrato etanólico de PVA e de sua fração hexânica.

Atividade Antioxidante (%)				
Concentração	Quercetina	Resveratrol	Fração Hexânica PVA	Extrato Etanólico PVA
10 µg/mL	96,68	70,51	87,16	81,31
1 µg/mL	73,22	62,53	64,64	63,38
0,05 µg/mL	64,78	61,75	58,73	57,78

[070] PVA – Própolis vermelha de Alagoas

Atividade antimicrobiana

[071] Os resultados da atividade antimicrobiana são apresentados na Tabela 2. Tanto a clorexidina a 0,12% quanto o triclosan a 0,2% inibiram o crescimento de todos os microrganismos na faixa de concentração testada. O solvente sem o extrato de própolis não inibiu os microrganismos. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Streptococcus mutans* CCT 3440, *Candida albicans* ATCC 36801 e *Candida albicans* 36802 foram sensíveis ao EPV (31,25-125 µg/mL) dentro do ranque de concentrações usadas em este estudo. Verificou-se que a CIM do EPV contra *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 foi <15,62 µg / mL, abaixo da menor concentração usada em este estudo (20 µg / mL).

[072] **Tabela 4** - Concentração mínima inibitória (CMI) da própolis vermelha de Alagoas para *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Candida albicans* em diferentes meios de cultura

Microorganismos	BHI (µg/mL)	YPD (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> ATCC 36801	31.25–62.50	125–250
<i>Streptococcus mutans</i> CCT 3440	62.50-125	125-250
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	<15.62	Não testado

[073] Os resultados estão apresentados na **Figura 2**. As médias da resistência à microtração da interface dentina/resina de todos os adesivos experimentais estão dentro de uma faixa de valores próprios para essa categoria de material, e foi mais alta do que a do grupo controle, mantendo-se sem alterações significantes no período avaliado (24h e 6 meses) ($p>0,05$). Considerando-se cada tempo de avaliação, as médias foram correspondentemente mais elevadas nos grupos de adesivos com própolis, variando entre 40,24 MPa e 44,73 MPa.

[074] O modo de fratura predominante foi falha mista, seguida de falha adesiva (falha coesiva no adesivo e / ou na camada híbrida), independentemente tipo de

adesivo utilizado. Mostrando que a ligeira redução da resistência de união ao longo do tempo não ocorreu por alterações na formação da interface adesiva e, mais provavelmente, pela degradação hidrolítica do adesivo, o que é comum em todos os adesivos dentinários comercialmente disponíveis.

REIVINDICAÇÕES

1. Produto, caracterizado por ser um adesivo dentinário contendo quercetina, resveratrol e própolis vermelha de Alagoas, para ser utilizado em restaurações dentárias no tratamento de lesões cariosas e não-cariosas.
2. Produto, conforme reivindicações 1, caracterizado por ser uma composição líquida contendo: hidroxietilmetacrilato (HEMA) e 2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi)fenil]-propano (BisGMA) 40/60 (m/m), etanol, canforoquinona (0.5%), etil (4-dimetilamino)benzoato (0.5%).
3. Produto, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizados por conter adicionalmente quercetina (3,3', 4', 5,7-penta-hidroxi-flavona), resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbeno) e fração hexânica de extrato etanólico de PVA.
4. Produto, conforme reivindicações 1, 2, e 3, caracterizado por apresentar grau de conversão adequado para essa categoria de material odontológico após a adição de PVA e dos polifenóis quercetina e resveratrol.
5. Produto, conforme reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por possuir comprovada atividade antioxidante da PVA e dos polifenóis adicionados.
6. Produto, conforme reivindicações 1, 2 3 e 4 caracterizado por apresentar atividade antimicrobiana contra Streptococcus mutans e Lactobacillus acidophilus.
7. Produto contendo quercetina, resveratrol e PVA, conforme reivindicações 1, 2, 3, e 4, caracterizado por neutralizar o efeito das metaloproteinases presentes na dentina e atuar na preservação do colágeno da dentina.
8. Produto contendo quercetina, resveratrol e PVA, conforme reivindicações 1, 2, 3, e 4, caracterizado por ser capaz de gerar durabilidade da interface adesiva e prolongar a meia vida das restaurações adesivas.

DESENHOS

Figura 1

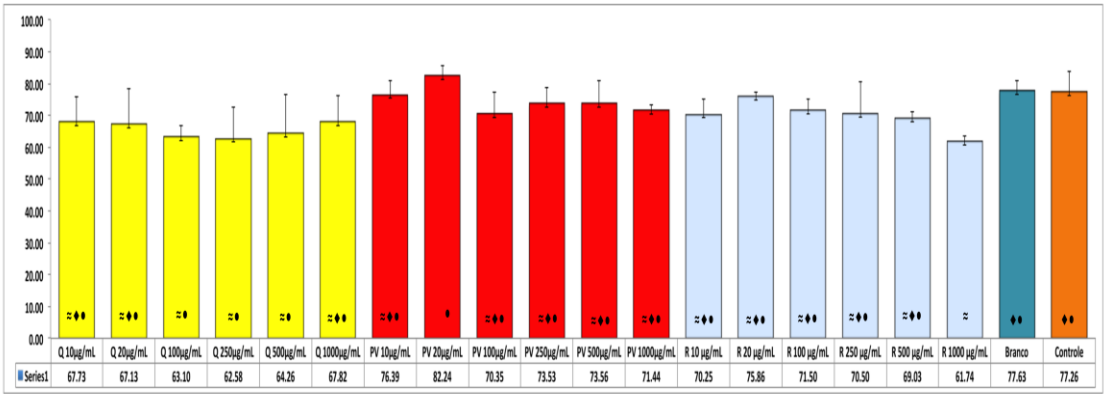


Figura 2

