



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

CARTA PATENTE Nº BR 102020003555-0

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 102020003555-0

**(22) Data do Depósito:** 20/02/2020

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

**(51) Classificação Internacional:** A61K 6/20; A61K 6/40; A61K 6/50.

**(52) Classificação CPC:** A61K 6/20; A61K 6/40; A61K 6/50.

**(54) Título:** ADESIVO DENTINÁRIO FOTOPOLIMERIZÁVEL CONTENDO POLIFENÓIS E PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS

**(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; ARTHUR BEZERRA DE BARROS ROCHA; IVERSON IAGO SOARES FERREIRA; BRUNA MURITIBA DE BARROS; ERYCK CANABARRA ÁVILA; JOSÉ MARCOS DOS SANTOS OLIVEIRA; MATHEUS CORRÊA DA SILVA; MARCOS PAULO SANTANA DE OLIVEIRA; TERESA DE LISIEUX GUEDES FERREIRA LÔBO; JENIFFER MCLAINE 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:** 11/03/2025

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 DENTINÁRIO FOTOPOLIMERIZÁVEL CONTENDO POLIFENÓIS E PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**”

[001] 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).

[002] 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).

[003] 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 cathepsinas cisteína (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.

[004] 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.

[005] O documento US 20180008553 A1, revela uma nova forma de micropartículas 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

[006] 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 cemento-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).

[007] 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.

[008] 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.

[009] 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.

### **PROBLEMA QUE A INVENÇÃO SE PROPOE A RESOLVER**

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

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

[012] 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.

- [013] A degradação da camada híbrida, por consequência, facilita a passagem de bactérias e substrato, favorecendo o início e desenvolvimento de cárries secundárias.
- [014] Falta de um produto contendo própolis e polifenóis isolados que exerçam suas funções (inibição de MMPs, antimicrobiana, etc) na interface dentina/resina.
- [015] Falta de um produto que proteja as fibrilas de colágeno expostas.
- [016] Falta de um produto que tenha ação antioxidante benéfica para o substrato dental.
- [017] 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.
- [018] -A utilização de inibidores de MMPs tem sido aceita como uma estratégia efetiva para aumentar a durabilidade da interface adesiva.
- [019] -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.
- [020] -Quercetina e resveratrol têm demonstrado ser eficazes na inibição da atividade das MMPs, evitando a degradação do colágeno em humanos.
- [021] -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**

- [022] 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 cárries secundárias, aumentando a durabilidade das restaurações adesivas.

## DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[023] A **Figura 1** contempla o gráfico com os valores médios do grau de conversão  $\pm$  desvio padrão dos adesivos experimentais, controle e branco.

[024] **Obs.:** Símbolos diferentes representam diferença estatística significante entre os adesivos.

[025] **Controle:** Adesivo puro; **Branco:** Adesivo + etanol; **PV20:** Adesivo com 20 $\mu$ g/mL de PVA; **PV250:** Adesivo com 250 $\mu$ g/mL de PVA;; **PV500:** Adesivo com 500 $\mu$ g/mL de PVA; **QT20:** Adesivo com 20 $\mu$ g/mL de quercetina; **QT250:** Adesivo com 250 $\mu$ g/mL de quercetina; **QT500:** Adesivo com 500 $\mu$ g/mL de quercetina **R20:** Adesivo com 20 $\mu$ g/mL de resveratrol; **R250:** Adesivo com 250 $\mu$ g/mL de resveratrol; **R500:** Adesivo com 500 $\mu$ g/mL de resveratrol.

[026] A **Figura 2** contempla o gráfico com os valores médios da resistência de união (MPa) dos adesivos experimentais e grupo controle.

[027] **Obs.:** **PV20:** Adesivo com 20 $\mu$ g/mL de PVA; **PV250:** Adesivo com 250 $\mu$ g/mL de PVA;; **PV500:** Adesivo com 500 $\mu$ g/mL de PVA; **Q20:** Adesivo com 20 $\mu$ g/mL de quercetina; **Q250:** Adesivo com 250 $\mu$ g/mL de quercetina; **Q500:** Adesivo com 500 $\mu$ g/mL de quercetina **R20:** Adesivo com 20 $\mu$ g/mL de resveratrol; **R250:** Adesivo com 250 $\mu$ g/mL de resveratrol; **R500:** Adesivo com 500 $\mu$ g/mL de resveratrol; **Controle:** Adesivo puro.

## DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

[028] A presente invenção compreende um dispositivo de adesivo dentinário comercial Single Bond 2 (3M ESPE, St. PAUL, MN, USA), cuja composição é de nanopartículas de sílica, BisGMA (bisphenol A-glycidyl methacrylate), HEMA (2-

Hydroxylethyl methacrylate), EGDMA (Etilenoglicol dimetacrilato), etanol, água, sistema fotoiniciadores e um copolímero funcional de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialcenóico, no qual foi incorporado separadamente, quercetina (3,3', 4', 5,7-penta-hidroxil-flavona), resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbeno) e própolis vermelha de Alagoas (PVA) nas concentrações de 20µg/ml, 250µg/ml e 500µg/ml. Obtendo-se, assim, adesivos dentinários modificados contendo quercetina, resveratrol e PVA nas concentrações 20µg/ml, 250µg/ml e 500µg/ml.

[029] Dentre os efeitos técnicos da presente invenção, destacam-se a obtenção de atividade antioxidante, atuando como inibidor de metaloproteinases de matriz, contribuindo com a longevidade das restaurações adesivas.

[030] O produto proporciona uma melhor adaptação ao selamento marginal da restauração adesiva.

[031] O produto possui também atividade antimicrobiana, impedindo assim que novas bactérias proliferem e deem início ao processo cariogênico.

[032] Os objetos da presente invenção desse produto são:

[033] BisGMA

[034] Hema

[035] EGDMA

[036] Álcool etílico

[037] Água

[038] Canforoquinona

[039] Nanopartículas de sílica

[040] Pelo menos um copolímero funcional de metacrilato

[041] Pelo menos um copolímero de ácido poliacrílico

[042] Pelo menos um copolímero de ácido polialcenóico.

[043] Quercetina

[044] Resveratrol

[045] Fração hexânica de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas

[046] Em uma realização preferencial, o adesivo utilizado é do tipo de dois passos, de marca comercial, Single Bond 2 (3M ESPE, St. PAUL, MN, USA).

[047] Esse adesivo é ativado com luz no comprimento de onda de 450 nm  $\pm$  20.

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

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[049] 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. As substâncias foram incorporadas, separadamente, ao adesivo dentinário Single Bond 2 (3M ESPE, St. PAUL, MN, USA), na forma de solução etanólica, para se obter adesivos dentinários modificados contendo quercetina, resveratrol e PVA nas concentrações 20 $\mu$ g/ml, 250 $\mu$ g/ml e 500 $\mu$ g/ml.

[050] 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).

[051] 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.

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

[053] A partir da solução mãe foram preparadas três soluções de cada produto: a solução 1 (0,5%), a solução 2 (0,25%) e a solução 3 (0,02%) de etanol com resveratrol, quercetina e PVA.

[054] Para **formulação dos adesivos** contendo 500 $\mu$ g/ml de quercetina, resveratrol ou PVA, uma alíquota de 25 $\mu$ L da solução 1 (0,5%), de cada produto, foi acrescentada a 240mg de adesivo. Os adesivos foram mantidos em frascos âmbar, em local refrigerado, até a análise em FTIR.

[055] Para fazer os adesivos contendo 250 $\mu$ g/ml de quercetina, resveratrol ou PVA, 500 $\mu$ L da solução mãe foi adicionada a 500 $\mu$ L de etanol, obtendo-se a concentração 24mg/mL (Solução 2). A seguir, uma alíquota de 25 $\mu$ L dessa nova solução foi adicionada a 240mg de adesivo. Os adesivos foram mantidos em frascos âmbar, em local refrigerado, até a análise em FTIR.

[056] Para obtenção dos adesivos com 20 $\mu$ g/ml de quercetina, resveratrol ou PVA, tomou-se 80 $\mu$ L da solução 2 e adicionou-se a 920 $\mu$ L de etanol, obtendo-se uma solução na concentração de 1,92mg/mL (solução 3). Dessa última

solução foram retirados 25 $\mu$ L e adicionados a 240 mg de adesivo. Os adesivos foram mantidos em frascos âmbar, em local refrigerado, até a análise em FTIR.

[057] **Análise do grau de conversão** - Foram obtidos espectros FTIR. Amostras dos adesivos polimerizados foram preparadas depositando-se 25 $\mu$ L 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/cm<sup>2</sup>). Foram obtidos espectros FTIR (IRAFFINITY-1 SERIAL N° A213749, SHIMADZU) de amostras polimerizadas e não polimerizadas (n=5) dos adesivos com queracetina, resveratrol e PVA nas concentrações 500, 250 e 20 $\mu$ g/mL, adesivo puro e o branco (Single Bond 2 + 25 $\mu$ L etanol), totalizando 110 espectros. Os espectros foram obtidos na região entre 4000 a 700 cm<sup>-1</sup>, com 128 varreduras e resolução de 4 cm<sup>-1</sup> no modo refletância total atenuada (ATR). Para análise dos espectros dos adesivos, foi considerado o intervalo de 1555 a 1660 cm<sup>-1</sup>, para observações da absorbância em 1608 e 1638 cm<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> característica do grau de conversão das resinas a base de metacrilato. O valor do grau de conversão (GC) foi obtido aplicando-se equação:

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

[059] 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<sup>-1</sup>, e a altura do pico da dupla ligação (C=C) do grupo benzeno aromático a 1610 cm<sup>-1</sup>, cuja intensidade não se modifica durante a polimerização.

[060] A **atividade antioxidante** (AA) da queracetina, resveratrol e PVA foi determinada pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

[061] Preparou-se uma solução de DPPH<sup>•</sup> (0,1 mM) em etanol e soluções estoques de extrato bruto e fração acetato de etila de PVA, queracetina e resveratrol, na concentração 500  $\mu$ g/mL, em etanol. As soluções de reação foram

compostas de 2 mL de DPPH<sup>•</sup> 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<sup>•</sup> 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:

EQUAÇÃO 1:

$$( (A\text{controle} - A\text{amostra}) / A\text{controle} ) \times 100.$$

[062] Em que:

[063] Acontrole(-) = absorvância da solução de DPPH sem a amostra;

[064] Aamostra = absorvância da amostra com o DPPH.

[065] **Atividade antimicrobiana** – 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em 80  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 acidophylus* 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.

[066] **Resistência adesiva** – Para esse ensaio foram utilizados terceiros molares humanos hígidos, doados em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas/UFAL. Uma superfície de dentina plana e perpendicular ao longo eixo do dente foi obtida seccionando-se a face oclusal dos dentes com um corte transversal ao longo eixo do dente, na altura do fundo do sulco central. A seguir as superfícies oclusais dos dentes foram desgastadas com lixas de carbeto de silício (SiC) de granulação 600 durante 1 minuto sob refrigeração a água, para formação da *smear layer*. A dentina foi condicionada por 15 s com ácido fosfórico 35% (Gel Condicionador Scotchbond, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA). A seguir o ácido foi removido com água destilada e o excesso de água removido e, no grupo controle, o sistema adesivo Adper™ Single Bond 2 foi aplicado. Nos outros grupos, foram aplicados os adesivos experimentais

seguindo-se a mesma metodologia. Depois do adesivo todos os dentes receberam uma cobertura de 4 mm de resina composta (3M Filtek™ Z 350 Restaurador Universal), em incrementos de 2mm polimerizados individualmente de acordo com as instruções do fabricante. Concluído este procedimento, os dentes foram armazenados em estufa 37º C imersos em água destilada durante 24 h.

[067] Os dentes foram seccionados paralelamente ao longo eixo, em cortes perpendiculares entre si, nos sentidos x e y, sob refrigeração com água, obtendo-se, desta forma, os corpos-de-prova em forma de palitos, com dimensões aproximadas de 0,8 mm<sup>2</sup> de secção transversal, mensuradas com paquímetro eletrônico digital (modelo 727, Starrett, Itu, SP, Brasil), com precisão de 0,01mm. Os testes de microtração foram realizados a uma velocidade constante de 0,5 mm/min. O modo de fratura foi observado em estereomicroscópio (40x) e o padrão de fratura foi classificado como: a) falha coesiva na resina composta (CR); b) falha coesiva no adesivo e/ou na camada híbrida ou falha adesiva (CA); c) falha coesiva na dentina (CD); d) falha mista (FM).

## RESULTADOS OBTIDOS

[068] Os dados foram submetidos ao teste F ANOVA seguido do teste de Tukey para comparações pareadas ( $\alpha=0.05$ ).

[069] Os resultados do grau de conversão podem ser vistos na **Figura 1**. Os valores do grau de conversão dos adesivos estão de acordo com os padrões estabelecidos para essa categoria de material (>55%).

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

[071] **Tabela 1** – Percentual da Atividade antioxidante (AA%) da quercetina, resveratrol, Extrato etanólico de PVA e de sua fração hexânica.

Concentração	Atividade Antioxidante (%)			
	Quercetina	Resveratrol	Fração Hexânica	Extrato Etanólico
	PVA	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

PVA – Própolis vermelha de Alagoas

[072] 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).

[073] **Tabela 2.** 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

[074] 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.

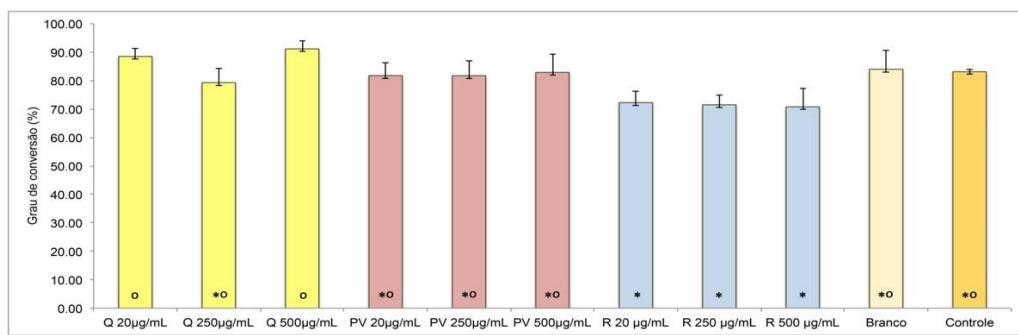
[075] O modo de fratura predominante foi falha mista, seguida de falha adesiva (falha coesiva no adesivo e / ou na camada híbrida), independentemente tipo de adesivo utilizado. Mostrando que a ligeira redução da resistência de união ao longo do tempo não ocorreu por alterações na formação da interface 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 dental com quercetina (3,3', 4', 5,7-penta-hidroxil-flavona), resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbeno) e fração hexânica de extrato etanólico de própolis vermelha de Alagoas (EHPVA), nas concentrações de 20 µg/mL, 250 µg/mL ou 500 µg/mL.
2. Produto, conforme reivindicação 1, caracterizado por ser uma composição líquida contendo: nanopartículas de sílica, BisGMA (bisfenol A-glicidil metacrilato), HEMA (2-hidroxietil metacrilato), EGDMA (Etilenoglicol dimetacrilato), etanol, água, sistema fotoiniciadores e um copolímero funcional de metacrilato de ácidos poliacrílico e polialcenoico;
3. Produto, conforme reivindicações 1 e 2, caracterizado por formar um polímero com grau de conversão dentro dos valores estabelecidos para adesivos dentais;
4. Produto, conforme reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por possuir atividade antioxidante e atividade contra as bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*;
5. Produto, conforme reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por preservar o colágeno da dentina e a durabilidade da interface adesiva;
6. Produto, conforme reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado para uso em restaurações adesivas.

## DESENHOS

**Figura 1**



**Figura 2**

