



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

CARTA PATENTE Nº BR 102019008929-6

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 102019008929-6

(22) Data do Depósito: 02/05/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 10/11/2020

(51) Classificação Internacional: A61K 6/08; A61K 6/00.

(52) Classificação CPC: A61K 6/08; A61K 6/0002.

(54) Título: RESINA DENTÁRIA COMPOSTA FOTOPOLIMERIZÁVEL ENRIQUECIDA COM EXTRATO DE PRÓPOLIS E USOS DA MESMA

(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: JOSÉ MARCOS DOS SANTOS OLIVEIRA; THÉO FORTES SILVEIRA CAVALCANTI; DÁVIDA MARIA RIBEIRO CARDOSO DOS SANTOS; MARCOS AURELIO BOMFIM DA SILVA; ISABEL CRISTINA CELERINO DE MORAES PORTO; RENATA MATOS LAMENHA LINS; MARCOS VINÍCIUS DIAS VERMELHO; EDUARDO JORGE DA SILVA FONSECA; SAMUEL TEIXEIRA DE SOUZA; ARTUR FALQUETO SONSIN; REGIANNE UMEKO KAMIYA; EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO; FERNANDA LIMA TORRES DE AQUINO; JENIFFER MCLAINE DUARTE DE FREITAS; JOHNNATAN DUARTE DE FREITAS; CARMEM LÚCIA DE PAIVA E SILVA ZANTA; TICIANO GOMES DO NASCIMENTO; JOSEALDO TONHOLO.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 02/05/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 14/05/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Gomes Ciano

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

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**RESINA DENTÁRIA COMPOSTA FOTOPOLIMERIZÁVEL ENRIQUECIDA COM EXTRATO DE PRÓPOLIS E USOS DA MESMA**”

[1] A presente invenção está inserida no campo do desenvolvimento de preparações médicas, odontológicas e/ou higiênicas; se tratando do desenvolvimento de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com própolis. Adicionalmente, são apresentados os processos de caracterização físico-química, mecânica e biológica da resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com própolis através de diferentes métodos de análise. Por fim, são propostos os usos da resina dentária composta enriquecida com própolis com atividade antibacteriana frente à espécie *Streptococcus mutans* e com atividade cicatrizante.

ESTADO DA TÉCNICA

[2] As resinas dentárias compostas fotopolimerizáveis são compósitos formados por: uma matriz orgânica polimérica à base de monômeros de dimetacrilatos, partículas inorgânicas chamadas de carga e agentes de união silânicos. Essas referidas resinas são materiais restauradores diretos utilizados na restauração ou reposição de tecidos dentais danificados por fenômenos físicos, químicos ou microbiológicos (FERRACANE, J.K. Resin composite – State of the art. **Dental Materials**. v.27, p.29-38, 2011).

[3] As primeiras resinas dentárias compostas foram desenvolvidas na década de 1950 e possuíam a característica de serem autopolimerizáveis (polimerização ativada quimicamente). Devido às propriedades mecânicas e de manipulação das resinas autopolimerizáveis não se mostrarem satisfatórias, houve o desenvolvimento de resinas dentárias compostas fotopolimerizáveis (Lutz, F.; Phillips, R.W. A classification and evaluation of composite resin systems. **The Journal of Prosthetic Dentistry**. v.50, n.4, p.480-488, 1983).

[4] Além de apresentarem propriedades mecânicas mais adequadas em relação às resinas autopolimerizáveis, as resinas dentárias compostas

fotopolimerizáveis possuem melhor aparência estética em relação a outros materiais restauradores diretos como o amalgama, prata e o ouro. As resinas dentárias compostas fotopolimerizáveis também têm a vantagem de diversas apresentações quanto à sua viscosidade. Sua viscosidade pode variar desde altamente viscosa como adesivos e resinas do tipo flow até altamente rígidas e, desse modo, podem ser utilizadas desde base de forramentos até reconstrução de coroas (Wang, J.; Dong, X.; Yu, Q.; Baker, S.N.; Li, H.; Larm, N.E.; Baker, G.A.; Chen, L.; Tan, J.; Chen, M. Incorporation of antibacterial agent derived deep eutectic solvent into an active dental composite. **DENTAL MATERIALS**. v.33, p.1445-1455, 2017).

[5] A matriz orgânica das resinas dentárias compostas fotopolimerizáveis é formada por uma mistura de monômeros dimetacrilatos aromáticos e/ou alifáticos, a depender da aplicação da resina. Os principais monômeros utilizados nas formulações são: dimetacrilato de glicidila bisfenol A (bis-GMA), diuretano dimetacrilato (UDMA), dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) e dimetacrilato de bisfenol A etoxilado (bis-EMA) (Peutzfeldt, A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. **EUROPEAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES**. v.105, p.97-116, 1997).

[6] O bis-GMA é um dos principais e mais antigos monômeros utilizados nesse tipo de resina. Esse monômero possui dois anéis aromáticos no centro de sua estrutura, o que impede a rotação molecular e confere rigidez à resina compósita. As duas hidroxilas presentes na sua estrutura permitem a ligação de hidrogênio entre as moléculas, conferindo alta viscosidade. A alta massa molecular, em relação aos outros monômeros mais utilizados, e a rigidez do bis-GMA reduzem a mobilidade deste monômero durante a polimerização, o que pode ocasionar em um baixo grau de conversão. Outro problema encontrado em resinas exclusivamente à base de bis-GMA é a dificuldade da incorporação das partículas de carga, responsáveis por conferir resistência mecânica ao compósito final (Peutzfeldt, A. Resin composites in dentistry: the

monomer systems. **EUROPEAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES**. v.105, p.97-116, 1997).

[7] Um modo de minimizar os problemas supracitados relacionados às formulações de resinas dentárias compósitas fotopolimerizáveis exclusivamente à base de bis-GMA é a adição de um monômero diluente de baixa massa molecular à matriz orgânica. Esse monômero geralmente é o TEGDMA (Anusavice, K.J.; Shen, C.; Rawls, H.R. Phillips Materiais Dentários. **Elsevier**. 12^a ed., 2013).

[8] O TEGDMA também é um monômero alifático com massa molecular menor que o do Bis-GMA (286,32 g/mol). Sua utilização na matriz orgânica das resinas é para diminuir a viscosidade do Bis-GMA, sendo assim um monômero diluente. Ao promover a diminuição da viscosidade, obtêm-se também o aumento do grau de conversão dos monômeros. A referida diminuição de viscosidade também proporciona maior capacidade de inserção de carga ao compósito, o que lhe confere melhores propriedades mecânicas. Apesar dessas vantagens, a adição de monômeros de menor peso molecular deve ser feita com cautela, visto que o grande percentual desses monômeros no compósito final pode levar à observação de contração de polimerização, com consequente aparecimento de cárie secundária (Anusavice, K.J.; Shen, C.; Rawls, H.R. Phillips Materiais Dentários. **Elsevier**. 12^a ed., 2013).

[9] Outros monômeros de alta massa molecular como o UDMA foram sintetizados para suprir as dificuldades da alta viscosidade do Bis-GMA e da contração de polimerização do TEGDMA. O UDMA possui massa molecular de aproximadamente 470 g/mol e apresenta dois grupamentos uretano (-NH-CO-O-) que lhe conferem menor viscosidade em relação ao Bis-GMA. Essa característica permite um maior grau de conversão do compósito e maior capacidade de receber carga (Peutzfeldt, A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. **European Journal of Oral Sciences**. v. 105, p. 97-116, 1997).

[10] O grupamento uretano também possibilita a formação de ligações de hidrogênio entre os monômeros, porém de menor intensidade em comparação ao bis-GMA e o UDMA possui maior flexibilidade em função da ausência de anéis aromáticos. Essas características contribuem para o aumento do grau de polimerização, diminuição da contração de polimerização e maior capacidade de incorporação de carga o que aumenta suas propriedades mecânicas (Peutzfeldt, A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. **European Journal of Oral Sciences**. v. 105, p. 97-116, 1997; Anusavice, K.J.; Shen, C.; Rawls, H.R. Phillips Materiais Dentários. **Elsevier**. 12^a ed., 2013).

[11] Outro monômero de alta massa molecular é o bis-EMA. Este possui massa molecular de 540 g/mol, mantendo a baixa capacidade de apresentar contração de polimerização. Esse monômero é uma modificação do bis-GMA, diferindo simplesmente na substituição da hidroxila por um grupamento etóxi, gerando um monômero análogo não hidroxilado. Essas características são fundamentais para que o monômero tenha menor viscosidade e menor hidrofiliabilidade, em relação ao bis-GMA. Além disso, a rigidez do monômero é mantida devido à presença dos anéis aromáticos (Peutzfeldt, A. Resin composites in dentistry: the monomer systems. **European Journal of Oral Sciences**. v. 105, p. 97-116, 1997; Gonçalves, F.; Kawano, Y.; Pfeifer, C.; Stansbury, J.W.; Braga, R.R. Influence of BisGMA, TEGDMA, and BisEMA contents on viscosity, conversion, and flexural strength of experimental resins and composites. **European Journal of Oral Sciences**. v. 117, p. 442-446, 2009).

[12] Os carregamentos das resinas compostas dentárias são minerais adicionados à matriz orgânica para conferir propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas às resinas. Entre os benefícios dessa adição estão: diminuição da contração de polimerização e da expansão térmica, aumento da resistência à compressão e à tração, aumento da rigidez e da tenacidade e a diminuição da sorção de água. Tanto o conteúdo de carga, quanto o tamanho das suas partículas e a distribuição dos tamanhos de partícula influenciam

diretamente na consistência do compósito e, respectivamente, nas suas finalidades e manuseio (Anusavice, K.J.; Shen, C.; Rawls, H.R. Phillips Materiais Dentários. **Elsevier**. 12^a ed., 2013).

[13] Os principais carregamentos utilizados em resinas dentárias compostas são: borosilicato, quartzo, silicato de alumínio, silicato de lítio-alumínio, fluoreto de itérbio e vidros de bário, estrôncio, zircônio e zinco. Os carregamentos à base de vidro contendo metais são mais susceptíveis às variações de pH (seja alto ou baixo) e à lixiviação pela saliva ao longo do tempo, em relação aos carregamentos à base de sílica que são mais resistentes (Anusavice, K.J.; Shen, C.; Rawls, H.R. Phillips Materiais Dentários. **Elsevier**. 12^a ed., 2013). Além desses carregamentos classicamente utilizados, têm-se desenvolvidos carregamentos de hidroxiapatita, uma vez que são biocompatíveis com as estruturas a serem restauradas e podem promover a remineralização das mesmas (Forte, L.; Torricelli, P.; Boanini, E.; Gazzano, M.; Rubini, K.; Fini, M.; Bigi, A. Antioxidant and bone repair properties of quercetin-functionalized hydroxyapatite: An in vitro osteoblast-osteoclast-endothelial cell co-culture study. **Acta Biomaterialia**. v.32, p.298-308, 2016).

[14] Quanto à classificação, as resinas dentárias compostas podem ser classificadas em função do tamanho das partículas de carga e em função das características de manipulação do compósito.

[15] Em relação ao tamanho das partículas de carga, as resinas dentárias compostas podem ser classificadas como: Macrofill (se possuem partículas de carga com tamanho entre 10 – 50 µm), Microfill (se possuem partículas com tamanho entre 0,1 – 5 µm), híbrida (se possuem as duas faixas de partículas anteriormente citadas), midfill (se possuem partículas com tamanho de 1 – 10 µm), minifill (se o tamanho de partícula for de 0,1 – 1 µm) e nanofill (se o tamanho de partícula for de 5 – 100 nm) (Ferracane, J.L. Resin composite—State of the art. **Dental Materials**. v. 27, p.29-38, 2011).

[16] Em relação à manipulação, as resinas dentárias compostas podem ser classificadas como resinas fluidas, flowable ou flow e como resinas

condensáveis. As resinas do tipo flow apresentam menor quantidade de partículas de carga e, dessa forma, apresentam menor viscosidade e maior capacidade de espalhamento nas superfícies e cavidades. As resinas do tipo flow também são chamadas de “rejuntas odontológicas” porque são utilizadas internamente como forramento da restauração. As resinas condensáveis apresentam maior densidade e menor viscosidade, permitindo o esculpimento de formas anatômicas durante a restauração (Anusavice, K.J.; Shen, C.; Rawls, H.R. Phillips Materiais Dentários. **Elsevier**. 12ª ed., 2013; Ferracane, J.L. Resin composite—State of the art. **Dental Materials**. v. 27, p.29-38, 2011).

[17] Um dos principais problemas das resinas compostas dentárias é sua colonização por *Streptococcus mutans*, o principal agente etiológico das cáries. Essa espécie de bactéria é capaz de formar biofilme sobre as superfícies dentárias e sobre as superfícies das restaurações dentárias. A fermentação realizada por essas bactérias leva à produção de ácido láctico e, conseqüentemente, à diminuição do pH nas superfícies em questão. Quando na superfície dos dentes, a diminuição do pH, ocasionada pelo metabolismo do *Streptococcus mutans*, leva à desmineralização das estruturas dentárias, uma vez que a hidroxiapatita se dissolve em meio ácido (Cury, J.A.; Tenuta, L.M.A. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? **Braz. Oral. Res.** v. 23, n.1, p. 23-30, 2009).

[18] Quando na superfície de resinas dentárias compostas, o *S. mutans* tem capacidade de degradar essas resinas através de enzimas do tipo esterases. Essas enzimas hidrolisam as ligações ésteres desprotegidas da rede polimérica das resinas. Esse mecanismo de degradação de resinas dentárias por *S. mutans* é clinicamente relevante no processo de falha desse tipo de restauração (Huang, B.; Siqueira, W.L.; Cvitkovitch, D.G.; Finer, Y. Esterase from a cariogenic bacterium hydrolyzes dental resins. **Acta Biomaterialia**. v.71, p.330-338, 2018).

[19] As resinas compostas dentárias devem ser produzidas de modo a minimizar a contração de polimerização e, conseqüentemente, a minimizar o

aparecimento de cáries secundárias. Quando há a contração de polimerização em níveis inadequados, há o aparecimento de fendas, espaços vazios entre a restauração e as estruturas dentárias e gengivais adjacentes. O principal modo de prevenção é o desenvolvimento de uma formulação adequada do compósito, com baixa contração de polimerização. Outra forma de prevenção que vem sendo desenvolvida é o enriquecimento do compósito com agentes antimicrobianos, tais como nanopartículas de prata, de óxido de zinco e monômeros funcionais com atividade antibacteriana.

[20] Alguns grupos de pesquisa têm desenvolvido diversas formulações de resinas dentárias compostas e de adesivos dentários fotopolimerizáveis enriquecidos com agentes antimicrobianos. A literatura já descreve o desenvolvimento de resina flow enriquecidas com nanopartículas de óxido de zinco, apresentando resistência à colonização por *Streptococcus mutans*, porém com propriedades mecânicas diminuídas em relação à resina padrão (Hotaji, S.T.; Alaghemand, H.; Hamze, F.; Babaki, F.A.; Rajab-Nia, R.; Rezvani, M. B.; Kaviani, M.; Atai, M. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. **Dental Materials**. v.29, p.495-505, 2013).

[21] O uso de própolis em resinas dentárias não é descrito na literatura científica. O uso de própolis no desenvolvimento de resinas dentárias fotopolimerizáveis também não é descrito quando feita a pesquisa de anterioridades nas bases de patentes oficiais nem bases privadas.

[22] Quando utilizado o termo “propolis” e o mesmo termo combinado com os termos “methacrylat*”, “dent*”, “composit*”, “bis-gma”, “dental”, “composite”, “methacrylate”, “resin” e “glass-ionomer” não houve recuperação de carta patente sobre o tema proposto de uso de própolis no desenvolvimento de resinas dentárias.

PROBLEMA A SER RESOLVIDO

[23] O uso de derivados de própolis como aditivos de resinas dentárias descrito neste documento de patente gera a solução do problema tecnológico

existente na área que é o desenvolvimento de uma resina dentária resistente à colonização por *Streptococcus mutans*, que agrega ainda a propriedade de cicatrizante.

SOBRE PRÓPOLIS

[24] Vários tipos de própolis ao redor do mundo têm sido exaustivamente analisados quanto à sua composição química, quanto às suas possíveis atividades biológicas e, por esse motivo, utilizados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, alimentícios, cosméticos, odontológicos, dentre outros (FREIRES, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.110, p.267-279, 2016; OLIVEIRA, J.M.S.; CAVALCANTI, T.F.S.; SOUZA, L.C.; PORTO, I.C.C.M.; NASCIMENTO, T.G.; ZANTA, C.L.P.S.; UCHOA, S.B.; TONHOLO, J. Uso de própolis no desenvolvimento de resinas dentárias: um estudo prospectivo. **Cadernos de Prospecção**. v.10, n.2, p.285-299, 2017).

[25] Própolis é uma resina elaborada por abelhas, particularmente da espécie *Apis mellifera*, a partir da coleta e processamento de materiais de origem vegetal, tais como: exsudatos, pólen, néctar, flores e folhas. As abelhas processam esse material coletado com a inserção de sua saliva à mistura (BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. A STUDY ON FLAVONOIDS OF PROPOLIS. **Journal of Natural Products**. v.46, n.4, p.471-474, 1983; BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**. v.31, n.1, p.3-15, 2000).

[26] Cada tipo de própolis possui uma origem botânica majoritária, ou seja, uma espécie vegetal onde, majoritariamente, as abelhas coletam exsudatos e outros materiais para a elaboração da própolis. Por esse motivo, a composição química de cada tipo de própolis é dependente da composição fitoquímica de sua origem botânica. No Brasil existem 13 tipos distintos de própolis catalogados que são classificados segundo suas características físico-químicas. Dentre esses tipos, cinco são provenientes da região sul (grupo 3),

um da região sudeste (grupo 12) e sete da região nordeste (grupos 6 e 13) (Park, Y.K.; Alencar, S.M.; Aguiar, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2502-2506, 2002; Dausch, A.; Moraes, C.S.; Fort, P.; Park, Y.K. Botanical Origin and Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **eCAM**. v.5, n.4, p.435-441, 2008).

[27] A Própolis Vermelha proveniente do Estado de Alagoas (Brazilian Red Propolis) recebeu a certificação de Indicação Geográfica (IG) do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) na modalidade Denominação de Origem sob o número IG 201101 – INPI e com a denominação “Manguezais de Alagoas”, sendo o primeiro tipo de própolis brasileira a receber tal registro de IG (OLIVEIRA, J.M.S.; Cavalcanti, T.F.S.; Souza, L.C.; Porto, I.C.C.M.; Nascimento, T.G.; Zanta, C.L.P.S.; Uchoa, S.B.B.; Tonholo, J. Uso de própolis no desenvolvimento de resinas dentárias: um estudo prospectivo. **Cadernos de Prospecção**. v.10, n.2, p.285-299, abr./jun. 2017).

[28] A composição química de qualquer tipo de própolis está diretamente relacionada à região onde a colmeia está inserida, visto que as abelhas coletam os “insumos” para a elaboração da própolis a partir de uma origem botânica principal, bem como a partir de outras espécies vegetais nativas. O perfil químico de cada tipo de própolis, invariavelmente, é semelhante ao perfil químico de metabólitos secundários de sua origem botânica (Park, Y.K.; Alencar, S.M.; Aguiar, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2502-2506, 2002).

[29] Os principais constituintes químicos da Própolis Vermelha de Alagoas (grupo 13) são os isoflavonoides formononetina, isoformononetina, vestitol, neovestitol, biochanina A e daidzeína, além da chalcona isoliquiritigenina, do pterocarpano medicarpina e da flavanona liquiritigenina. Todos esses também são os principais constituintes sua origem botânica, a *Dalbergia ecastophillum* (Alencar, S.M.; Oldoni, T.L.; Castro, M.L.; Cabral, I.S.; Costa-Neto, C.M.; Cury,

J.A.; Rosalen, P.L.; Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. Piracicaba, v.113, p.278-283, 2007).

[30] Além desses marcadores químicos, as própolis do tipo vermelha de Alagoas possuem também ácidos fenólicos, monoterpenos (óleos essenciais), sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e benzofenonas em sua composição química. A própolis vermelha brasileira e a vermelha cubana são quimicamente semelhantes do ponto de vista de composição, esse fato é explicado porque as duas possuem a mesma origem botânica (PICCINELLI A.L.; Lotti, C.; Campone, L.; Cuesta-Rubio, O.; Campo Fernandez, M. Rastelli, L. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.59, p.6484-6491, 2011). Diferentemente dos outros tipos de própolis brasileira, a Própolis Vermelha de Alagoas é rica em isoflavonoides, característica que é justificada por sua origem botânica pertencer à família Fabaceae (Veitch, N.C. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Products Reports**. v.24, p.417-464, 2007).

[31] Determinadas Atividades biológicas são naturalmente atribuídas aos diversos tipos de própolis, uma vez que os referidos tipos possuem a função de ser agente antimicrobiano para uso das abelhas na colmeia. Dessa forma, é de se esperar a observação da atividade contra cepas de bactérias e fungos de referência biológica e até mesmo certa atividade frente às cepas mais resistentes (BANKOVA, V.; Christov, R.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M.C.; Popov, S. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung C**. v.50, p.167-172, 1995).

[32] Da mesma forma, é de se esperar a atividade antioxidante para os diversos tipos de própolis, uma vez que seus constituintes químicos são majoritariamente caracterizados como compostos fenólicos, antioxidantes naturais. Contudo, diferentes tipos de própolis apresentam diferentes potenciais

para essas atividades biológicas, a depender de cada composição química (TRUSHEVA, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova, S.; MArccucci, M.C.; Miorin, P.L.; Pasin, F.R.; Tsvetkova, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **eCAM**. v.3, n.2, p.249-254, 2006).

[33] Dentre as atividades atribuídas à Própolis Vermelha de Alagoas estão: antibacteriana (frente a cepas de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, dentre outros); antifúngica (frente a cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*); cicatrizante, antioxidante, dentre outras já conhecidamente referenciadas (Almeida, E.T.C.; Silva, M.C.D.; Oliveira, J.M.S.; Kamiya, R.U.; Arruda, R.E.S.; Vieira, D.A.; Silva, V.C.; Escodro, P.B.; Basílio-Júnior, I.D.; Nascimento, T.G. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v.7, p.280-287, 2017; Alencar, S.M.; Oldoni, T.L.; Castro, M.L.; Cabral, I.S.; Costa-Neto, C.M.; Cury, J.A.; Rosalen, P.L.; Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red própolis. **Journal of Ethnopharmacology**. Piracicaba, v.113, p.278-283, 2007; Freires, I.A.; Alencar, S.M.; Rosalen, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.110, p.267-279, 2016; Andrade, J.K.S.; Denadai, M.; de Oliveira, C.S.; Nunes, M.L.; Narain, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**. v. 101, p. 129-138, 2017; Jacob, A.; Parolia, A.; Pau, A.; Amalraj, F.D. The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.15:294, 2015).

[34] O uso da Própolis Vermelha de Alagoas tem sido fonte de estudos de desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, alimentícios, cosméticos e odontológicos devido às atividades biológicas já descritas. Dentre os produtos

tecnológicos desenvolvidos à base de própolis estão: microencapsulados farmacêuticos, iogurtes, enxaguatórios bucais e cremes dentais. Um estudo recente de prospecção tecnológica demonstra que não há documento de patente referente ao desenvolvimento de resina dentária composta fotopolimerizável contendo própolis (OLIVEIRA, J.M.S.; Cavalcanti, T.F.S.; Souza, L.C.; Porto, I.C.C.M.; Nascimento, T.G.; Zanta, C.L.P.S.; Uchoa, S.B.B.; Tonholo, J. Uso de própolis no desenvolvimento de resinas dentárias: um estudo prospectivo. **Cadernos de Prospecção**. v.10, n.2, p.285-299, abr./jun. 2017).

[35] A própolis vermelha tem sido amplamente estudada pelos grupos de pesquisa da Universidade Federal de Alagoas como matéria prima no desenvolvimento de produtos tecnológicos, tais como: microencapsulados farmacêuticos, nanoesferas, microencapsulados de liberação modificada, nanopartículas poliméricas, compósito microparticulado contendo quitosana – própolis, composição farmacêutica semissólida para tratamento da leishmaniose tegumentar e caseinatos, além de formulações para pó fixador de próteses dentárias enriquecido com própolis.

[36] Os produtos tecnológicos à base de Própolis Vermelha de Alagoas listados acima possuem os respectivos números de registro: BR1020120135906 e WO2014186851A1, PCTBR2017050088, BR1020140073191, BR1020150164050, BR10201502418, BR102015031753, BR1020170000880035 e BR1020180771000.

[37] A invenção proposta neste documento de patente busca o preenchimento da lacuna tecnológica existente no que se refere ao desenvolvimento de resinas dentárias compostas fotopolimerizáveis que apresentem atividades antibacteriana e cicatrizante, propondo a aplicação de própolis no desenvolvimento de resina dentária composta fotopolimerizável e seu uso como material restaurador com ação antibacteriana e cicatrizante.

[38] As resinas dentárias compostas fotopolimerizáveis disponíveis no mercado não apresentam atividades biológicas como antibacteriana e

cicatrizante, logo, as atividades atribuídas a presente invenção e suas respectivas aplicações clínicas propostas demonstram vantagens consideráveis frente ao estado da técnica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[39] As resinas dentárias compostas fotopolimerizáveis são restaurações dentárias diretas utilizadas na recuperação das estruturas dentárias lesionadas devido à presença do quadro patológico de cárie. Tais resinas são desenvolvidas para que apresentem propriedades mecânicas satisfatórias, porém não há no mercado resinas que apresentem função antibacteriana nem função cicatrizante. Esse fato justifica o desenvolvimento de tecnologias de combate às bactérias que colonizam resinas dentárias compostas fotopolimerizáveis e que causam cáries secundárias e, melhor ainda, se agregarem propriedades cicatrizantes. Enquadram-se nesta categoria particularmente os microorganismos da espécie *Streptococcus mutans*.

[40] Na presente invenção a resina dentária composta fotopolimerizável do tipo flow foi modificada com derivados de propolis, particularmente o tipo Vermelha de Alagoas. Foram analisadas a compatibilidade química, as propriedades mecânicas e físico-químicas da resina modificada, bem como o efeito bacteriostático do compósito desenvolvido.

[41] A Própolis Vermelha de Alagoas foi utilizada na forma de extrato liofilizado, a partir do extrato acetato de etila. O extrato acetato de etila liofilizado foi solubilizado em 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) e essa solução foi incorporada à resina bulk do tipo flow. Realizou-se os ensaios de grau de conversão de monômero em polímero, resistência flexural, microdureza, sorção e solubilidade, rugosidade, atividade antibacteriana e citotoxicidade.

[42] A presente invenção apresenta composições de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecidas com extrato de própolis (FRFP), compostas por extrato de própolis padronizado e liofilizado, solvente derivado de metacrilato e resina dentária composta fotopolimerizável do tipo flow. Por fim, são apresentados os usos das composições de resina dentária enriquecida

com derivados de própolis em função de suas propriedades de atuar como: (a) antibacteriana; (b) cicatrizante; (c) catalisadora de conversão dos monômeros em polímeros.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[43] A figura 1 apresenta o grau de conversão das formulações de resina enriquecidas com própolis (FRFP A, FRFP B e FRFP C), além do grupo controle resina comercial (R). Observa-se que as formulações enriquecidas com própolis apresentaram maior grau de conversão que a resina comercial, tanto imediatamente após o procedimento quanto 24 horas após a fotopolimerização. Diante do exposto, observa-se que a adição de própolis foi determinante para o aumento do grau de conversão da resina, diminuindo, assim, a quantidade de monômeros livres após processo do fotopolimerização. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos FRFP A, FRFP B e FRFP C. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre cada um dos grupos supracitados com o grupo R.

[44] A Figura 2 apresenta a resistência flexural dos grupos de análise. Observa-se que os grupos aditivados com própolis (FRFP A, FRFP B e FRFP C) apresentaram resistência flexural acima de 100 MPa, satisfazendo o valor mínimo preconizado pela ISO 4049 que é de 50 MPa para esse tipo de material. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos supracitados.

[45] A Figura 3 apresenta a microdureza dos grupos testados pelo método de Knoop. As FRFP A, FRFP B e FRFP C apresentaram os seguintes valores de número de microdureza Knoop (NMK): 19,7; 18,4 e 20,13; respectivamente, sendo estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

[46] A Figura 4 apresenta a capacidade de sorção em água dos grupos testados. Os grupos FRFP A, FRFP B e FRFP C apresentaram os seguintes resultados: 21,67 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, 22,24 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ e 17,15 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, respectivamente. Diante do exposto, foi constatado que todos os grupos enriquecidos com

própolis satisfazem a ISO 4049 que estabelece o máximo de 40 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos supracitados.

[47] A Figura 5 apresenta a capacidade de solubilidade em água dos grupos testados. Os grupos FRFP A, FRFP B e FRFP C apresentaram os seguintes resultados: 4,2 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, 3,6 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ e 4,05 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, respectivamente. Diante do exposto, foi constatado que todos os grupos enriquecidos com própolis satisfazem a ISO 4049 que estabelece o máximo de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos supracitados.

[48] A Figura 6 apresenta o resultado de atividade antimicrobiana dos grupos testados frente a cepa de *Streptococcus mutans* CCT 3440. Os grupos FRFP A, FRFP B e FRFP C apresentaram atividade bacteriostática, uma vez que promoveram a inibição do crescimento bacteriano. Os grupos controle resina comercial (R) e resina comercial + solvente (RS) não apresentaram atividade antimicrobiana frente à referida cepa. Esse resultado demonstra a vantagem tecnológica das formulações de resina dentárias fotopolimerizáveis enriquecidas com própolis em comparação com a resina comercial, além de comprovar que a referida atividade antibacteriana está relacionada com a própolis contida nas formulações.

[49] A Figura 7 apresenta a citotoxicidade dos grupos experimentais frente a fibroblastos murinos da linhagem 3T3. Nenhum dos grupos analisados se apresentou citotóxico uma vez que mais de 80% das células expostas a cada um deles se mantiveram viáveis e sem alterações morfológicas. As células expostas ao grupo FRFP C foi as que se mantiveram mais viáveis (91% de viabilidade celular), porém, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos analisados.

[50] A Figura 8 apresenta a citotoxicidade dos grupos experimentais FRFP C, R e RS em função da dose-resposta. Nenhum dos grupos se apresentou citotóxico, visto que mais de 80% das células expostas a cada grupo se mantiveram viáveis e sem alterações morfológicas. As células expostas ao grupo FRFP C apresentaram indícios de proliferação celular visto que estavam

em maior quantidade que o grupo controle (tracejado em 100%), indicando possível atividade cicatrizante. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) dentro de cada grupo em função da variação das doses. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo FRFP C quando comparado aos grupos R e RS.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[51] Os produtos, processos e usos descritos na presente invenção podem ser detalhados e entendidos através das referências às figuras presentes neste documento e à seguinte descrição:

Composições de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com própolis

[52] As formulações de resinas enriquecidas com própolis (FRFP) apresentam concentrações definidas de extrato padronizado de própolis, cujas composições variam de acordo com a origem botânica de cada tipo de própolis. Adicionalmente, as composições de resinas dentárias em questão apresentam importantes atividades, em especial a antibacteriana e cicatrizante. Ademais, apresentam ainda maior grau de conversão dos monômeros em polímero.

[53] Quando utilizada a Própolis Vermelha de Alagoas, devidamente caracterizada no âmbito da Indicação Geográfica 201101-INPI, as resinas apresentam concentrações definidas de isoflavonóides, flavonóides, chalconas e ácidos fenólicos devido à especificidade da própolis dos manguezais de Alagoas, o que ressalta ainda mais as propriedades antibacteriana e cicatrizante.

[54] As FRFP, além do extrato com os princípios ativos obtidos do extrato padronizado de própolis apresentam em sua formulação os seguintes excipientes com diferentes funcionalidades farmacêuticas: composto ativo (de acordo com o extrato de própolis utilizado), matriz orgânica polimérica à base de derivados de metacrilatos, quais sejam: 2-hidroxietilmetacrilato (0,01%), dimetacrilatos de uretano (10 a 20%), dimetacrilato de bisfenol A etoxilado (1 a 10%), dimetacrilato de glicidila bisfenol A (1 a 10%), dimetacrilatos de

triétilenoglicol (<1%); carregamento inorgânico: cerâmica silanizada tratada (50 a 60%); fotoiniciadores: canforoquinona (<1%) e etil-4-dimetilaminobenzoato (<1%); agente de radiopacidade: fluoreto de itérbio (1 a 10%) e diluente: 2-hidroxietilmetacrilato (0,01%).

[55] Como exemplo, a Própolis Vermelha de Alagoas foi coletada (200 g) e extraída com 500 mL de solução etanol-água (4:1) por dois períodos de 48 horas, a temperatura ambiente e protegida da luz. Após cada um dos períodos o sobrenadante (macerado) foi retirado e acondicionado em recipiente âmbar previamente limpo. O macerado total foi concentrado em evaporador rotatório, a 45 °C, dando origem ao extrato hidroalcoólico de própolis.

[56] Pesou-se 20 g do extrato hidroalcoólico e o solubilizou em 60 mL de solução etanol-água (7:3) para realização do particionamento do mesmo extrato em funil de separação. O particionamento foi realizado primeiramente com dois volumes de hexano (100 mL). A porção hexânica foi retirada do funil de separação e concentrada em evaporador rotatório, dando origem ao extrato hexânico de própolis. Posteriormente, o particionamento foi continuado com dois volumes de acetato de etila (100 mL). A porção acetato de etila foi retirada do funil de separação e concentrada em evaporador rotatório, dando origem ao extrato acetato de etila de própolis.

[57] Pesou-se 100 mg do extrato acetato de etila de própolis e acondicionou-se em frasco ampola previamente limpo para realização da liofilização. O extrato acetato de etila foi congelado por 4 dias a -18°C e levado à liofilização, dando origem ao extrato acetato de etila liofilizado de própolis.

[58] A preparação das formulações de resina flow enriquecidas com própolis (FRFP) seguiu-se do seguinte modo: Primeiramente, foram preparadas três soluções de extrato acetato de etila liofilizado de própolis em 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) nas concentrações de 10,0 mg/mL, 15,0 mg/mL e 25,0 mg/mL. Posteriormente, tomou-se 10 µL de cada solução, individualmente, e acrescentou-se a 100 mg de resina flow. Realizou-se a espatulação da mistura até obtenção da homogeneidade. Dessa forma, obteve-se as FRFP contendo

as proporções de 0,10% 0,15% e 0,25% (p/p) de extrato acetato de etila liofilizado de própolis.

[59] A resina comercial Filtek™ Bulk Fill Flow (3M ESPE) foi utilizada como referência, enquanto que 100 mg da resina referência com 10 µL de HEMA foi utilizada como grupo controle do solvente.

[60] Para todas as análises, as FRFP 0,10%, 0,15% e 0,25% (p/p), bem como a resina comercial e comercial aditivada com solvente foram polimerizadas com uso de um fotopolimerizador com luz led de 1200 mW/cm² de potência por 20 segundos. Os corpos de prova foram confeccionados com o auxílio de uma matriz circular com diâmetro de 5,0 mm e espessura de 1,0 mm que foi acomodada entre duas lâminas de vidro. Foram utilizadas fitas de poliéster abaixo e a cima das matrizes em todas as resinas fotopolimerizadas.

[61] Foram utilizados cinco grupos experimentais para os ensaios de caracterização físico-química, mecânica, microbiológica e de citotoxicidade. Os grupos foram: resina comercial de referência (R), resina comercial de referência contendo o solvente HEMA (RS), FRFP 0,10% (FRFP A), FRFP 0,15% (FRFP B) e FRFP 0,25% (FRFP C).

Caracterização físico-química, mecânica e biológica das composições de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com própolis

[62] O grau de conversão de monômero em polímero (%GC) dos grupos (n = 3) foi determinado por FTIR (*Fourier-Transform Infrared spectroscopy*) no modo ATR (*Attenuated Total Reflectance*). As amostras foram analisadas em três momentos distintos: antes da polimerização, logo após a polimerização e 24 horas após a polimerização. As amostras a serem polimerizadas foram dispostas entre duas tiras de poliéster e fotopolimerizadas por 20 segundos. Os espectros foram obtidos em valores de absorbância, com resolução de 4,0 cm⁻¹, acumulados em 64 scans na faixa de 4000 a 600 cm⁻¹. O software utilizado para o tratamento dos dados foi o IRSolution®. O %GC foi caracterizado como:

$$(\%GC) = \left[1 - \left(\frac{\text{área da banda em } 1638\text{ cm}^{-1}}{\text{área da banda em } 1608\text{ cm}^{-1}} \right) \right] \times 100.$$

A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey's ($p < 0,05$).

[63] A resistência flexural dos grupos de análise ($n = 10$) foi determinada conforme preconizado pela ISO 4049. Os corpos de prova foram confeccionados em matriz retangular com 2,0 mm x 2,0 mm x 25,0 mm (espessura x altura x comprimento). A fotopolimerização dos mesmos foi realizada em 6 pontos diferentes: três na face superior e três na face inferior, conforme ISO 4049. Os corpos de prova, referentes a cada grupo separadamente, foram acondicionados em meio aquoso e em frasco escuro por 24 horas a 37°C antes de serem submetidos ao teste. A máquina de testes foi calibrada para atuar com velocidade de 0,75 mm/mim ou razão de carregamento de 50 N/mim. A resistência à flexão (σ) foi definida como:

$$\sigma = \frac{3FL}{2bh^3}; \text{ onde } F \text{ é a carga máxima em Newton, } L \text{ é a distância entre os apoios}$$

externos (20,0 mm), b é a espessura do corpo de prova (2,0 mm) e h é a altura do corpo de prova (2,0 mm). Os resultados de resistência à flexão foram expressos em MPa. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey's ($p < 0,05$).

[64] A microdureza dos grupos de teste foi determinada segundo o método Knoop. Para cada um dos grupos foram confeccionados quatro corpos de prova circulares com 5,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura. Foram realizadas 4 endentações por corpo de prova, com carga de 0,49 N por 15 segundos. O Número de microdureza Knoop (NMK) foi calculado do seguinte

$$\text{modo: } NMK = \frac{F}{C_{LL}}; \text{ onde: } F \text{ é a carga aplicada em Newton, } C \text{ é a constante do}$$

endentador (0,07028) e L é o comprimento medido da diagonal maior da endentação em mm. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey's ($p < 0,05$).

[65] A sorção e solubilidade dos grupos de prova foram determinados segundo os procedimentos preconizados pela ISO 4049. Foram preparados cinco corpos de prova ($n = 5$) circulares de 15,0 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura para cada grupo, em uma matriz metálica posicionada entre duas tiras de poliéster. A fotopolimerização dos corpos de prova foi realizada em 9 pontos diferentes dos mesmos, na superfície superior, conforme ISO 4049. Inicialmente, os corpos de prova polimerizados foram pesados e mantidos em dessecador protegido da luz e a temperatura ambiente por 22 horas. Após esse período, os corpos de prova foram transferidos para um segundo dessecador por mais 2 horas, sob as mesmas condições. Os corpos de prova foram pesados a cada ciclo de 24 horas até que a variabilidade de massa de cada um não ultrapassasse 0,1 mg. Essa massa foi caracterizada como (M_1).

[66] Após caracterização de M_1 os corpos de prova foram medidos com micrômetro digital para calcular a área (mm^2) e o volume (mm^3). Após esse procedimento os corpos de prova foram submergidos em água (10,0 mL por corpo de prova) à 37°C, por 7 dias na posição vertical com auxílio de uma armação, com 3,0 mm de espaçamento entre eles.

[67] Após esse período, os corpos de prova foram removidos da água, lavados com água corrente e secos com papel absorvente. Após um minuto, os mesmos foram pesados e as respectivas massas foram registradas como M_2 . Em seguida, foram realizados ciclos de dessecamento, como descrito anteriormente, até que as massas ficassem estáveis, com variação menor que 0,1 mg, esse último valor será caracterizado como M_3 .

[68] A sorção de água (A_{so}) foi determinada como: $A_{so} = \frac{M_2 - M_3}{V}$. A

solubilidade em água (A_{sl}) foi determinada como: $A_{sl} = \frac{M_1 - M_3}{V}$. A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey's ($p < 0,05$).

[69] A atividade antimicrobiana das Composições de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com própolis foi determinada pelo método de contato direto, conforme Hotaji et al., 2013 (Hotaji, S.T.; Alaghemand, H.; Hamze, F.; Babaki, F.A.; Rajab-Nia, R.; Rezvani, M.B.; Kaviani, M.; Atai, M. Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles. **Dental Materials**. n.29, p.495-505, 2013). Para tal, foram-se preparados três corpos de prova (5,0 mm diâmetro x 1,0 mm espessura) para cada um dos cinco grupos experimentais. Os mesmos foram acondicionados em microtubos previamente esterilizados.

[70] Preparou-se uma solução padronizada do inóculo de *Streptococcus mutans* CCT 3440 a concentração de 1×10^6 UFC/mL. Exatamente 10,0 µL do inóculo foram gotejados na superfície superior de cada corpo de prova de deixados em contato por uma hora em capela de fluxo laminar. Após esse período, foram adicionados 200,0 mL de meio BHI previamente esterilizado a cada um dos microtubos contendo um corpo de prova e a gota de inóculo padronizado. Os microtubos foram mantidos em estufa a 37°C por 24 horas.

[71] Após incubação, exatamente 100,0 µL de cada microtubo foram transferidos para microplaca de 96 poços e, logo após, foram adicionados 20,0 µL de resazurina (150 µg/mL em PBS 50 mM e pH 7,4) em todos os poços para realizar a revelação após novo período de incubação. Após a adição de resazurina, a microplaca foi novamente incubada a 37°C por 2 horas. Cada um dos grupos experimentais foi testado em triplicata (n = 3).

[72] A citotoxicidade dos grupos de testes foi determinada pela avaliação da viabilidade celular de fibroblastos embrionários murinos da linhagem 3T3 pelo método do MTT ([brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)]. O preparo das amostras e a avaliação da viabilidade celular através do método MTT foram realizadas conforme preconizado na ISO 10993.5 e ISO 10993.12.

[73] As células foram utilizadas na 13ª passagem e quando atingiram entre 80 - 90% de confluência. Os fibroblastos (7×10^3 células) foram cultivados em

placas de 96 poços contendo 200 µL de meio DMEM suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), por 24 horas em estufa à 37 °C e em atmosfera controlada com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram expostas a 20 µL do meio condicionado pela liberação prévia das resinas, conforme os grupos de observação: resina comercial, FRFP A, FRFP B, FRFP C, resina comercial + solvente e controle meio de cultura, por 24h em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

[74] Posteriormente, foi adicionado 23 µL/poço de uma solução de MTT a 5mg/mL em PBS. Após o período de incubação de 4 horas a 37°C e em 5% de CO₂, o sobrenadante foi desprezado e, sobre as células foram adicionados 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após 10 minutos a densidade óptica da solução em cada poço foi mensurada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O percentual de viabilidade celular foi obtido em relação à amostra controle e calculado conforme a equação:

$$Viabilidade\ celular(\%) = \frac{Absorbância\ amostra}{absorbância\ controle\ células} \times 100.$$

[75] O preparo prévio dos grupos observados se deu conforme ISO 10993.5 e ISO 10993.12 que padronizam os testes de citotoxicidade in vitro e o preparo de amostras em ensaios de citotoxicidade, respectivamente. Conforme a padronização preconizada, utilizou-se o equivalente a um corpo de prova (5,0 mm de diâmetro x 1,0 mm de espessura) para cada 183,16 µL de meio de cultura nas mesmas condições do cultivo das células por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂, obtendo-se concentração de 3,0 cm³ de resina / mL de meio). O ensaio de citotoxicidade foi realizado em A análise estatística foi realizada por one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey's ($p < 0,05$).

[76] A citotoxicidade dos grupos experimentais também foi determinada em função da relação dose-resposta. Para tal, realizou-se determinação da citotoxicidade do mesmo modo como descrito acima, porém, utilizou-se somente os grupos resina comercial (R), resina comercial solvente (RS) e

FRFP C. As diferentes doses de tratamento, ou seja, as diferentes concentrações de resina em contato com os fibroblastos 3T3 foram determinadas em função da dose especificada na ISO 10993.12 que é de 3 cm³/mL para corpos de prova de até 1,0 mm de espessura. A dose especificada pela ISO em questão foi considerada como 1 e o experimento ocorreu com uso das doses: 0,3; 0,6; 1,0; 1,6 e 2,0. A análise estatística foi realizada por two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni posttests ($p < 0,05$).

EXEMPLOS

[77] EXEMPLO 1 – Grau de conversão (%GC):

[78] Os grupos de FRFP A, FRFP B e FRFP C referentes às composições de resina flow enriquecidas com própolis apresentaram maior grau de conversão que os grupos resina comercial (R) e resina comercial solvente (RS), tanto imediatamente após a fotopolimerização (zero hora) quanto 24 horas após a polimerização. O %GC médio do grupo R foi de 54,34 % e 56,85 % nos tempos de zero e 24 horas, respectivamente. O grupo que apresentou maior %GC foi o FRFP C com 73,03 % 24 horas após a fotopolimerização. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os três grupos de FRFP quando comparados separadamente com o grupo R. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos FRFP A, FRFP B e FRFP C. A Figura 1 representa o Grau de conversão dos grupos analisados imediatamente após a fotopolimerização e 24 horas após a fotopolimerização.

[79] EXEMPLO 2 – Resistência flexural:

[80] Os grupos FRFP A, FRFP B e FRFP C apresentaram resistência flexural de 103,24 MPa, 103,96 MPa e 106,76 MPa, respectivamente. Diante desses dados, todos os grupos enriquecidos com própolis se apresentaram em conformidade com a exigência da ISO 4049 para esse tipo de material que é uma resistência flexural de 50 MPa. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos FRFP A, FRFP B, FRFP C e RS. Houve diferença

significativa entre cada um dos quatro grupos supracitados com o grupo R ($p < 0,05$). A Figura 2 apresenta a determinação da Resistência Flexural.

[81] EXEMPLO 3 – Microdureza Knoop:

[82] Os grupos FRFP A, FRFP B e FRFP C apresentaram número de microdureza Knoop (NMK) de 19,7; 18,46 e 20,13; respectivamente. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos FRFP A, FRFP B, FRFP C e RS. O NMK do grupo R foi de 25,4. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos FRFP A, FRFP B, FRFP C e RS quando comparados separadamente com o grupo R. A Figura 3 representa a caracterização da microdureza Knoop.

[83] EXEMPLO 4 – Sorção e solubilidade:

[84] As formulações FRFP A, FRFP B e FRFP C se mostraram dentro dos parâmetros preconizados pela ISO 4049 em relação à sorção e solubilidade. Os valores obtidos de sorção em água foram de 21,6 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, 22,4 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ e 17,15 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, respectivamente, para FRFP A, FRFP B e FRFP C, abaixo do limite máximo de 40 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ preconizado. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos supracitados, conforme representado pela figura 4. Os valores de solubilidade em água foram de 4,2 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, 3,6 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ e 4,0 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$, respectivamente para FRFP A, FRFP B e FRFP C, abaixo do limite máximo de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos supracitados, conforme representado pela figura 5.

[85] EXEMPLO 5 – Atividade antimicrobiana:

[86] Os grupos FRFP A, FRFP B e FRFP C apresentaram atividade antimicrobiana frente à cepa de *Streptococcus mutans*, uma vez que foi observada a inibição do crescimento bacteriano após contato superficial desses grupos com o inóculo padronizado. OS grupos R e RS não apresentaram atividade antimicrobiana frente à mesma cepa supracitada, uma vez que não foi observado inibição do crescimento bacteriano após o contato superficial desses grupos com o inóculo padronizado. A Figura 6 representa o resultado do teste de atividade antimicrobiana.

[87] EXEMPLO 6 – Citotoxicidade:

[88] Nenhum dos grupos se apresentou citotóxico aos fibroblastos, conforme ISO 10993.5, visto que nenhum deles apresentou percentual de morte celular $\geq 20\%$. As células tratadas com o grupo FRFP C apresentaram viabilidade celular de 91,06%, enquanto que as células tratadas com os grupos R, FRFP A, FRFP B e RS apresentaram viabilidade celular de 81,20%; 82,05%; 82,13% e 88,36%, respectivamente. As células não apresentaram alterações morfológicas ou presença de grânulos citoplasmáticos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. A Figura 7 representa o resultado de citotoxicidade para os grupos experimentais.

[89] Em relação ao ensaio de citotoxicidade dose-resposta, nenhum dos grupos analisados (R, RS e FRFP C) apresentou citotoxicidade em fibroblastos, conforme ISO 10993.5. A exposição das células ao grupo FRFP C sugeriu um aumento da proliferação celular, quando se compara os grupos de células tratadas com as amostras R e RS e o grupo de células controle (expostas apenas ao meio, linha tracejada), indicando possível atividade cicatrizante. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as cinco doses usadas dentro de cada grupo. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo FRFP C e os grupos R e RS. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos R e RS. A Figura 8 representa o resultado do ensaio de citotoxicidade dose-resposta para os grupos analisados.

VANTAGENS DA PATENTE

[90] A incorporação de derivados de própolis à resina dentária composta fotopolimerizável levou à produção de um material odontológico restaurador com as seguintes vantagens:

[91] Superior grau de conversão de monômeros em polímero, se comparado ao produto comercial.

[92] Presença de características mecânicas que satisfazem a ISO 4049 e que são semelhantes às características do produto comercial.

- [93] Presença de atividade antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*.
- [94] Proporciona proliferação de fibroblastos murinhos 3T3.
- [95] As resinas aditivadas com própolis podem ser utilizadas como material restaurador em capeamento pulpar indireto, capeamento pulpar direto em preparos cavitários, cavidades profundas e restaurações provisórias, como base e/ou liner sob restaurações de resina composta.

REIVINDICAÇÕES

- 1- Composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha **caracterizada por** compreender monômeros derivados de metacrilatos, cerâmica silanizada tratada (50 a 60%), fluoreto de itérbio (1 a 10%), canforoquinona (<1%), etil-4-dimetilaminobenzoato (<1%) e extrato fracionado acetato de etila proveniente do extrato de própolis vermelha.
- 2- Composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha, de acordo com reivindicação 1, **caracterizada pelos** derivados de metacrilatos consistirem em 2-hidroxietilmetacrilato (0,01%), dimetacrilatos de uretano (10 a 20%), dimetacrilato de bisfenol A etoxilado (1 a 10%), dimetacrilato de glicidila bisfenol A (1 a 10%), dimetacrilatos de trietilenoglicol (<1%).
- 3- Composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha, de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizada por** compreender faixa de concentração entre de 0,001 a 3%, e preferencialmente entre 0,10% e 0,25% de extrato fracionado acetato de etila liofilizado a partir do extrato de própolis vermelha.
- 4- Composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 **caracterizada por** apresentar grau de conversão de monômeros em polímeros de 73% após 24h, superior à resina controle.
- 5- Composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 **caracterizada por** apresentar resistência flexural superior a 100 MPa .
- 6- Composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3 **caracterizada por** apresentar sorção de água inferior à 40 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ e solubilidade abaixo do limite máximo de 7,5 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$.

- 7- Composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizada por** apresentar propriedade cicatrizante e ausência de citotoxicidade.
- 8- Composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizada por** apresentar propriedades antibacterianas contra *Streptococcus mutans* CCT 3440.
- 9- Uso de composição de resina dentária composta fotopolimerizável enriquecida com extrato de própolis vermelha, definida conforme as reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado por ser** nas preparações de resinas polimerizáveis para tratamento odontológico de restauração dentária resinosa.

DESENHOS

Figura 01

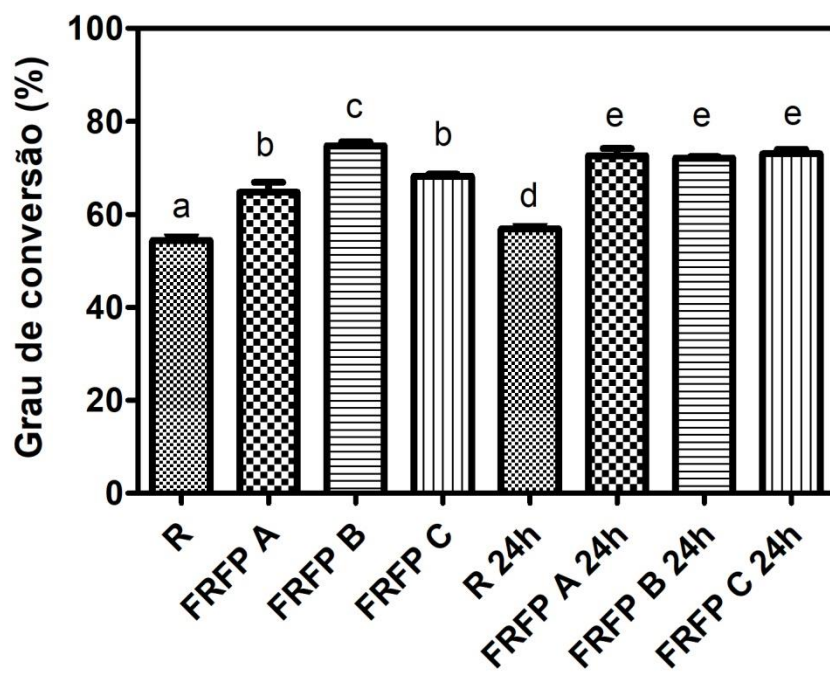


Figura 02

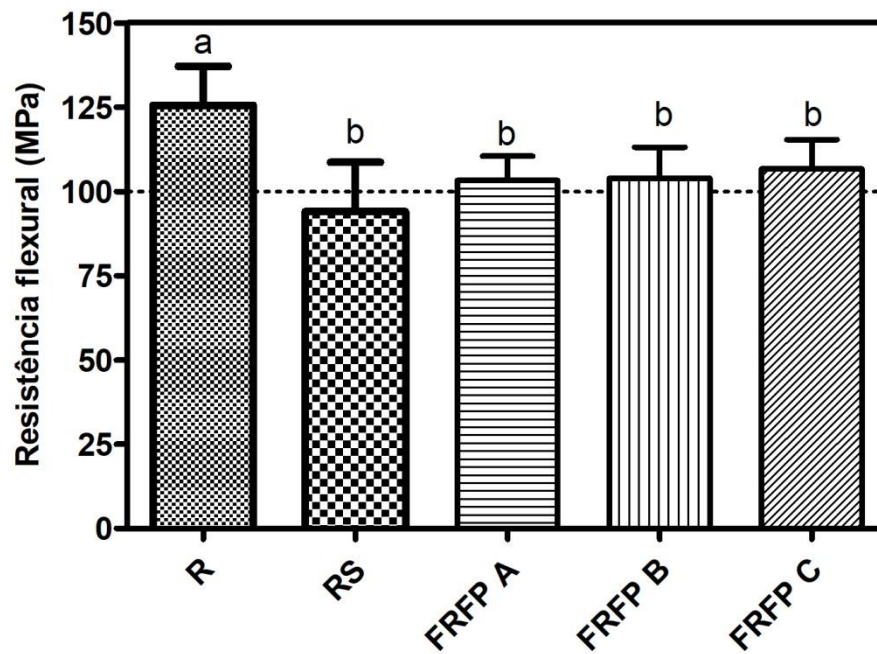


Figura 03

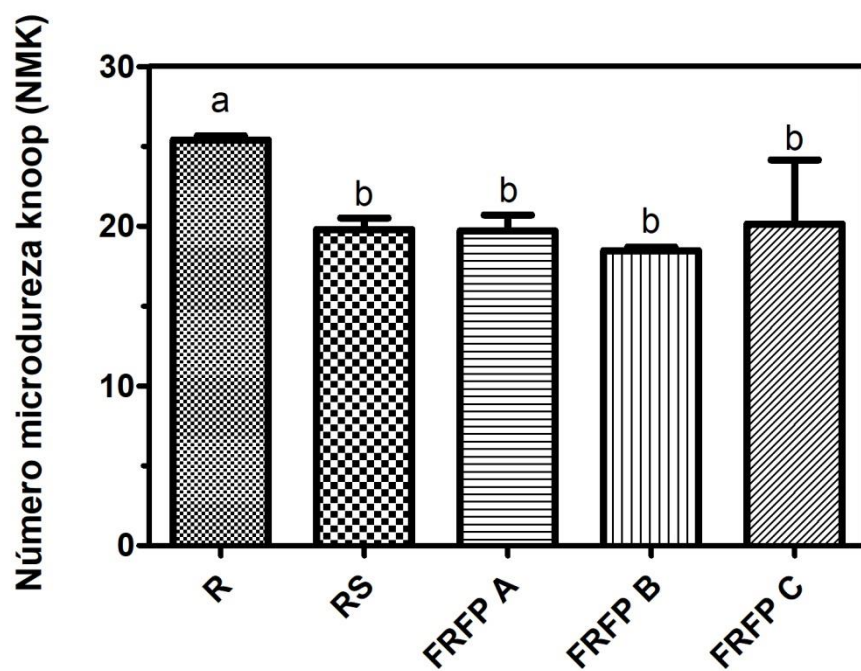


Figura 04

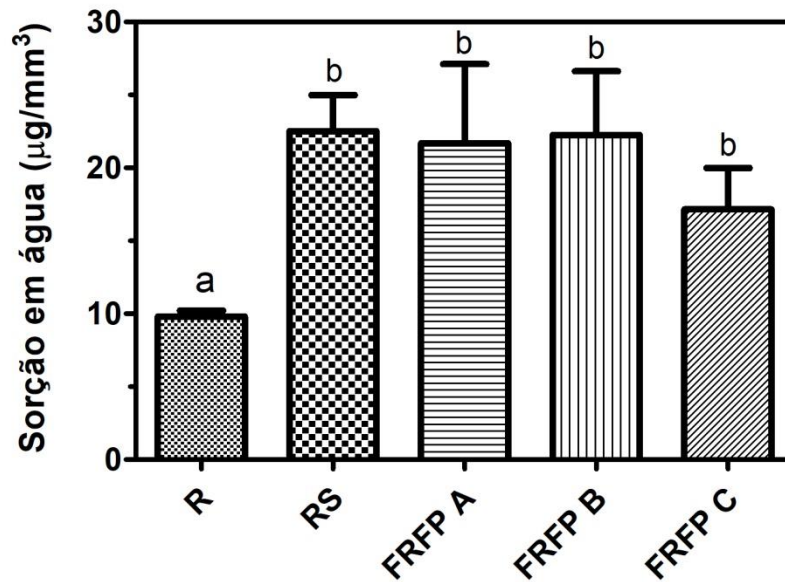


Figura 05

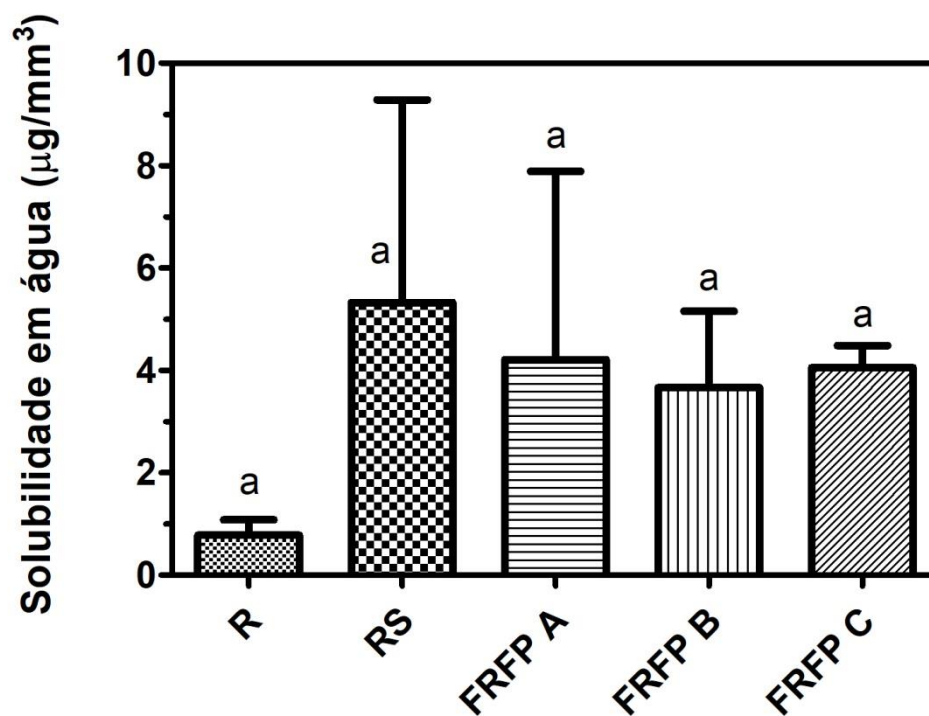


Figura 06

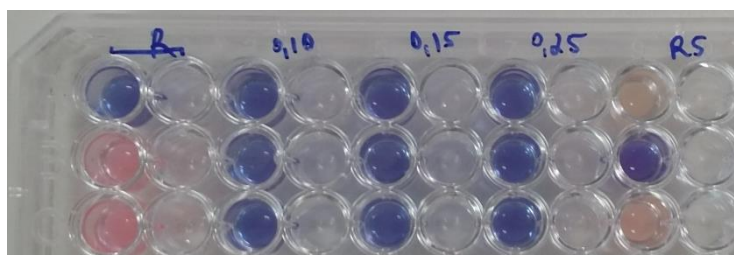


Figura 07

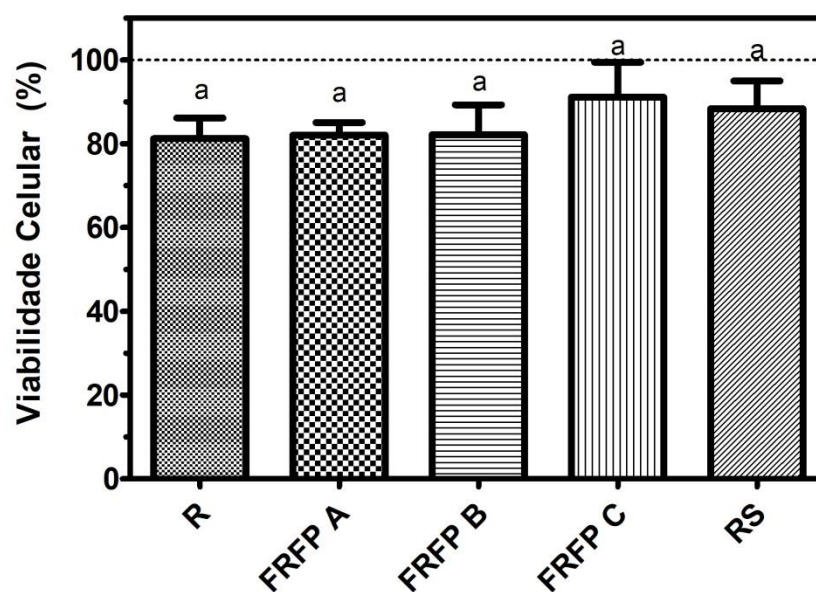


Figura 08

