



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO DE VERNIZ ODONTOLÓGICO À BASE DE PRÓPOLIS
VERMELHA BRASILEIRA PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA CÁRIE
DENTÁRIA**

LUCAS ALISON DO NASCIMENTO SANTOS

RECIFE

2024

Lucas Alison do Nascimento Santos

**DESENVOLVIMENTO DE VERNIZ ODONTOLÓGICO À BASE DE PRÓPOLIS
VERMELHA BRASILEIRA PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA CÁRIE
DENTÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de mestre
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosali Maria
Ferreira da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Arnaldo de França
Caldas Júnior

RECIFE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santos, Lucas Alison do Nascimento.

Desenvolvimento de Verniz Odontológico à base de própolis vermelha brasileira para tratamento e prevenção da cárie dentária / Lucas Alison do Nascimento Santos. - Recife, 2024. 78f.: il.

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Rosali Maria Ferreira da Silva.

Coorientação: Arnaldo de França Caldas Júnior.

Inclui referências e anexos.

1. Desenvolvimento Farmacotécnico; 2. Produto Natural; 3. Estudo de Validação; 4. Própolis Vermelha. I. Silva, Rosali Maria Ferreira da. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Rosali Maria Ferreira da Silva (Presidente e Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Maria Joanellys dos Santos Lima (Membro Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Iranildo José da Cruz Filho (Membro Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

À minha família querida, a quem devo todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A frase escrita na epígrafe desta obra foi usada pelo poeta para representar o momento de catábase do seu herói. Assim como serviu de alerta para Enéias, essa lição traduz o sentimento que permeou todo o período de construção do presente trabalho: "não cedas ao mal, mas resiste contra ele com ainda mais ousadia". O que será apresentado nas próximas páginas é fruto de um dos períodos mais turbulentos da minha vida. Nesse período, muitos males se levantaram, de forma que o que será mostrado a seguir é resultado de resistência ao mal. Essa resistência só foi possível graças à presença e assistência de várias pessoas, algumas das quais preciso aqui citar nominalmente.

Uso agora esse espaço, para expressar minha sincera gratidão aos que me ajudaram a vencer com ousadia, e a construir o momento de anábase, que hoje supera não apenas o que foi projetado, mas também o impensado.

Agradeço ao meu Deus, por sua fidelidade, cuidado e provisão. Pois, como está escrito que "no dia da adversidade me esconderá no seu pavilhão" (Salmo 27.5), assim ele o fez. Por ele vivo e para ele são todas as obras das minhas mãos.

Agradeço à minha família, a quem dedico esse trabalho, pois apesar de, até o presente momento, não haver outros membros com títulos acadêmicos, eles foram apoiadores e incentivadores de todos os passos que trilhei até aqui. Aos meus avós, Neide Maria e Luiz Gabriel, que têm cuidado de mim desde tenra idade. Sem eles não seria hoje quem sou e jamais poderia chegar onde cheguei. A eles devo tudo o que tenho. Aos meus pais, Ana Maria e William César, aos meus irmãos, primos e tios, por tudo o que fizeram para me apoiar e levantar nos momentos de necessidade. À minha noiva, Sara Carvalho, que tem me ajudado em todos os momentos desde que chegou para iluminar meus dias. Sua presença tem tornado minha vida cada dia mais leve e feliz.

À minha orientadora, professora Rosali Silva, pelo cuidado que me prestou nos momentos de dificuldade, e por todo o carinho com que trata seus orientandos. Creio que aqui minha voz se junta aos demais alunos, passados e presentes, ao afirmar que ela é um exemplo a ser seguido em tudo o que faz.

Aos colegas de pesquisa Ana Vitória, Amanda Correia, Cristiane da Silva e Kaio Freitas, que sempre estiveram ao meu lado incentivando e ajudando. Às alunas de iniciação científica, Isa Souza e Áquila Mendonça, que estiveram desenvolvendo partes desse trabalho ao meu lado, e sem as quais muito do que foi feito não seria possível. A todos os outros colegas pesquisadores do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos – LTM (UFPE), que

sempre me apoiaram nos momentos de necessidade. Ao professor Pedro Rolim, que sempre manteve as portas do LTM abertas para mim. À professora Larissa Rolim (UNIVASF), por ter realizado parte das análises experimentais desse trabalho. Obrigado por tudo quanto contribuíram para a construção do que foi realizado.

À colega Suseanne Kedma, por todo o auxílio prestado na construção e interpretação dos dados estatísticos apresentados nesse trabalho.

Ao meu coorientador, professor Arnaldo Caldas e a Paulo Barros, meu colega de projeto. A eles devo todo o conhecimento da área da odontologia que foi usado nesse trabalho. Justos pudemos construir o conhecimento numa área totalmente nova e desafiadora para mim.

Aos membros da banca examinadora, professora Joanellys Lima e professor Iranildo Filho, por haverem tão prontamente aceitado contribuir com meu trabalho, acrescentando a ele suas expertises.

À Fundação de Amparo a Ciência do Estado de Pernambuco, pelo apoio financeiro concedido, sem o qual esse trabalho não seria possível.

As mãos de todos esses citados, e de muitos outros não citados, construíram junto com as minhas o que será apresentado nas próximas páginas, esse feito também é realização de todos a quem aqui expresso meu muito obrigado.

Tu ne cede malis, sed contra audentior ito.

(Vergilius, Séc. I a.C.)

RESUMO

A cárie é uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo. Para controle e prevenção da doença, é importante ampliar as opções de tratamento. Os diversos tipos de própolis têm sido estudados como alternativas. Estudos têm demonstrado que a própolis vermelha brasileira tem importante atividade contra *Streptococcus mutans*, além de atividade anti-inflamatória. Para a efetiva utilização dessa alternativa, faz-se necessário o desenvolvimento de formas farmacêuticas que viabilizem o seu manejo e aplicação. Esse estudo objetiva produzir um verniz dentário à base da própolis vermelha, para posterior aplicação em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Foram realizados testes qualitativos para identificação da presença de compostos de interesse na prospecção fitoquímica. Também foram realizados testes quantitativos por CLAE-DAD. O método para doseamento de compostos fenólicos foi desenvolvido a partir do já consagrado método de Folin-Ciocalteu e foi então validado de acordo com os parâmetros da RDC 166/2017 da ANVISA. O verniz odontológico foi formulado utilizando uma base de etilcelulose a 15% em etanol absoluto, à qual foi incorporado o extrato de própolis nas concentrações de 5%, 10% e 15%. Cerca de 20 lotes de bancada de 2g foram preparados para os testes de compatibilidade dos componentes da formulação.

A secagem do extrato por liofilização apresentou rendimento de 22%. A prospecção fitoquímica, utilizando métodos qualitativos, e os ensaios de CLAE-DAD do extrato processado apresentaram a presença de flavonoides, grupo apontado como responsável pela atividade farmacológica desejada em diversos estudos. O método de Folin-Ciocalteu apresentou resultados dentro dos padrões necessários indicados na literatura para ser considerado validado, com $R^2 = 0,997$ para os ensaios de linearidade, limite de detecção igual a $10,725 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e limite de quantificação igual a $32,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O verniz final formulado se apresenta como um líquido viscoso, de coloração vermelha intensa e brilhante, com densidade relativa de 0,908, pH de 5,5, e viscosidade de 136,1 cSt a 10 rpm. A incorporação da PVB no verniz base se mostrou exitosa em todas as concentrações testadas.

Esse estudo concluiu que o verniz produzido à base de Própolis Vermelha Brasileira apresentou características organolépticas e físico-químicas consistentes e dentro dos padrões de qualidade encontrados para produtos já utilizados na prática clínica, o que demonstra possibilidade de ser utilizado como uma futura alternativa terapêutica para o tratamento e prevenção da cárie.

Palavras-chave: Desenvolvimento farmacotécnico. Produto natural. Estudo de validação.

ABSTRACT

Dental caries is one of the most common chronic diseases worldwide. For effective control and prevention, it is essential to expand treatment options. Various types of propolis have been studied as potential alternatives. Studies have shown that Brazilian red propolis exhibits significant activity against *Streptococcus mutans* and possesses anti-inflammatory properties. The development of pharmaceutical forms that facilitate its handling and application is necessary to enable the effective use of this alternative. This study aims to produce a dental varnish based on red propolis for subsequent application in *in vitro* and *in vivo* studies.

Qualitative tests were conducted to identify the presence of compounds of interest in the phytochemical analysis. Additionally, quantitative tests were performed using HPLC-DAD. The method for quantifying phenolic compounds was developed based on the established Folin-Ciocalteu method and was then validated according to the parameters of ANVISA's RDC 166/2017. The dental varnish was formulated using a base of 15% ethyl cellulose in absolute ethanol, into which the propolis extract was incorporated at concentrations of 5%, 10%, and 15%. Approximately 20 bench-scale batches of 2g each were prepared for compatibility testing of the formulation components.

Freeze-drying the extract yielded 22%. Phytochemical analysis using qualitative methods and HPLC-DAD assays of the processed extract indicated the presence of flavonoids, a group identified in various studies as being responsible for the desired pharmacological activity. The Folin-Ciocalteu method produced results within the necessary standards indicated in the literature to be considered validated, with $R^2 = 0.997$ for linearity assays, a detection limit of $10.725 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and a quantification limit of $32.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The final varnish formulated is a viscous liquid with an intense, bright red color, a relative density of 0.908, a pH of 5.5, and a viscosity of 136.1 cSt at 10 rpm. The incorporation of Brazilian red propolis into the base varnish proved successful at all tested concentrations.

This study concluded that the varnish produced with Brazilian Red Propolis exhibited consistent organoleptic and physicochemical characteristics within the quality standards found in products already used in clinical practice, demonstrating its potential as a future therapeutic alternative for caries treatment and prevention.

Keywords: Pharmaceutical development. Natural product. Validation study.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Representação esquemática do processo de produção do verniz odontológico.

Figura 02 – Pesa-filtros contendo resíduo seco do extrato após a secagem.

Figura 03 - Resultado positivo para a presença de cumarinas, indicado pela fluorescência.

Figura 04 - Formação de FeCl_3 , indicando a presença de compostos fenólicos e taninos.

Figura 05 - Cromatograma do extrato PVB em 280 nm.

Figura 06 - Perfil dos espectros no UV obtidos pelo detector DAD para amostras analisadas.

Figura 07 – Testes de interação entre NaF e outros componentes da formulação.

Figura 08 – Testes de interação entre NaF a 1% e 4% na base polimérica do verniz.

Figura 09 – Incorporação do extrato líquido de PVB à base do verniz.

Figura 10 – Apresentação final do verniz formulado.

Gráfico 01 – Curva padrão de ácido gálico / ensaio 1.1.

Gráfico 02 – Curva padrão de ácido gálico / ensaio 1.2.

Gráfico 03 – Curva padrão de ácido gálico / ensaio 2.

Gráfico 04 – Curva padrão de ácido gálico / ensaio 3.

Gráfico 05 – Curva de linearidade da amostra / ensaio 1.

Gráfico 06 – Curva de linearidade da amostra / ensaio 2.

Gráfico 07 – Curva de linearidade da amostra / ensaio 3.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 01 – 13 tipos de própolis brasileira relatados na literatura.

Quadro 02 – Cores correspondentes à presença de constituintes no analito.

Quadro 03 - Cores correspondentes à presença de constituintes no analito.

Tabela 01 - Sistema gradiente de fase móvel utilizado para determinação qualitativa em CLAE-DAD.

Tabela 02 - Concentrações das SQRs utilizadas no desenvolvimento do método.

Tabela 03 – Valores utilizados para a construção da curva de ácido gálico.

Tabela 04 – Concentrações usadas para a formulação do verniz odontológico.

Tabela 05 – Valores de pH do extrato líquido.

Tabela 06 – Valores utilizados na determinação da densidade.

Tabela 07 – Valores utilizados para determinação de resíduo seco.

Tabela 08 – Ausência ou presença de constituintes encontradas nos testes qualitativos.

Tabela 09 - Resultados obtidos após análises de SQR pelo método cromatográfico por CLAE-DAD.

Tabela 10 – Absorbâncias de ácido gálico usadas para a curva padrão / ensaio 1.1.

Tabela 11 – Absorbâncias de ácido gálico usadas para a curva padrão / ensaio 2.

Tabela 12 – Absorbâncias de ácido gálico usadas para a curva padrão / ensaio 3.

Tabela 13 – Absorbâncias da amostra para linearidade / ensaio 1.

Tabela 14 – Absorbâncias da amostra para linearidade / ensaio 2.

Tabela 15 – Absorbâncias da amostra para linearidade / ensaio 3.

Tabela 16 – Desvio padrão do intercepto com o eixo y das 3 curvas de calibração.

Tabela 17 – Comparação de dados das curvas construídas para seletividade.

Tabela 18 – Resultados obtidos para o teste de precisão.

Tabela 19 – Valores das médias das absorbâncias encontradas.

Tabela 20 – Resultado do teste de ANOVA para robustez.

Tabela 21 – Formação de precipitado nas concentrações testadas para a formulação do verniz odontológico.

Tabela 22 – Valores de viscosidade dinâmica do verniz.

Tabela 23 – Valores de viscosidade cinemática do verniz.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS – Absorbância.

a.C. – Antes de Cristo.

Ác. Gálico – Ácido Gálico.

AL – Estado brasileiro de Alagoas.

ANOVA – Análise de Variância.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CAFMA - Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos.

CLAE-DAD - Cromatografia Líquida De Alta Eficiência, Acoplada A Detector De Arranjo De Diodo.

CMD – Concentração Média Determinada.

DP – Desvio Padrão.

DPR – Desvio Padrão Relativo.

EAG – Equivalente de Ácido Gálico.

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético.

EUA – Estados Unidos da América.

FOTI – Transiluminação por fibra ótica.

gl – Gruas de Liberdade.

IC – Coeficiente Angular.

INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual.

LD – Limite de Detecção.

LQ – Limite de Quantificação.

MQ – Quadrado Médio.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

PVB – Própolis Vermelha Brasileira.

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada.

RFC – Reagente Folin-Ciocalteu.

rpm – Rotações por Minuto.

SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária.

Séc. – Século.

SISGEN - Sistema Nacional De Gestão Do Patrimônio Genético E Do Conhecimento Tradicional Associado.

SQ – Soma dos Quadrados.

SQR – Substância Química de Referência.

UV – Ultravioleta.

WSL – *White Spot Lesion*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. OBJETIVOS.....	19
1.1.1 Objetivo Geral.....	19
1.1.2 Objetivos Específicos.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 CÁRIE.....	20
2.2 VERNIZ FLUORETADO.....	22
2.3 PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO EXTRATO DA PRÓPOLIS VERMELHA	26
3.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO EXTRATO OBTIDO.....	27
3.2.1 Determinação do pH.....	27
3.2.2 Determinação da Densidade de Massa.....	27
3.2.3 Determinação de Resíduo Seco dos Extratos.....	27
3.3.1 Teste para Cumarinas.....	28
3.3.2 Teste para Fenóis e Taninos.....	28
3.3.3 Teste para Antocianinas e Antocianidinas e Flavonóides.....	28
3.3.4 Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavonas.....	29

3.3.5 Teste para Esteroides e Triterpenoides (Lieberman-Burchard).....	30
3.3.6 Teste para saponinas.....	30
3.4 ANÁLISES QUANTITATIVAS.....	31
3.4.1 Análises por CLAE-DAD.....	31
3.4.2 Análise dos padrões analíticos.....	32
3.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	33
3.5.1 Construção da Curva Padrão de Ácido Gálico.....	34
3.5.2 Validação da Metodologia Analítica.....	35
3.5.2.1 Linearidade.....	35
3.5.2.2 Limite de Detecção.....	35
3.5.2.3 Seletividade.....	36
3.5.2.4 Precisão.....	36
3.5.2.5 Robustez.....	37
3.6 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO VERNIZ DENTÁRIO.....	37
3.7 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DOS LOTES DE BANCADA...40	
3.7.1 pH do Verniz.....	40
3.7.2 Densidade do Verniz.....	40
3.7.3 Viscosidade do Verniz.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41

4.1 DETERMINAÇÃO DO PH.....	41
4.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE MASSA.....	42
4.3 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO DO EXTRATO LÍQUIDO.....	42
4.4 ANÁLISES QUALITATIVAS.....	44
4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	46
4.5.1 Análises por CLAE-DAD.....	46
4.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	49
4.6.1 Curva Padrão de Ácido Gálico.....	49
4.6.2 Linearidade.....	53
4.6.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	57
4.6.4 Seletividade.....	58
4.6.5 Precisão.....	59
4.6.6 Robustez.....	59
4.7 FORMULAÇÃO DO VERNIZ ODONTOLÓGICO.....	61
5. CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO COM RESULTADOS PARCIAIS EM MAIO DE 2024. REVISTA QUALIS A4.	77
ANEXO B – COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISGEN.....	78

1. INTRODUÇÃO

Própolis é uma mistura resinosa complexa produzida por abelhas, a partir de secreções e exudatos de diferentes partes de plantas. Sua composição química e propriedades variam, de acordo com sua origem botânica e geográfica (Irigoiti *et al.*, 2021). O material é utilizado pelas abelhas para fechar pequenos buracos abertos na colmeia, prevenindo a entrada de insetos e reduzindo a proliferação de fungos e bactérias (Mendez-Pfeiffer *et al.*, 2021). No Brasil, desde os anos 2000, foram caracterizados e classificados 12 tipos de própolis, de acordo com sua composição química e atividade biológica (Park *et al.*, 2004).

Um décimo terceiro tipo de própolis foi caracterizado em 2007. Conhecido como própolis vermelha, devido à sua forte cor característica, esse tipo é comumente encontrado nas regiões de mangue do nordeste brasileiro. É produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* com a seiva de *Dalbergia ecastophyllum*, e tem sido estudado por suas diversas atividades terapêuticas pelas mais diversas áreas da saúde desde então (Silva *et al.*, 2008).

Além de sua importante atividade antimicrobiana, a própolis vermelha tem demonstrado atividades antifúngica, antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-ulcerativas e antitumorais, que se devem principalmente aos compostos fenólicos, especialmente flavonoides e terpenos (Frezza *et al.*, 2013; Rufatto *et al.*, 2017).

Apesar de já bastante difundido na medicina, o uso de produtos naturais na odontologia ainda é relativamente recente. A prática foi regulamentada pelo Conselho Federal de Odontologia em 2008, pela Resolução nº 082/2008. Desde então, diversos estudos têm sido realizados para desenvolvimento de produtos relacionados à saúde bucal, a fim de encontrar alternativas menos onerosas e menos invasivas para tratamentos de doenças relacionadas, especialmente a cárie (Domingues *et al.*, 2021).

A cárie é uma das doenças crônicas mais comuns em todo o mundo. Trata-se de uma infecção provocada pelo desequilíbrio ecológico e metabólico do biofilme dentário, devido à frequente exposição a alimentos ricos em carboidratos fermentáveis, levando a uma desmineralização da superfície do dente (Batista *et al.*, 2020). Um amplo espectro de bactérias tem sido descrito na literatura como responsável pelo desenvolvimento de cáries. *Streptococcus mutans* é apontado como o mais importante micro-organismo cariogênico (Zulhendri *et al.*, 2021).

A própolis vermelha brasileira tem sido estudada em odontologia e, devido às suas diversas atividades farmacológicas, empregada em produtos de higiene oral. Bueno-Silva *et*

al. (2015) demonstraram uma ação promissora da própolis vermelha brasileira na inibição do desenvolvimento da cárie *in vivo* em roedores. Diante desse potencial, o tratamento fitoterápico da cárie utilizando a própolis vermelha se apresenta como uma importante alternativa.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente metade da população mundial é afetada por cáries dentárias, o que faz dessa a doença mais prevalente em todo o mundo. A maior parte dessa população está concentrada em países de renda média, onde é grande o consumo de açúcares. O sistema de saúde desses países é constantemente desafiado a desenvolver estratégias para prevenção e tratamento dessa doença (WHO, 2017; WHO, 2022).

No Brasil, o índice de população acometida pela cárie é diretamente proporcional à idade. Em crianças de 5 anos, 53,4% da população apresenta cárie na dentição decídua. Aos 12 anos, 56,5% apresenta a mesma condição na dentição permanente. Nas populações de 15 a 19, 33 a 44 e 65 a 74 anos, os índices são de 76,1 %, 99,1% e 99,8 %, respectivamente (Brasil, 2012).

Flúor e Clorexidina são os agentes mais comumente utilizados para o manejo da cárie. Entretanto, algumas cepas de bactérias têm apresentado resistência ao flúor, incluindo *S. mutans*. Além disso, o uso excessivo de flúor em crianças que ainda estão desenvolvendo a dentição permanente, pode levar à formação de estrias brancas nos dentes. O uso de clorexidina demanda cuidados devido ao conhecido efeito de descoloração dos dentes (Amissah *et al.*, 2021).

Nesse contexto, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas pode facilitar o acesso e a adesão ao tratamento e prevenção da cárie. A produção de formas farmacêuticas utilizando a própolis vermelha brasileira constitui um importante passo no desenvolvimento de alternativas terapêutica para tratamento e prevenção da cárie dentária.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver farmacotecnicamente um verniz dentário à base do extrato de própolis vermelha, como alternativa terapêutica para tratamento e prevenção da cárie dentária.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter e processar o extrato da própolis vermelha;

- Determinar características físico-químicas do extrato obtido;
- Formular o verniz dentário;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para doseamento de compostos fenólicos;
- Realizar testes de controle de qualidade físico-químico dos lotes de bancada.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÁRIE

Em setembro de 2016, uma nova definição para saúde bucal foi aprovada pela FDI *World Dental Federation*. Segundo o documento, “A saúde bucal é multifacetada e inclui a capacidade de falar, sorrir, cheirar, saborear, tocar, mastigar, engolir e transmitir uma variedade de emoções por meio de expressões faciais com confiança e sem dor, desconforto ou doenças no complexo craniofacial” (Glick *et al.*, 2016).

As doenças bucais são as doenças não transmissíveis mais comuns em todo o mundo, afetando quase metade da população (45% ou 3,5 bilhões de pessoas) ao longo de toda a vida, desde a infância até a velhice. A cárie apresenta-se como uma das mais importantes dessas doenças, afetando 2,3 bilhões de adultos (dentição permanente) e 530 milhões de crianças (dentição decídua) (WHO, 2022).

A cárie representa uma grande preocupação de saúde pública em todo o mundo. É considerada a necessidade de saúde mais difundida e não atendida, principalmente entre as crianças. A doença representa um problema significativo, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (Shrestha *et al.*, 2021).

Muitos fatores são considerados responsáveis pela iniciação e progressão da doença, dentre eles podem ser citados dieta rica em açúcares (especialmente sacarose) e fatores socioeconômicos, incluindo nível de escolaridade. A busca por micro-organismos envolvidos na iniciação, desenvolvimento e progressão da doença tem sido um foco primário para a compreensão da etiologia da cárie dentária. Diversos estudos sugerem que, sob certas condições, a microbiota da cavidade oral pode sofrer um desequilíbrio homeostático, favorecendo a proliferação de micro-organismos, que promovem um estado cariogênico. Dentre esses micro-organismos, os mais comumente citados são *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp* e *Actinomyces spp* (Momeni *et al.*, 2024; Shrestha *et al.*, 2021).

Além de aumentar a produção de ácido, *S. mutans* também facilita a formação de biofilmes dentários compostos por uma matriz de exopolissacarídeos, que são mais resistentes à deterioração pelo ácido e mais resistentes à ação de antibióticos e à resposta imunológica (Alejandra *et al.*, 2020).

A hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ é o principal componente mineral do esmalte dentário. Nos estágios iniciais da cárie, o mineral é lentamente dissolvido pelos ácidos orgânicos produzidos por bactérias orais a partir dos carboidratos dos alimentos. A dissolução do esmalte é representada pela equação abaixo, onde a hidroxiapatita reage com os íons hidrogênio:



Quando os níveis de pH baixam para valores iguais ou menores que 5, o processo reversível da equação é desbalanceado para a direita. Esse processo é chamado de desmineralização e, conforme ele ocorre, o material do esmalte dentário é perdido e são formadas cavidades, à medida que as microlesões vão se expandindo e aglutinando (Fabregas, 2014 *et al.*, Shellis *et al.*, 2004).

A evolução da desmineralização contínua leva a uma lesão sem cavitação chamada lesão de mancha branca (*white spot lesion* – WSL), o que caracteriza a cárie primária. A maioria das lesões de cárie primária é reversível, porém, se não tratadas, progridem para lesões cavitadas, que geralmente necessitam de intervenção restauradora e são irreversíveis. A evolução ainda pode levar a lesões moderadas, quando o terço interno da dentina ainda não foi lesado, ou lesões avançadas, quando as lesões se estenderam até o terço interno da dentina (Motallaei *et al.*, 2021).

A dentina é estruturalmente diferente do esmalte e, portanto, a evolução das lesões ocorre de modo distinto. A estrutura da dentina é formada por microtúbulos e possui menos minerais. Pelos microtúbulos, a entrada de bactéria e a saída de minerais é facilitada causando a desmineralização progressiva do corpo da lesão no esmalte. Consequentemente, o esmalte superficial enfraquece e, eventualmente, colapsa (Warreth *et al.*, 2023).

O diagnóstico da doença é feito através de exame clínico de forma tátil e visual. Na maioria das vezes, também é usada a radiografia como suporte, assim como transiluminação por fibra óptica (FOTI), a condutividade elétrica e a fluorescência a laser (Gomez, 2015; Kocak *et al.*, 2020; Momoi *et al.*, 2012).

2.2 VERNIZ FLUORETADO

O flúor é amplamente utilizado na odontologia há mais de 80 anos e é reconhecidamente responsável pelo declínio da prevalência de cáries em todo o mundo. Quando presente de forma sustentada e em baixas concentrações (na ordem de ppm ou mais baixa) na cavidade oral, é capaz de adsorver à superfície dos cristais de apatita, formando a fluorapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}]$, freando o processo de desmineralização e acelerando a remineralização. A introdução do flúor no mineral, torna o esmalte mais resistente a futuros desafios ácidos. Além disso, os íons fluoreto interferem na produção de ácidos pelas bactérias cariogênicas, inibindo, assim, sua atividade cariogênica (Buzalaf *et al.*, 2011).

Diversos sistemas são utilizados na odontologia para a aplicação de flúor, estando disponíveis por duas vias: oral (sistêmica) e bucal (tópica). Os sistemas de aplicação de flúor tópico estão disponíveis para uso domiciliar, com baixa concentração de flúor, ou para uso profissional, com alta concentração de flúor (Baik *et al.*, 2021).

A administração oral do flúor é feita através da ingestão de água fluoretada, da dieta ou de suplementos de flúor. Uma vez ingerido, o fluoreto se integra aos elementos e à estrutura dos dentes durante sua formação, antes da erupção. Os dentes novos já nascem, portanto, com a fluorapatita na sua formação (Marinho *et al.*, 2013).

Os vernizes fluoretados são considerados seguros e bem aceitos pelos pacientes. Seu uso geralmente é direcionado a crianças com alto risco de cárie, já que essa intervenção é considerada complementar ao uso de dentrífcios fluoretados e água fluoretada (Sousa *et al.*, 2019).

Em 1964, um pesquisador alemão chamado Schmidt, desenvolveu um verniz fluoretado para aplicação na prevenção da cárie. O objetivo dessa forma de aplicação é aumentar a aderência do flúor ao esmalte dentário, aumentando o tempo de exposição (Baik *et al.*, 2021).

Há mais de 30 vernizes contendo fluoreto disponíveis no mercado. Todos esses podem ser classificados em duas categorias: os que usam fluoreto de sódio (NaF) e que foram desenvolvidos na década de 1960, e os que usam difluorosilano (SiH_2F_2) desenvolvidos em 1975 (Baik *et al.*, 2021).

A aplicação e espalhamento de vernizes na superfície dos dentes geralmente é feita com hastes de algodão, pequenos pincéis ou seringas. É recomendável a aplicação de vernizes fluoretados, duas a três vezes por ano. Os vernizes fluoretados, porém, podem alterar

temporariamente a coloração dos dentes, e a reaplicação constante pode acabar por torná-la permanente (Marinho *et al.*, 2013).

A colofônia é um componente resinoso, presente na maioria dos vernizes disponíveis no mercado. Apesar de incomum, alguns indivíduos possuem sensibilidade à colofônia e podem desenvolver reações alérgicas aos vernizes de fluoreto. A exposição continuada à colofônia também pode levar ao desenvolvimento de estomatites (Isaksson *et al.*, 1993).

A fluorose é uma condição clínica caracterizada pela hipomineralização do esmalte, devido à exposição crônica ao flúor durante o desenvolvimento dos dentes. Os altos níveis de flúor podem levar a alterações na porosidade do esmalte, formando áreas com pouca mineralização, que podem acabar por afetar toda a superfície do dente (Martinez-Mier *et al.*, 2016).

2.3 PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA

A própolis tem sido utilizada pela humanidade desde a antiguidade (~300 a.C.). Os egípcios usavam própolis para embalsamar seus mortos, e os incas a usavam como agente antipirético. Médicos gregos e romanos usavam a própolis como desinfetante bucal e como antisséptico de uso tópico para feridas. Própolis tem sido listada nas farmacopeias oficiais desde o século XVII, momento histórico desde o qual ela tem sido muito comumente usada na medicina popular. Stradivari, famoso violinista italiano, usava a própolis para envernizar seus violinos. Durante a Segunda Guerra Mundial, ela foi empregada como tratamento da tuberculose pelas tropas soviéticas. O primeiro trabalho científico sobre a própolis foi publicado em 1908 e avalia sua composição e propriedades químicas (Bankova *et al.*, 2000; Helfenberg, 1908; Monti *et al.*, 1983; Wagh, 2013; Wollenweber *et al.*, 1990).

A palavra própolis tem origem grega e é formada pelas partículas $\pi\rho\acute{o}$ = O que vem antes e $\pi\acute{o}\lambda\iota\varsigma$ = região cercada, comunidade, cidade. Essa resina natural é produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera*, ou por espécies de abelhas sem ferrão, a partir de substâncias coletadas de partes de plantas, brotos e exudatos de várias fontes vegetais e tem a principal função de defesa da colmeia. Devido às suas propriedades, tanto físicas (mecânicas) como químicas, ela pode ser utilizada como isolante para umidade, vento e frio e para a defesa contra agentes invasores, como cobras e lagartos (Wagh *et al.*, 2013).

A própolis tem sido amplamente utilizada para indústria de alimentos, de bebidas e cosmética, fazendo com que seu valor de mercado aumente nos últimos tempos (Freires, 2016). As aplicações atuais da própolis incluem formulações para o tratamento de síndromes

respiratórias, como resfriados e gripes, e em preparações dermatológicas tópicas para cicatrização de feridas, tratamento de queimaduras, acne, herpes simples e genital e dermatites. Também é amplamente usada na odontologia, em enxaguantes bucais e pastas de dente para prevenir cáries e tratar gengivite e estomatite. Comercialmente, está disponível na forma de cápsulas, soluções para bochechos, cremes, pastilhas para garganta, pó e diversos produtos purificados dos quais a cera foi removida (Wagh *et al.*, 2013).

A própolis é uma substância de natureza lipofílica, dura e quebradiça, que se torna macia, maleável, pegajosa e muito aderente quando aquecida. Possui um aroma característico e agradável, e varia em cor desde amarelo-esverdeado até vermelho e marrom-escuro, dependendo de sua origem e idade. O cheiro, a cor, a constituição e a composição da própolis variam significativamente, em função das diferentes fontes botânicas disponíveis ao redor da colmeia, bem como das condições geográficas e climáticas. Além disso, essas características também dependem do método de coleta utilizado (Bankova *et al.*, 2014; Papotti *et al.*, 2012).

No geral, a própolis é uma substância formada por uma mistura complexa de vários componentes, que têm origem nas abelhas, nas plantas ou no ambiente. Cerca de 50% dos componentes da própolis é formado por resinas, 30% por ceras, 10% óleos essenciais, 5% pólen e 5% de outros compostos orgânicos variados (Park *et al.*, 2002; Pietta *et al.*, 2002).

A própolis brasileira é muito apreciada no mundo inteiro. De acordo com dados do *Japan Trade Organization*, 92% da própolis consumida no Japão é proveniente do Brasil (Schmidt *et al.*, 2014). Foram classificados até o momento 13 tipos de própolis brasileira, sendo o último deles catalogado em 2007 como Própolis Vermelha Brasileira (PVB) (Quadro 01). Uma atenção especial tem sido dada a esse último tipo desde então, devido ao potencial de descoberta de novas moléculas, que podem não estar presente em outros tipos de própolis (Alencar *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2002). Esse tipo de própolis foi caracterizado quimicamente e botanicamente quase simultaneamente por Dausch *et al.* (2008) e por Silva *et al.* (2008).

Quadro 01 – 13 tipos de própolis brasileira relatados na literatura.

Grupo	Coloração	Origem botânica predominante	Região de produção
01	Amarela	-	Sul
02	Castanha clara	-	
03	Castanha escura	<i>Populus alba</i>	

04	Castanha clara	-	Nordeste
05	Marrom esverdeada	-	
06	Marrom avermelhada	<i>Hyptis divaricata</i>	
07	Marrom esverdeada	-	
08	Castanha escura	-	
09	Amarela	-	
10	Amarela escura	-	
11	Amarela	-	Sudeste
12	Verde	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	
13	Vermelha	<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Nordeste

Fonte: Carvalho, 2019.

A Própolis Vermelha Brasileira (PVB) é o segundo tipo de própolis mais comercializado no Brasil, com uma ampla variedade de constituintes químicos, como chalconas, flavonoides, isoflavonas, pterocarpanos e isoflavanas. A partir de seu extrato bruto, podem ser isoladas diversas substâncias, como vestitol, neovestitol, Oblongifolina B, Guttiferona E, medicarpina, entre outras. A cor vermelha característica se deve à presença de isoflavanas catiônicas C30 (retusapurpurinas A e B) (Czako *et al.*, 2001; Frozza *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2024).

A origem botânica da PVB está numa resina vermelha, que exsuda de ferimentos causados por insetos nos caules de uma trepadeira lenhosa, muito comum nas regiões de restingas e manguezais. A espécie tem sido referida como *Dalbergia ecastophyllum*, por muitos botânicos brasileiros. Esse nome também foi utilizado para designar a planta fonte da resina nas primeiras publicações sobre a própolis vermelha brasileira e tem sido usado em todas as publicações, desde então (Salatino *et al.*, 2018).

Vários estudos têm confirmado a presença de uma rica variedade de compostos fenólicos, tanto na própolis quanto na resina da planta, como chalconas (por exemplo, isoliquiritigenina), flavonoides (por exemplo, luteolina, liquiritigenina), isoflavonas (por exemplo, formononetina, biochanina A), isoflavanas (por exemplo, vestitol, neovestitol, 7-O-

metilvestitol), pterocarpanos (por exemplo, medicarpina, homopterocarpina, vesticarpano) e isoflavanas C30 (retusapurpurinas A e B). Relatos sobre a presença de quantidades significativas de benzofenonas polipreniladas, como gutiferona E e oblongifolina A também têm sido reportados (Piccinelli *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2024).

As importantes atividades biológicas dos extratos da PVB, como propriedades antimicrobianas, fungicidas e citotóxicas, têm sido correlacionadas com a ocorrência de benzofenonas polipreniladas gutiferona E e oblongifolina A. Esses compostos são característicos e exclusivos do tipo de própolis brasileiro e têm origem botânica em plantas pertencentes à família *Clusiaceae*, mais precisamente *S. globulifera* (Ccana-Ccapatinta *et al.*, 2020).

A PVB pode ser encontrada em colmeias nas costas de mangues, rios e mares nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia, localizados no nordeste brasileiro. O estado de Alagoas é o único certificado internacionalmente como produtor desse tipo de própolis no mundo, tendo a própolis proveniente de lá obtida a indicação geográfica, pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (Freires *et al.*, 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO EXTRATO DA PRÓPOLIS VERMELHA

O extrato foi gerado a partir da coleta da própolis no dia 18/09/2021, obtendo-se uma extração de própolis vermelha a 11%, tendo como líquido extrator o álcool de cereais a 70%. Um litro do extrato de PVB foi adquirido pronto da Associação de Meliponicultores, Apicultores, Pescadores e Produtos Rurais de Marechal Deodoro e Adjacências – AL.

O produto foi cadastrado no SISGEN sob o número: ABC4614 (anexo B).

Com o extrato líquido foram realizadas as análises descritas nos itens 3.2, 3.3 e 3.4.

Uma alíquota de 200mL do extrato líquido obtido foi secada em rotaevaporador Lucadema® a 40°C, até a retirada de todo o solvente. O material resinoso resultante foi liofilizado no equipamento LIOTOP® (modelo L101), sob as seguintes condições: pressão de cerca de 30mmHg, temperatura de cerca de -55°C e tempo de secagem em torno de 72 horas.

O extrato seco foi utilizado para as análises descritas no item 3.5.

3.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO EXTRATO OBTIDO

Foram realizados utilizando o extrato líquido testes de pH, densidade de massa e densidade relativa, determinação do teor alcoólico, resíduo seco e avaliação das características organolépticas do extrato obtido, todos preconizados na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019a).

3.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através do uso de peagâmetro da Quimis®.

Retirou-se o béquer do peagâmetro contendo solução de KCl, na qual esteve mergulhado o eletrodo quando o medidor não está em uso; Lavou-se o eletrodo com jatos de água destilada e enxugou-se com papel filtro; Imergiu-se o eletrodo em solução tampão de referência, verificando-se a temperatura em que se vai operar; Lavou-se o eletrodo com várias porções de água. Na segunda solução tampão de referência, imergiu-se o eletrodo e verificou-se o valor de pH registrado.

Lavou-se mais uma vez o eletrodo com várias porções de água destilada e aferiu-se o pH da amostra. O procedimento foi realizado em triplicata (Brasil, 2019a).

3.2.2 Determinação da Densidade de Massa

Para determinação da densidade, utilizou-se um picnômetro limpo e seco, com capacidade de 25mL a 25°C. Foi realizada a calibração, determinando-se a massa do picnômetro vazio e, em seguida, a massa do seu conteúdo com água destilada.

Após a calibração, transferiu-se a amostra para o picnômetro e pesou-se em balança analítica. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. O teste foi realizado em triplicata (Brasil, 2019a).

3.2.3 Determinação de Resíduo Seco dos Extratos

Em um pesa-filtro, de cerca de 50 mm de diâmetro e 30 mm de altura, introduziu-se 2mL do extrato bruto. Evaporou-se à secura em banho-maria e, em seguida, secou-se em estufa a 100°C durante três horas. Após resfriamento em dessecador em presença de gel de

sílica anidro concentrado foi realizada a pesagem em balança analítica. O teste foi realizado em triplicata (Brasil, 2019a).

3.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Todos os testes qualitativos descritos a seguir foram realizados para o extrato líquido de acordo com os estudos de Costa (1994) e Silva *et al.* (2018).

3.3.1 Teste para Cumarinas

Com auxílio de um capilar, aplicaram-se duas fortes manchas de aproximadamente 1,5cm de diâmetro, em um pedaço de papel de filtro não fluorescente. Aplicou-se sobre uma das manchas uma gota de solução alcoólica de KOH 1N. Cobriu-se parcialmente as manchas com um cartão opaco não fluorescente e expôs-se o conjunto à ação da luz UV, por cerca de 2 a 3 minutos. Descobriu-se a parte encoberta ainda sob luz UV, e observou-se a modificação na fluorescência da mancha alcalinizada (Costa, 1994; Silva *et al.* 2018).

3.3.2 Teste para Fenóis e Taninos

Em um tubo de ensaio foi colocada a amostra de cerca de 2mL, em um segundo tubo foi colocada água destilada em mesma quantidade. A ambos os tubos foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl₃. Agitou-se bem e observou-se se havia variação de cor e formação de precipitado. O tubo em que foi colocada água destilada foi usado como branco (Costa, 1994; Silva *et al.* 2018).

3.3.3 Teste para Antocianinas e Antocianidinas e Flavonóides

Foram tomados três tubos contendo alíquotas de cerca de 2mL da amostra. Os pHs foram ajustados para 3; 8,5 e 11 respectivamente. As mudanças na coloração do material foram observadas e comparadas de acordo com o Quadro 02 (Costa, 1994; Silva *et al.* 2018).

Quadro 02 – Cores correspondentes à presença de constituintes no analito.

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido (3)	Alcalino (8,5)	Alcalino (11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-Púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Verm. Púrpura
Flavanonóis	-	-	Verm. Laranja

Fonte: Costa, 1994; Silva *et al.* 2018.

Obs: A presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa da presença de outro.

3.3.4 Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e Flavonas

Foram separados dois tubos contendo alíquotas da amostra. Ao primeiro tubo, foi adicionado HCl para ajustar o pH 1-3 e, ao segundo, foi adicionado NaOH, para ajustar o pH até pH 11. Ambos foram aquecidos, com auxílio de uma lâmpada de álcool, durante 2 a 3 minutos, cuidadosamente. Observou-se qualquer modificação na cor, por comparação com os tubos correspondentes usados no texto anterior.

Aparecimento ou intensificação de cor indicava a presença de constituintes especificados no Quadro 03 (Costa, 1994; Silva *et al.* 2018).

Quadro 03 - Cores correspondentes à presença de constituintes no analito.

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-

Catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavonas	-	Verm. Laranja

Fonte: Costa, 1994; Silva *et al.* 2018.

Obs: A presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa de outro.

3.3.5 Teste para Esteroides e Triterpenoides (Lieberman-Burchard)

Para esse teste foi utilizado o extrato seco, obtido conforme método descrito no item 3.2.3. Extraíu-se o resíduo seco do pesa-filtro lavando de 2-3 vezes com 1-2 mL de clorofórmio, tendo o cuidado de solubilizar bem o resíduo no solvente. Filtrou-se a solução clorofórmica gota a gota, em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberto com alguns decigramas de Na₂SO₄ anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético, seguido de suave agitação, logo após juntou-se cuidadosamente três gotas de H₂SO₄ concentrado. Após uma suave agitação, foi observada a presença ou ausência das seguintes cores:

- Coloração azul evanescente, seguida de verde permanente, é indicativo de presença de esteroides livres;
- Coloração parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres (Costa, 1994; Silva *et al.* 2018).

3.3.6 Teste para saponinas

Tomou-se o resíduo insolúvel em clorofórmio, separado no item 3.3.5. Ele foi dissolvido com 5 a 10 ml de água destilada e a solução filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo com a solução, fortemente, por 2 a 3 minutos e observou-se a formação de espuma.

- Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos) (Costa, 1994; Silva *et al.* 2018).

3.4 ANÁLISES QUANTITATIVAS

3.4.1 Análises por CLAE-DAD

As análises por CLAE-DAD foram realizadas na Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da UNIVASF.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD), foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® equipado com um sistema quaternário de bombas (LC – 20AT), degaseificador (DGU – 20A), injetor automático (SIL - 20A), forno (CTO - 20A), detector DAD (SPD - M20) e controlador (CBM – 20A). Os dados foram analisados usando software Shimadzu® LC-Solution 1.0; e uma coluna cromatográfica Agilent® (4,6x250mm, 5 µm). Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas, através de membrana filtrante de 0,22 µm (Chromafil® Xtra, EUA), antes de serem analisadas no cromatógrafo.

Diluíram-se 100 µL do extrato líquido de PVB, em balão volumétrico de 5 mL, em metanol (Dinâmica®). Para análise da amostra no cromatógrafo, a temperatura foi mantida constante em 30°C, com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, volume de injeção de 3 µl e tempo de análise de 45 min (Tabela 03). A fase móvel foi composta por: solvente A – água ultrapura e solvente B – metanol grau HPLC (Honeywell®). Todas as análises foram realizadas em triplicata, e os cromatogramas foram obtidos em 280 nm.

Tabela 01 - Sistema gradiente de fase móvel utilizado para determinação qualitativa em CLAE-DAD.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0 – 25	95 – 0	5 – 100
25 – 30	0	100
30 – 35	0 – 95	100 – 5
35 – 45	95	5

Legenda: Solvente A – água ultrapura e B – metanol grau HPLC

Fonte: Autor.

3.4.2 Análise dos padrões analíticos

Após o desenvolvimento do método cromatográfico, as substâncias químicas de referência (SQRs) (Tabela 02) foram analisadas por CLAE-DAD, com as mesmas condições de análise das amostras. A análise das SQRs foi feita por comparação do tempo de retenção e pelo perfil dos espectros de UV ($\lambda_{\text{máx}}$) dos picos encontrados nos cromatogramas das amostras e das Substâncias Químicas de Referência (SQRs).

Tabela 02 - Concentrações das SQRs utilizadas no desenvolvimento do método.

SQR	Concentração ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
Ácido clorogênico	200,00
Ácido gálico	200,00
Ácido <i>o</i> -cumárico	200,00
Ácido protocatecuico	200,00
Apigenina	200,00
Catequina	200,00
Cumarina	200,00
Hesperidina	440,00
Kaempferol	200,00
Narigenina	200,00
Orientina	200,00

Rutina	200,00
Quercetina 3-β-glicosídeo	200,00

Legenda: SQR- Substância Química de Referência

Fonte: Autor.

3.5 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu é uma das metodologias mais empregadas para quantificação de compostos fenólicos totais. Trata-se de uma reação de oxirredução, na qual, os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, ao entrar em contato com os polifenóis presentes na amostra, têm os íons tungstênio e molibdênio reduzidos, em pH alcalino. A reação é caracterizada devido à alteração na coloração da solução; os compostos adquirem coloração azul, absorvendo luz no comprimento de onda de 760 nm (Lazarotto *et al.*, 2020).

Esse teste geralmente é realizado usando 2h como tempo de espera, após a adição dos reagentes para a leitura no espectrofotômetro (Singleton *et al.*, 1999).

Para esse estudo, adaptaram-se as condições de acordo com o trabalho de Lazzarotto *et al* (2020). Foi utilizado o extrato seco e otimizado o tempo de reação para 30min.

Para calcular a concentração de polifenóis totais, foi preparada uma curva-padrão de ácido gálico, com concentrações distintas, sendo estas, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, obtidas a partir da primeira solução alcoólica de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A reação ocorreu em balões volumétricos de 5 mL, identificados com o respectivo valor de cada concentração. A cada balão, foram adicionados 3 mL de água, 1 mL da amostra diluída, 0,4 mL de reagente Folin-Ciocalteu (RFC) e 0,6 mL de Na_2CO_3 a 20%. Os balões ficaram em repouso durante 30 min, à temperatura ambiente, protegidos do abrigo da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada a 760 nm, em espectrofotômetro UV mini-1240 SHIMADZU®. O teor de polifenóis totais foi obtido, a partir da interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração com padrões de ácido gálico (20 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100g de extrato de PVB (Lazzarotto *et al.*, 2020).

Após modificações na metodologia descrita por Woisky, em 1998, pode-se estabelecer as condições para o estudo com o extrato de PVB e o verniz odontológico produzido (Woisky *et al.*, 1998).

Para o doseamento de compostos fenólicos totais presentes no extrato de PVB, os ensaios foram realizados em triplicata, com reagentes e condições de ambiente propiciados pelo laboratório de pesquisa. A curva-padrão foi construída com ácido gálico e o resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico.

Para o uso do Reagente de Folin-Ciocalteu, é necessário que o meio esteja em pH alcalino, para ocorrer a formação molibdênio e tungstênio azul, por meio de reação de oxirredução. O carbonato de sódio (Na_2CO_3) é o reagente de escolha para tornar o meio básico. Assim, a solução de Na_2CO_3 a 20% foi preparada com 5g do sal, dissolvidos em água destilada aquecida, aproximadamente a 70°C. O volume do balão volumétrico foi completado para 25 mL (Lazzarotto *et al.*, 2020).

3.5.1 Construção da Curva Padrão de Ácido Gálico

Para a construção da curva-padrão, preparou-se uma solução-estoque de ácido gálico (1000 mg.L^{-1}), solução de carbonato de sódio a 20%, reagente de Folin-Ciocalteu e água destilada. Para obter pontos distintos na curva, as diluições seguiram a Tabela 03.

Tabela 03 – Valores utilizados para a construção da curva de ácido gálico.

Tubos	Solução estoque de Ácido Gálico (mg.L^{-1})	Volume da Solução Estoque (mL)	Volume de água (mL)	Concentração final da solução (mg.L^{-1})
1	5000,00	2,0	8,0	1000,00
2	1000,00	0,8	0,2	800,00
3	1000,00	0,6	0,4	600,00
4	1000,00	0,4	0,6	400,00
5	1000,00	0,2	0,8	200,00

6	1000,00	0,1	0,9	100,00
7	500,00	0,1	0,9	50,00

Fonte: Autor.

Em seguida, foram adicionados 100 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 300 μL da solução de carbonato de sódio, em cada tubo de ensaio. Posteriormente, foram levados para um ambiente escuro para reação ocorrer, durante 30 minutos, promovendo a oxidação dos fenóis. Ao final, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV mini-1240 SHIMADZU®, a 760 nm.

3.5.2 Validação da Metodologia Analítica

A validação do método consistiu em ensaios experimentais, que atestam a reprodução dos ensaios preconizados na RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, da ANVISA. Todos os ensaios espectrofotométricos foram realizados, após as condições de análise serem estudadas e estabelecidas (Brasil, 2017).

A análise estatística foi realizada através do software Excel® (*Microsoft Corporation*) para realização através do teste de ANOVA de fator único. O nível de significância considerado foi de 5%.

3.5.2.1 Linearidade

A linearidade da amostra e do padrão foram atestados por análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a partir de três curvas de calibração, usando cinco concentrações distintas. Após os resultados, foi possível observar o coeficiente de regressão linear, o desvio padrão e a equação de regressão (Brasil, 2017).

3.5.2.2 Limite de Detecção

Outro parâmetro avaliado foi o limite de detecção, a partir da construção da curva de calibração com soluções com faixa de concentração de 100 mg.mL^{-1} a 0,5 mg.mL^{-1} , obtidos a partir de diluição de uma amostra de 8 mg.mL^{-1} do extrato de PVB. Partindo de cada concentração, a solução final foi armazenada em um balão de 5 mL, sendo constituído por 3

mL de água purificada, 1 mL da amostra, 0,4 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 0,6 mL do carbonato de sódio a 20%. Os ensaios foram realizados em triplicata e, ao final, foi obtida a média e o desvio-padrão relativo das leituras. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a partir do desvio padrão relativo (DPR) e a inclinação da curva de calibração - IC (coeficiente angular), obtido pela linearidade da amostra. Por meio das equações 1 e 2 (Brasil, 2017):

$$\text{LD} = (3,3.\sigma) \div \text{IC} \quad (1)$$

$$\text{LQ} = (10.\sigma) \div \text{IC} \quad (2)$$

Onde:

σ = desvio padrão relativo

IC = coeficiente angular

3.5.2.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada a partir da adição de 0,4 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu a distintas concentrações da amostra utilizadas, para construir a curva de linearidade. Assim, o método foi considerado seletivo, quando os coeficientes angulares das equações da reta das linearidades das amostras apresentaram resultados próximos (Brasil, 2017).

3.5.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade. A repetibilidade foi obtida por meio da análise em triplicata de 3 concentrações da amostra, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, submetida à metodologia adaptada de Folin-Ciocalteu. Os resultados estatísticos referentes ao desvio padrão relativo (DPR) obtido, conforme a equação 3, foram obtidos através de ANOVA. (Brasil, 2017).

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

3.5.2.5 Robustez

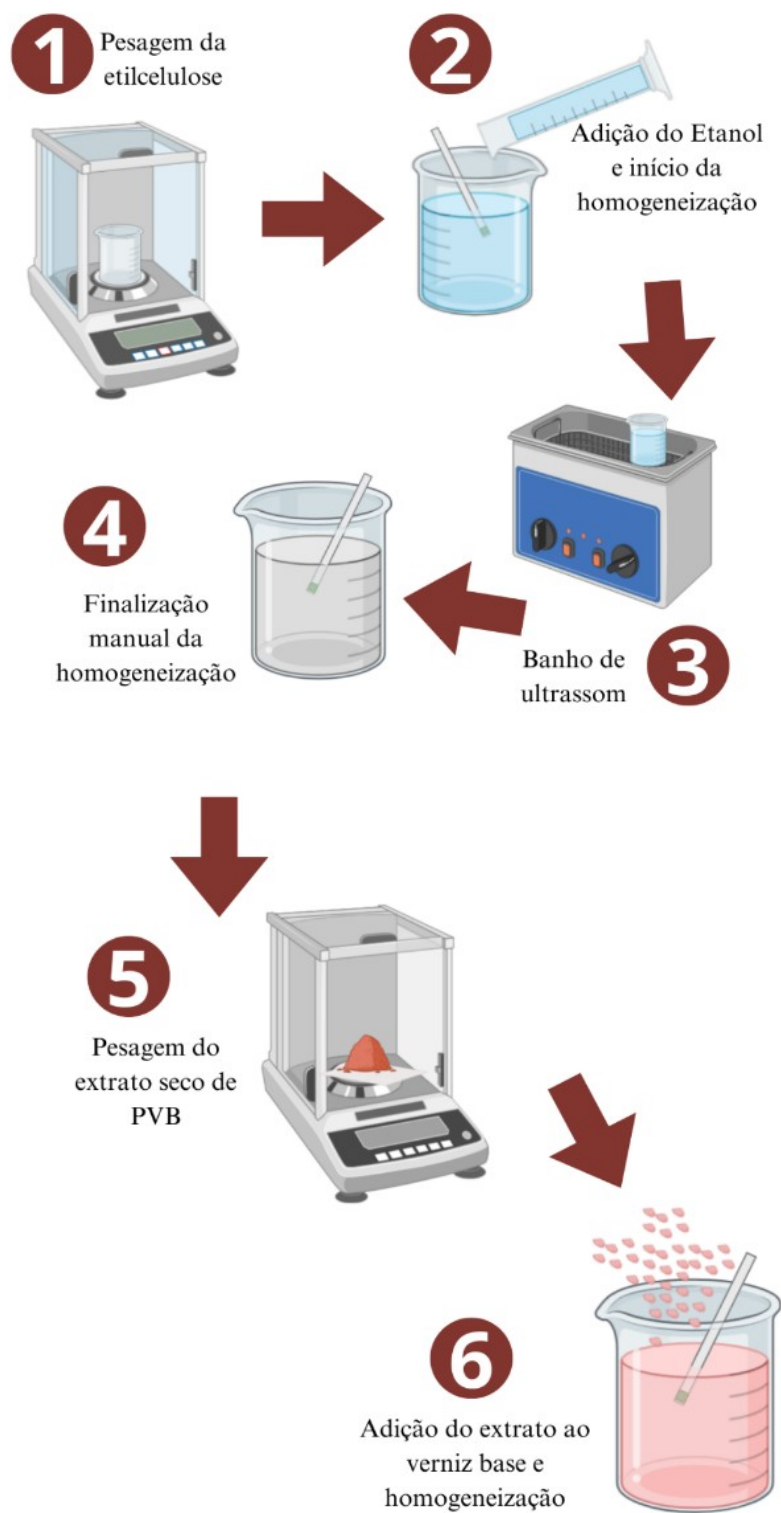
A robustez foi avaliada através de alterações de luminosidade, presença e ausência de luz no ambiente, e aquecimento ou não da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3). As análises foram realizadas em triplicata. Os extratos alcoólicos continham concentração de $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. As amostras foram lidas no comprimento de onda de 760 nm. Os resultados foram analisados por ANOVA unilateral utilizando o software Excel® (Brasil, 2017).

3.6 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO VERNIZ DENTÁRIO

O verniz base foi elaborado a partir de etilcelulose solubilizada em álcool etílico absoluto. Várias concentrações de etilcelulose foram testadas até que se chegasse em uma viscosidade próxima à dos vernizes utilizados comercialmente e de forma que não compromettesse as operações unitárias a serem realizadas no processo de incorporação dos outros componentes. Foram testadas as concentrações de 2,5%, 5%, 10%, 15% e 20% de etilcelulose em álcool absoluto. A solubilização da etilcelulose foi realizada sempre com o auxílio de um banho de ultrassom SPLabor®. O tempo no banho de ultrassom variou entre 30min a 2h (etapas 1 a 3 da figura 01). A homogeneização foi completada de forma manual, de modo a obter um líquido viscoso e límpido (etapa 4 da figura 01). O extrato seco e líquido foi pesado para as três concentrações de teste: 5%, 10% e 15%, sendo posteriormente adicionado à base polimérica formada. Também foram testadas algumas concentrações de NaF: 1%, 2%, 3%, 4% e 5%. Para tanto o NaF foi pesado e adicionado ao verniz em etapa posterior ao extrato. Procedeu-se em seguida a homogeneização manual de todos os componentes (Neto, 2017).

Ao todo, foram produzidos cerca de 20 lotes de bancada, cujas composições e concentrações serão apresentadas na tabela 04.

Figura 01 – Representação esquemática do processo de produção do verniz odontológico.



Fonte: Autor (2024).

Tabela 04 – Concentrações usadas para a formulação do verniz odontológico.

Base etilcelulose)	(15% de	PVB (%)	NaF (%)	Carboximetilcelulose (%)	EDTA (%)
1g		5	-	-	-
1g		10	-	-	-
1g		15	-	-	-
1g		5	1	-	-
1g		5	2	-	-
1g		5	3	-	-
1g		5	4	-	-
1g		5	5	-	-
1g		5	1,25	-	0,1
1g		5	2,5	-	0,1
1g		5	5	-	0,1
1g		5	5	1	-
1g		5	5	2	-

1g	5	5	5	-
1g	-	1	-	-
1g	-	2	-	-
1g	-	3	-	-
1g	-	4	-	-
1g	-	5	-	-

Fonte: Autor.

3.7 CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO DOS LOTES DE BANCADA

Seguindo a normatização da RDC Nº 658, de 30 de março de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 2022), para cada lote de bancada manipulado, serão realizados os controles de qualidade adequados, de acordo com os parâmetros preconizados pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019a).

3.7.1 pH do Verniz

Devido às características de viscosidade e de adesão do verniz o aparelho de pH não foi usado para esse teste. O pH da formulação de interesse foi verificado a partir de fitas de pH, onde foi observada a mudança de coloração da fita. A faixa de pH foi avaliada, a partir da comparação da fita com a bula do fabricante.

3.7.2 Densidade do Verniz

A massa de uma proveta foi aferida em uma balança analítica. O verniz foi vertido na proveta, observando um volume de 100mL. Então, a proveta contendo o verniz foi pesada. A massa do verniz foi obtida pela diferença entre a massa da proveta cheia e vazia. Com o peso e o volume, a densidade foi obtida.

3.7.3 Viscosidade do Verniz

A viscosidade foi determinada por um viscosímetro de Brookfield, que mede a viscosidade pela força necessária para girar o *spindle* no líquido que está sendo testado.

A medição foi realizada por um viscosímetro da marca Laborana®, modelo Lab-1086M21, onde o verniz foi adicionado no recipiente coletor do aparelho, até a marca indicada no *spindle* L3. Então, foram selecionadas rotações de 10 a 60 rpm, observando a porcentagem indicada no canto superior direito (que torna a leitura válida se estiver entre os valores de 20 a 80), sempre esperando pela estabilização dos valores indicados em milipascal segundo (mPa.s).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato seco apresentou rendimento de 22%. O mínimo de extrato seco segundo a Instrução Normativa SDA nº 03, de 19 janeiro de 2001 é de 11% (m/v), estando o extrato de PVB, portanto, dentro dos padrões de identidade e qualidade requeridos (Brasil, 2001).

4.1 DETERMINAÇÃO DO PH

A média de pH encontrada a partir das três medições para o extrato líquido bruto foi ligeiramente ácida (pH = 5.04), conforme demonstrado na Tabela 05.

Segundo Kawakita *et al.* (2015), o pH do extrato alcoólico de própolis varia entre 3.0 e 5.7, onde estudos revelam que maior parte dos valores de pH estão em torno de 5.0. Logo, o pH da amostra está de acordo com a literatura.

Tabela 05 – Valores de pH do extrato líquido.

pH	Valores
pH 1	5,07
pH 2	5,10
pH 3	4,95

Média de pH	5,04
-------------	------

Fonte: Autor.

4.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE MASSA

Realizado de acordo com o método do picnômetro descrito no item 3.2.2. Os resultados são demonstrados na tabela 06.

Tabela 06 – Valores utilizados na determinação da densidade.

	Massa em g
Picnômetro vazio	28,3790
Picnômetro + água	54,5622
Picnômetro + amostra	51,9843
Densidade relativa	0,9527

Fonte: Autor.

4.3 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO DO EXTRATO LÍQUIDO

Os testes de resíduo seco foram realizados a partir de 2g de extrato fluido, cuja média de resíduo seco foi de 1,8085g (Tabela 07 e Figura 02). O teor de umidade obtido foi de 10% (m/m), estando fora dos padrões de identidade e qualidade segundo a Instrução Normativa SDA nº 03, de 19 janeiro de 2001, onde o máximo de perda por dessecação é de 8% (m/m). Esse padrão é corroborado junto com pesquisas de Mariano (2014), em que o teor de umidade foi de 4,5% (m/m) e de Nunes (2019), com valores médios de umidade de 7,64% (m/m).

Tabela 07 – Valores utilizados para determinação de resíduo seco.

	Pesa-filtro vazio (g)	Peso do extrato (g)	Peso total (g)	Peso total após secagem (g)	Resíduo seco (g)	Percentual de Resíduo Seco
Resíduo seco 1	42,9391	1,9905	44,9296	43,1272	1,8024	9,45%
Resíduo seco 2	40,5720	2,0055	42,5775	40,7625	1,8150	9,49%
Resíduo seco 3	42,1192	1,9989	44,1181	42,3100	1,8081	9,54%
Média resíduo seco					1,8085	9,50%

Fonte: Autor.

O teor de resíduos sólidos obtidos depois da secagem foi, em média 9,5%. Mariano (2014) relata um percentual de 8,39% de resíduo seco para a PVB, o que demonstra que o resultado encontrado está em conformidade com o padrão observado na literatura, sendo ainda um pouco superior.

Figura 02 – Pesa-filtros contendo resíduo seco do extrato após a secagem.



Fonte: Autor (2022).

4.4 ANÁLISES QUALITATIVAS

Mendonça *et al.* (2015) realizaram os testes, de acordo com a metodologia de Matos (1997) e encontraram, nas amostras de própolis vermelha, taninos condensados; flavonas, flavonóis e xantonas; chalconas e auronas; catequinas e triterpenóides. A amostra deste estudo apresentou esses mesmos componentes e cumarinas, não apresentando apenas os triterpenóides, conforme demonstrado na Tabela 08 e nas Figura 03 e 04.

Tabela 08 – Ausência ou presença de constituintes encontradas nos testes qualitativos.

Metabólitos secundários	Resultados
Cumarinas	P
Fenóis e Taninos	P
Antocianinas e Antocianidinas	N
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	N
Chalconas e Auronas	P
Flavanonóis	N
Leucoantocianidinas	N
Catequinas (Taninos catéquicos)	N
Flavonas	P
Esteróides	P
Triterpenóides	N

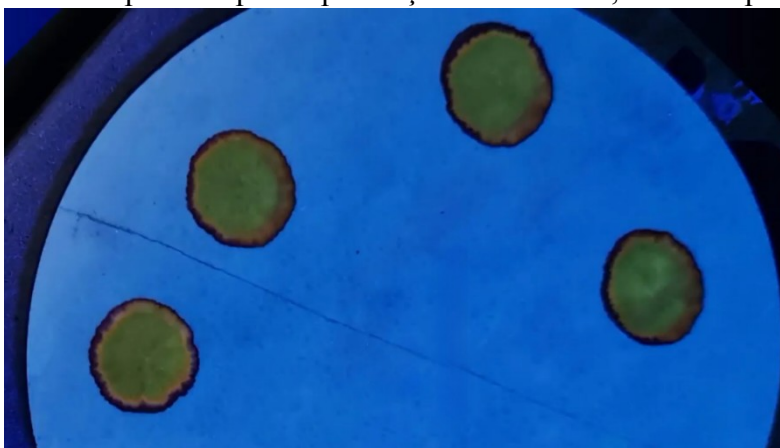
Saponinas	N
-----------	---

Legenda: P = positivo; N = negativo.

Fonte: Autor.

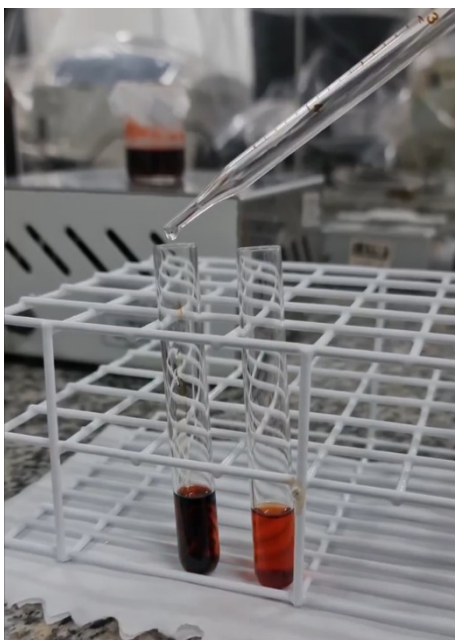
Conforme observado, alguns testes apresentaram resultado negativo, mesmo para compostos sabidamente presentes no extrato, como flavonóis, por exemplo, que puderam ser comprovados nos testes qualitativos. Isso ocorre, pois, a técnica envolve reações colorimétricas e, como o extrato possui naturalmente uma cor vermelha forte e característica, a leitura de alguns resultados pode ter sido comprometida.

Figura 03 - Resultado positivo para a presença de cumarinas, indicado pela fluorescência.



Fonte: Autor (2022).

Figura 04 - Formação de FeCl_3 , indicando a presença de compostos fenólicos e taninos.



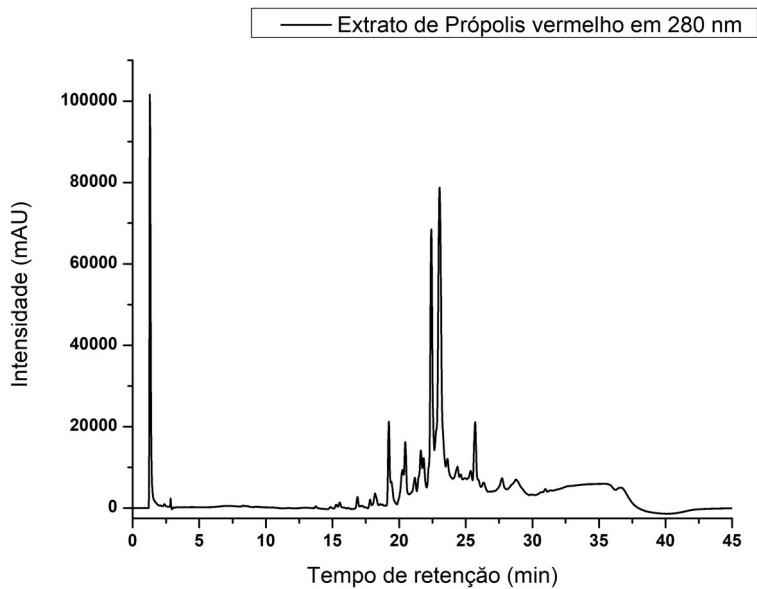
Fonte: Autor (2022).

4.5 ANÁLISE QUANTITATIVA

4.5.1 Análises por CLAE-DAD

A análise por CLAE-DAD da amostra de extrato PVB permitiu determinar seu perfil cromatográfico (Figura 05).

Figura 05 - Cromatograma do extrato PVB em 280 nm.



Fonte: Autor (2023).

As SQRs, descritas no item 3.4.2, foram analisadas sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas na análise do extrato PVB para identificar o tempo de retenção e espectro de UV. Os valores são apresentados na tabela 09 onde $\lambda_{\text{máx}}$ corresponde ao comprimento de onda máximo.

Tabela 09 - Resultados obtidos após análises de SQR pelo método cromatográfico por CLAE-DAD.

SQR	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
-----	-------------------------	-----------------------------

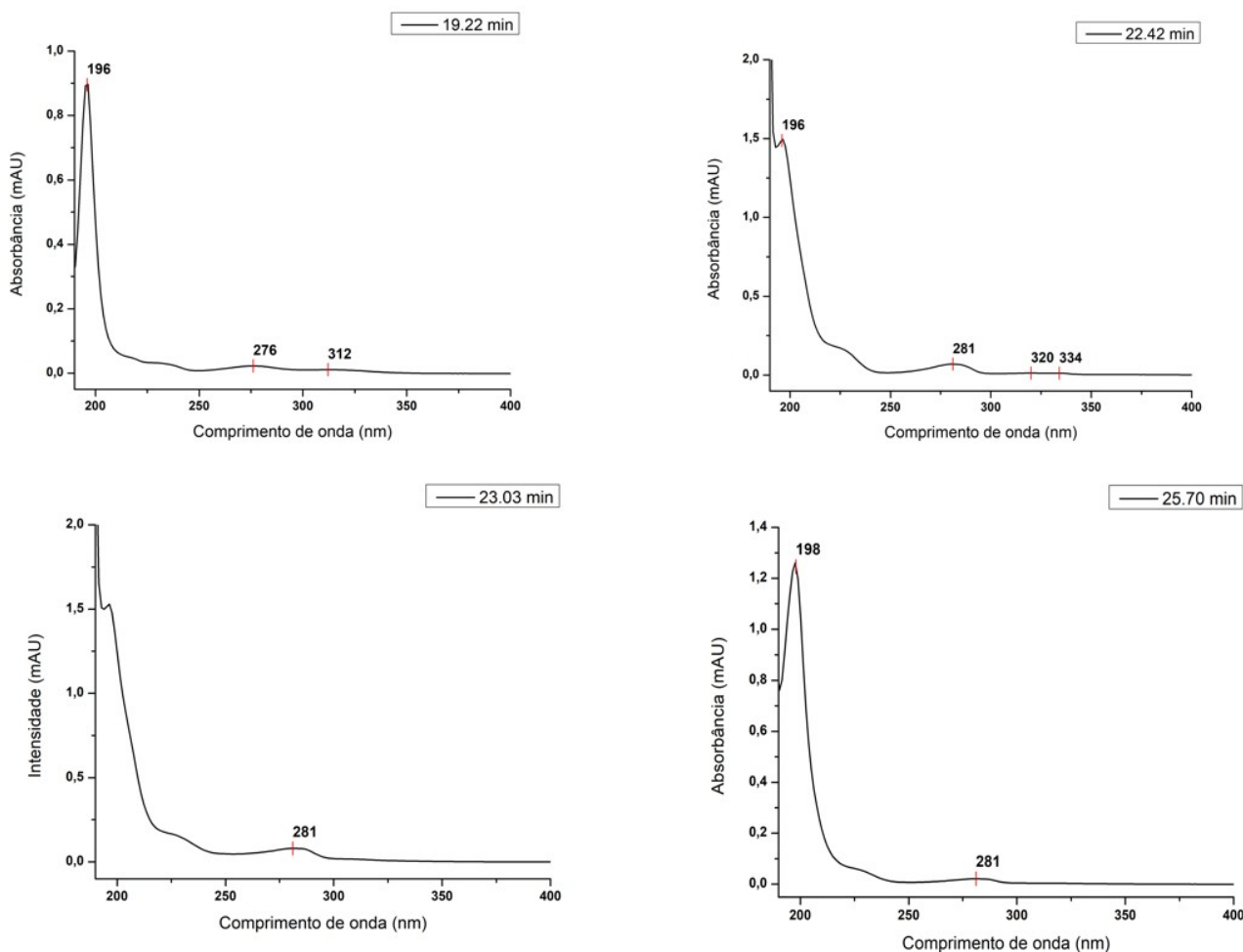
Ácido clorogênico	3,57	217/323
Ácido gálico	2,21	211/257
Ácido <i>o</i>-cumárico	8,91	210/268/312
Ácido protocatecuico	2,69	203/249/287
Apigenina	22,32	196/267/338
Catequina	12,33	279
Cumarina	17,42	195/276/309
Hesperidina	17,88	196/284/327
Kaempferol	19,03	196/265/349
Narigenina	20,48	196/289
Orientina	15,98	195/256/268/351
Rutina	17,91	195/256/356
Quercetina 3-β-glicosídeo	17,95	195/256/356

Legenda: SQR = Substância Química de Referência; $\lambda_{\text{máx}}$ = Comprimento de onda máximo.
 Fonte: Autor.

Após análise dos tempos de retenção e os comprimentos de onda máximos encontrada na amostra de PVB em comparação com as das SQRs, pode-se observar que não houve

presença das SQRs na amostra por análise de CLAE-DAD. Porém, foi possível obter os perfis dos espectros de UV dos picos cromatográficos majoritários presentes na amostra de PVB.

Figura 06 - Perfil dos espectros no UV obtidos pelo detector DAD para amostras analisadas.



Fonte: Autor (2023).

Pelo perfil dos espectros UV apresentados, podemos observar um pico de absorbância na região de 196nm. Apesar de não ser possível especificar qual, observamos que todos os flavonoides pesquisados como SQR, têm padrão de absorbância nessa região. O que corrobora os estudos qualitativos desse trabalho que apresentaram resultados positivos para flavonoides. Como não é objeto desse estudo a identificação dos flavonoides específicos

relacionados à atividade farmacológica da PVB, uma vez que são muitos, conseguimos através dos resultados obtidos nesse teste identificar a presença geral de compostos fenólicos no perfil de absorbância da amostra.

4.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

4.6.1 Curva Padrão de Ácido Gálico

Diante da metodologia empregada, algumas observações foram realizadas, a utilização de sete pontos para leitura da curva apontou a falta de linearidade, como mostra a tabela 10 e no gráfico 01. As concentrações analisadas correspondem a 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL. O R^2 foi de 0,5722 e a equação da reta fornecida foi:

$$y = 0,0029x + 0,1086 \quad (4)$$

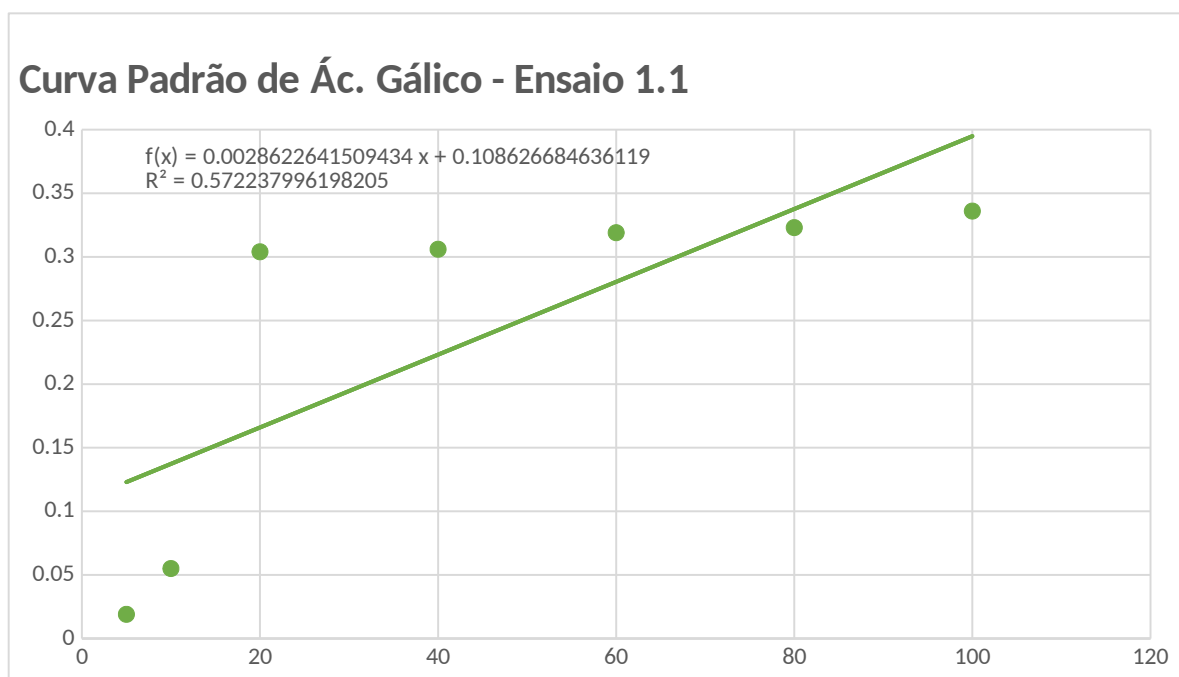
Tabela 10 – Absorbâncias de ácido gálico usadas para a curva padrão / ensaio 1.1.

[] µg.ml ⁻¹	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média
100	0,339	0,336	0,333	0,336
80	0,324	0,324	0,321	0,323
60	0,314	0,325	0,319	0,319
40	0,305	0,308	0,305	0,306
20	0,303	0,306	0,302	0,304
10	0,057	0,055	0,054	0,055

5	0,016	0,016	0,024	0,019
---	-------	-------	-------	-------

Fonte: Autor.

Gráfico 01 – Curva padrão de ácido gálico / ensaio 1.1.



Fonte: Autor (2023).

Observou-se que as concentrações abaixo de 20 µg.mL⁻¹ fogem do padrão matemático esperado pela curva, quebrando a lei de Lambert-Beer. A lei de Lambert-Beer descreve a relação linear entre a absorbância de uma solução e a concentração da substância que a absorve (Mayerhöfer *et al*, 2020).

A regra é expressa pela equação 5.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (5)$$

Onde:

A é a absorbância,

ε é o coeficiente de absorção molar,

c é a concentração da substância,

l é o caminho ótico (a distância pela qual a luz passa através da amostra).

Observa-se que, para os pontos abaixo de $20\mu\text{g.mL}^{-1}$, a correlação determinada pela equação não pode mais ser observada.

Portanto, os dois pontos divergentes foram eliminados e um novo gráfico foi plotado de acordo com o demonstrado abaixo no gráfico 02:

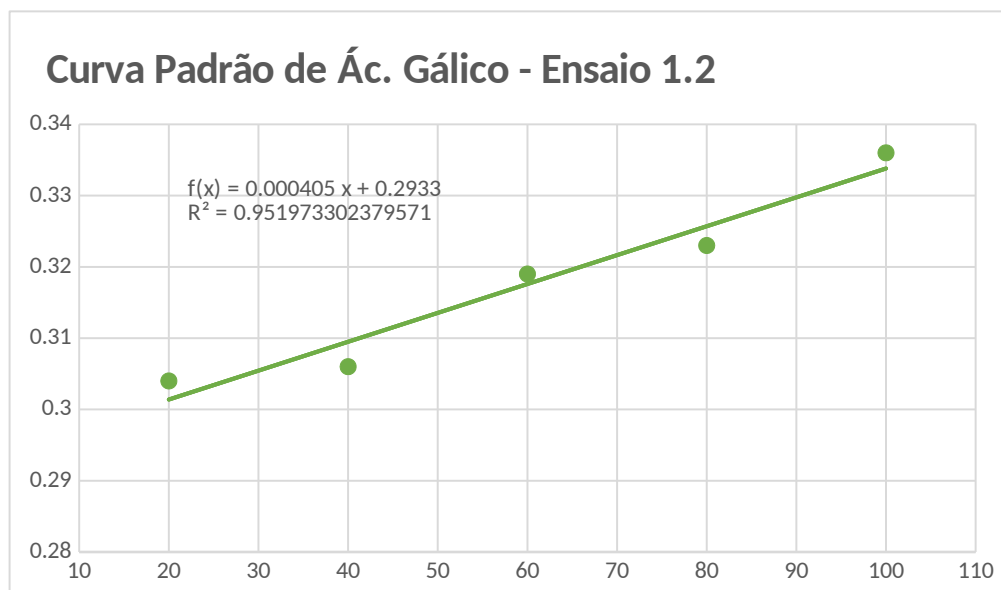


Gráfico 02 – Curva padrão de ácido gálico / ensaio 1.2.

Fonte: Autor (2023).

Dois novos ensaios foram também realizados utilizando-se apenas as concentrações a partir de $20\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados estão expressos abaixo nas tabelas 11 e 12 e nos gráficos 03 e 04:

Tabela 11 – Absorbâncias de ácido gálico usadas para a curva padrão / ensaio 2.

[] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média
100	0,340	0,325	0,335	0,333
80	0,327	0,298	0,348	0,324
60	0,311	0,315	0,318	0,315

40	0,311	0,309	0,305	0,308
20	0,294	0,306	0,303	0,301

Fonte: Autor.

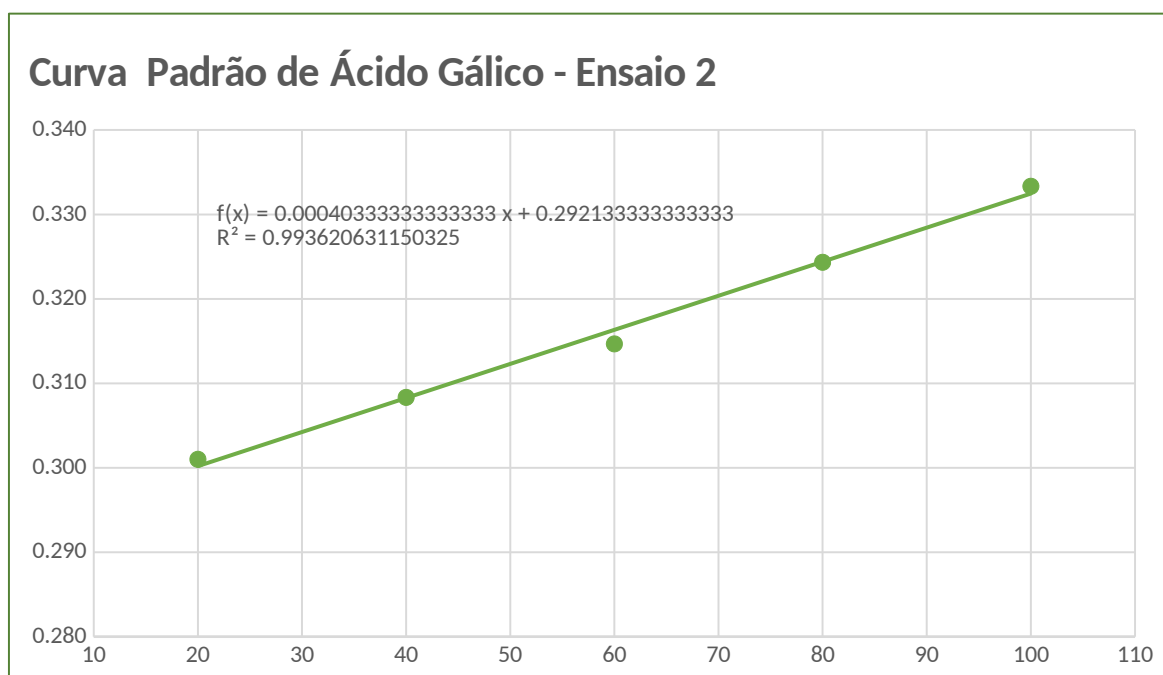


Gráfico 03 – Curva padrão de ácido gálico / ensaio 2.

Fonte: Autor (2023).

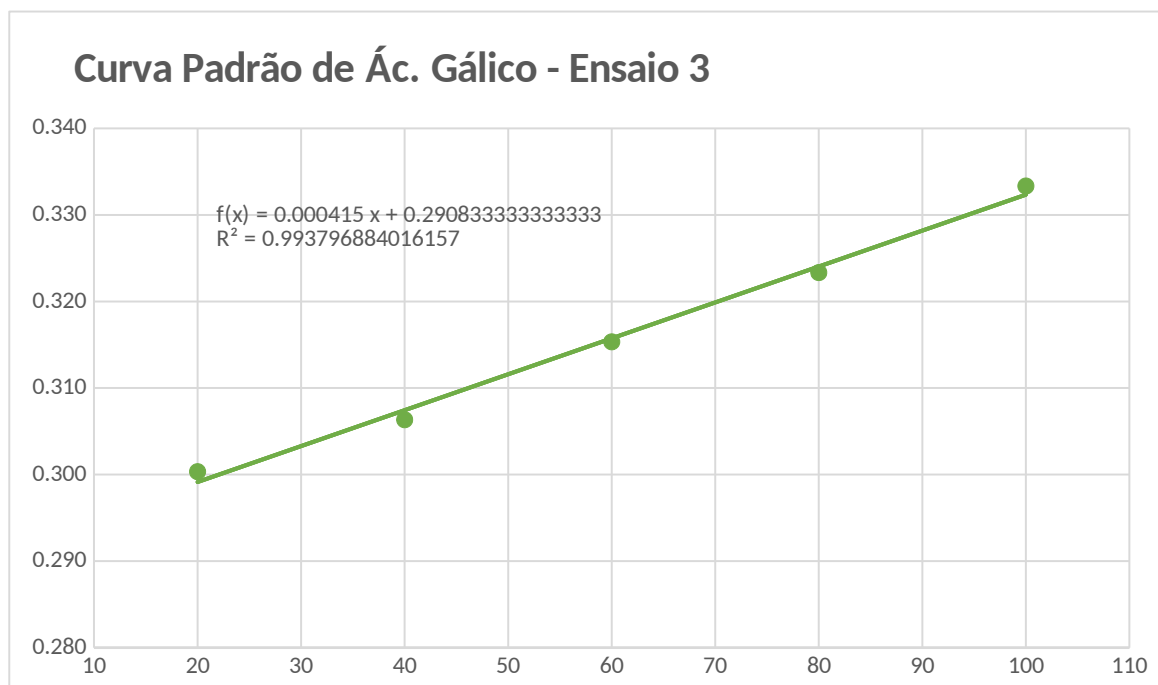
Tabela 12 – Absorbâncias de ácido gálico usadas para a curva padrão / ensaio 3.

[] µg.ml ⁻¹	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média
100	0,332	0,333	0,335	0,333
80	0,329	0,311	0,330	0,323
60	0,317	0,316	0,313	0,315

40	0,306	0,305	0,308	0,306
20	0,302	0,299	0,300	0,300

Fonte: Autor.

Gráfico 04 – Curva padrão de ácido gálico / ensaio 3.



Fonte: Autor (2023).

Observa-se que, no segundo e no terceiro ensaios, utilizando as concentrações 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os R^2 foram, respectivamente, de 0,9936 e 0,09938 a equação da reta fornecida foi:

$$y = 0,0004x + 0,2921 \quad (6)$$

$$y = 0,0004x + 0,2908 \quad (7)$$

4.6.2 Linearidade

Foram realizados ensaios em triplicata em três dias distintos para os testes de linearidade, nos quais foi observado o mesmo padrão errático do encontrado no primeiro ensaio da construção da curva de ácido gálico. As médias foram calculadas e os gráficos plotados de acordo com o que se apresenta a seguir nas tabelas 13, 14 e 15 e nos gráficos 05, 06 e 07:

Tabela 13 – Absorbâncias da amostra para linearidade / ensaio 1.

[] $\mu\text{g.ml}^{-1}$	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média
100	0,305	0,302	0,303	0,303
80	0,263	0,263	0,263	0,263
60	0,232	0,234	0,233	0,233
40	0,183	0,183	0,184	0,183
20	0,121	0,120	0,120	0,120

Fonte: Autor.

Gráfico 05 – Curva de linearidade da amostra / ensaio 1.

Fonte: Autor (2023).

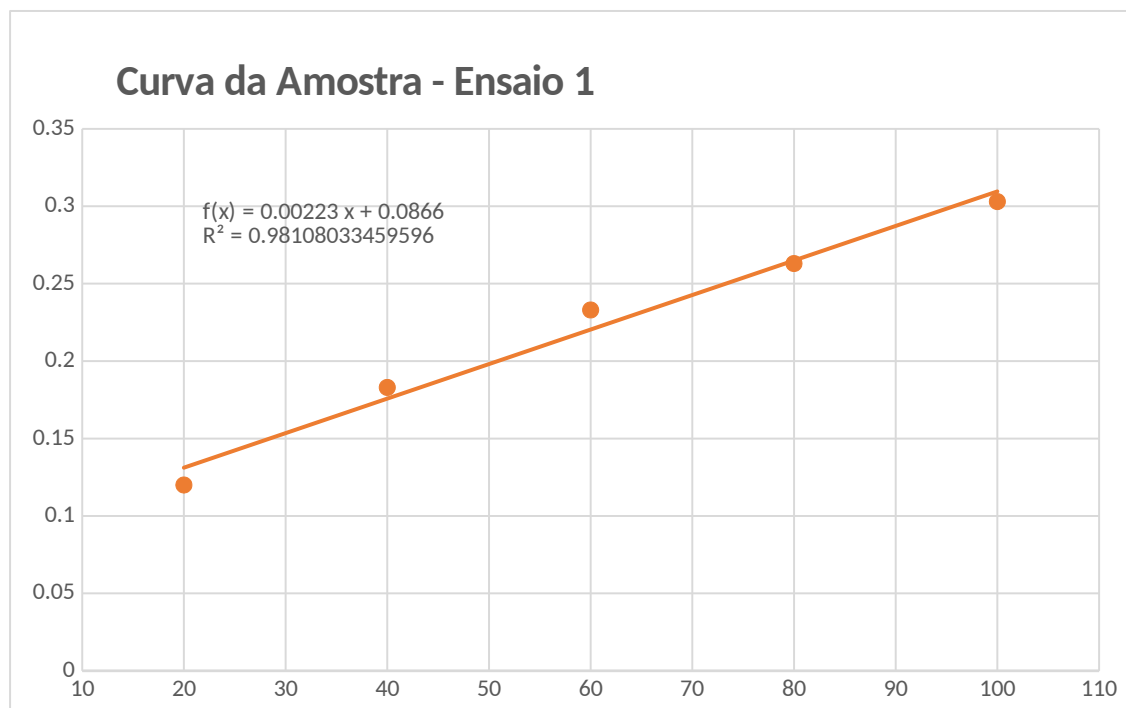
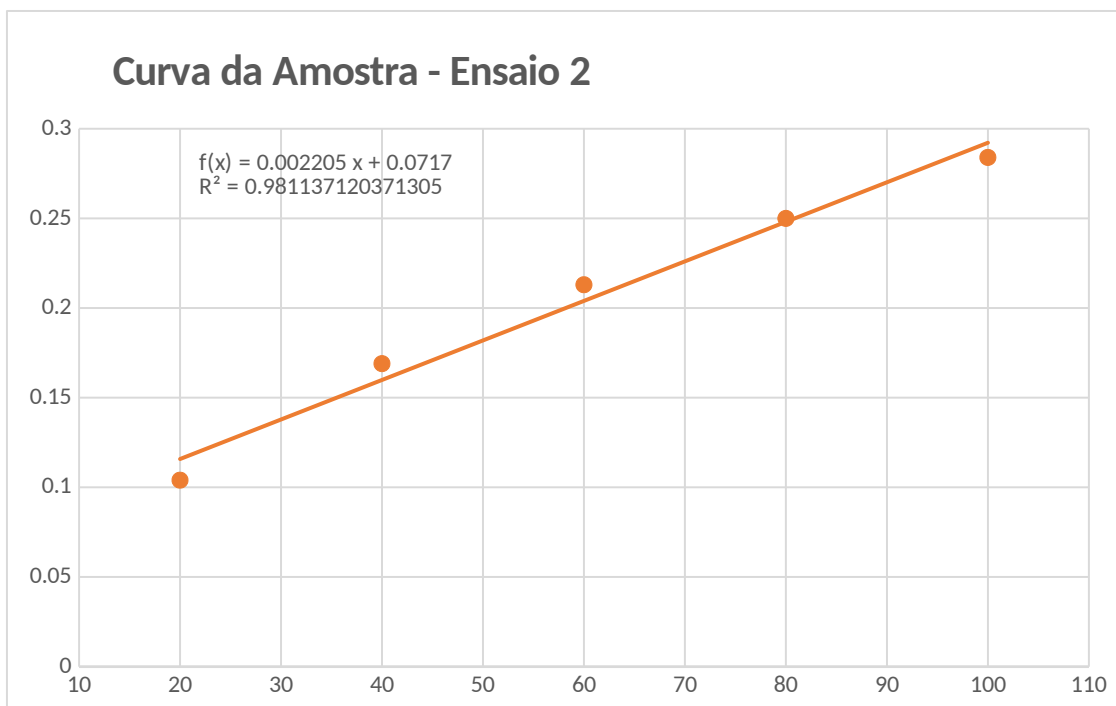


Tabela 14 – Absorvâncias da amostra para linearidade / ensaio 2.

[] µg.ml ⁻¹	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média
100	0,287	0,281	0,283	0,284
80	0,259	0,246	0,244	0,250
60	0,212	0,217	0,210	0,213
40	0,169	0,170	0,167	0,169
20	0,104	0,105	0,104	0,104

Fonte: Autor.

Gráfico 06 – Curva de linearidade da amostra / ensaio 2.



Fonte: Autor (2023).

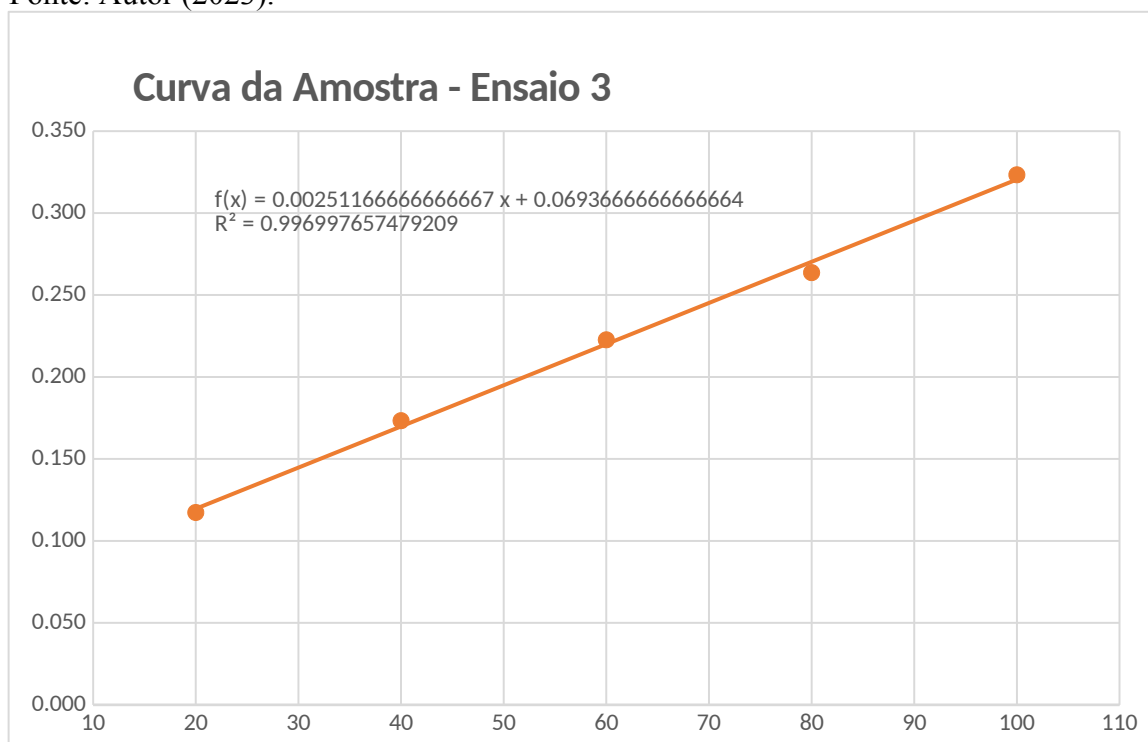
Tabela 15 – Absorbâncias da amostra para linearidade / ensaio 3.

[] μg.ml ⁻¹	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Média
100	0,319	0,325	0,326	0,323
80	0,261	0,263	0,267	0,264
60	0,219	0,225	0,224	0,223
40	0,168	0,177	0,175	0,173
20	0,114	0,121	0,117	0,117

Fonte: Autor.

Gráfico 07 – Curva de linearidade da amostra / ensaio 3.

Fonte: Autor (2023).



De acordo com os resultados observados, a curva apresenta um padrão de linearidade com R^2 acima de 0,98. A RDC 166/2017 da ANVISA preconiza que para o método ser considerado linear, o valor mínimo do R^2 deve ser 0,990. Esse valor foi alcançado com a curva construída a partir do ensaio 3, em que $R^2=0,997$ e a equação da reta:

$$y = 0,0025x + 0,0694 \quad (8)$$

Com base no ensaio 3, o método pode ser, portanto, considerado linear (Brasil, 2017).

4.6.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para o Limite de Detecção e Quantificação foi calculado desvio padrão do intercepto com o eixo Y das 3 curvas de calibração construídas para o padrão de ácido gálico, conforme preconizado pela RDC 166/2017 da ANVISA (Brasil, 2017). Os resultados estão demonstrados na tabela 16.

Tabela 16 – Desvio padrão do intercepto com o eixo y das 3 curvas de calibração.

Intercepto	Desvio Padrão
------------	---------------

Curva 1	0,2933	0,0013
Curva 2	0,2921	
Curva 3	0,2908	

Fonte: Autor.

O LD e o LQ foram então calculados de acordo com as equações 2 e 3 respectivamente obtendo os valores demonstrados abaixo:

$$LD = 10,725 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$LQ = 32,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

Esses resultados corroboram o teste realizado no ensaio 1 da construção da curva de calibração, onde observou-se a quebra da previsão matemática para os valores dos pontos com as concentrações de $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5\mu\text{g.mL}^{-1}$, isso ocorreu, portanto, pois os valores encontram-se muito distantes do limite de quantificação para o método. As leituras para $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por estarem relativamente próximas ao limite de quantificação, não apresentaram divergência estatística tão significativa.

4.6.4 Seletividade

A seletividade pode ser observada conforme a comparação dos coeficientes angular, coeficiente linear e o coeficiente de regressão, os valores próximos comprovam que o método é seletivo para quantificação de compostos fenólicos. Como interferentes ao analito, foram avaliadas ausência e presença de luz, mudanças na preparação das soluções reagentes de carbonato de sódio e Folin-Ciocalteu e o tempo de reação para 2h e para 30min. Os dados são de cinco repetições para a curva, usando os mesmos valores de concentração que foram usados para a linearidade e estão demonstrados na tabela 17.

Tabela 17 – Comparação de dados das curvas construídas para seletividade.

Curvas	a (coeficiente angular)	b (coeficiente linear)	r ² (coeficiente de regressão)
1	0,062	0,0691	0,997

2	0,092	0,072	0,981
3	0,090	0,084	0,990
4	0,089	0,086	0,987
5	0,061	0,069	0,991

Fonte: Autor.

É importante destacar que, a reação de Folin-Ciocalteu é uma das metodologias mais utilizadas para quantificação de compostos fenólicos, no entanto, o mecanismo básico do método baseia-se em uma reação de oxidação-redução, em vista disso, a diminuição do tempo de reação e alguns cuidados, como o descarte da amostra de extrato alcoólico, após a utilização, devem ser tomados, dado que, a própolis vermelha apresenta um alto teor de umidade e sofre oxidação com facilidade (Mariano, 2014).

4.6.5 Precisão

Os resultados obtidos no teste de precisão são demonstrados na tabela 18 abaixo:

Tabela 18 – Resultados obtidos para o teste de precisão.

[] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	ABS 1	ABS 2	ABS 3	CMD	DP	DPR
100	0,286	0,286	8 0,28	0,287	0,001	0,402
60	0,225	0,217	9 0,22	0,224	0,006	2,728
20	0,109	0,11	7 0,11	0,112	0,004	3,892

Legenda: ABS = Absorbância; CMD = concentração média determinada; DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo.

Fonte: Autor.

Todos os valores de DPR observados para as 3 concentrações estão abaixo de 5%, limite máximo estabelecido pela ISO 14502-1:2005, indicando que o método é preciso.

4.6.6 Robustez

Os ensaios de robustez foram realizados variando os parâmetros de presença ou ausência de luz durante as leituras e presença ou ausência de aquecimento durante o preparo da solução de carbonato de sódio. O tempo para todas as reações foi de 30min e as leituras foram realizadas a 760nm em três dias diferentes com a concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os seguintes critérios foram observados na análise:

Reação 1: Presença de luz + Reação de Na_2CO_3 preparada com aquecimento

Reação 2: Ausência de luz + Reação de Na_2CO_3 preparada sem aquecimento

Reação 3: Presença de luz + Reação de Na_2CO_3 preparada sem aquecimento

Os resultados estão demonstrados abaixo na tabela 19.

Tabela 19 – Valores das médias das absorbâncias encontradas.

	Reação 1	Reação 2	Reação 3
Dia 1	0,301	0,298	0,298
Dia 2	0,274	0,286	0,297
Dia 3	0,314	0,316	0,312

Fonte: Autor.

A partir desses resultados, foi realizada a análise de variância de fator único, obtendo-se o que se segue na tabela 20:

Tabela 20 – Resultado do teste de ANOVA para robustez.

RESUMO						
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância		
Reação 1	3	0,889	0,296333333	0,000416333		
Reação 2	3	0,9	0,3	0,000228		
Reação 3	3	0,907	0,302333333	7,03333E-05		
ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	5,48889E-05	2	2,74444E-05	0,115205224	0,8931076	5,1432528
Dentro dos grupos	0,001429333	6	0,000238222			
Total	0,001484222	8				

Fonte: Autor.

A partir da aplicação da ANOVA foi observado que não houve diferenças significativas nos resultados, dado que o valor-p $>0,05$ indica que não há diferenças significativas entre as médias dos grupos para um nível de significância de 5%, demonstrando que o método desenvolvido é robusto.

4.7 FORMULAÇÃO DO VERNIZ ODONTOLÓGICO

Das cinco concentrações de etilcelulose testadas para a formulação da base polimérica do verniz, conforme o item 3.7, a de 15% foi a que apresentou melhor viscosidade e interação com os outros componentes da formulação, portanto, ela foi a concentração utilizada para os demais testes.

Estudos citotóxicos *in vitro* para própolis vermelha realizados por Mendes (2019) demonstraram que a concentração de 10% foi a que apresentou melhor viabilidade celular. De Luca (2011) realizou estudo semelhante obtendo melhores resultados para própolis verde na concentração de 15%. Com base nesses estudos estabelecemos as concentrações de 5%, 10% e 15% para os testes realizados nesse trabalho.

A concentração de flúor a 5% é a que está presente nos vernizes comerciais. Testamos essa concentração como limite máximo de flúor para nossa formulação. Também foram testadas as concentrações de 1%, 2%, 3% e 4% para NaF em associação com a PVB.

O verniz foi formulado de acordo com as concentrações (m/m) apresentadas na tabela 21 abaixo:

Tabela 21 – Formação de precipitado nas concentrações testadas para a formulação do verniz odontológico.

Base (15% de etilcelulose)	PVB (%)	NaF (%)	Carboximetilcelulose (%)	EDTA (%)	Precipitado
1g	5	-	-	-	Ausente
1g	10	-	-	-	Ausente
1g	15	-	-	-	Ausente
1g	5	1	-	-	Presente
1g	5	2	-	-	Presente

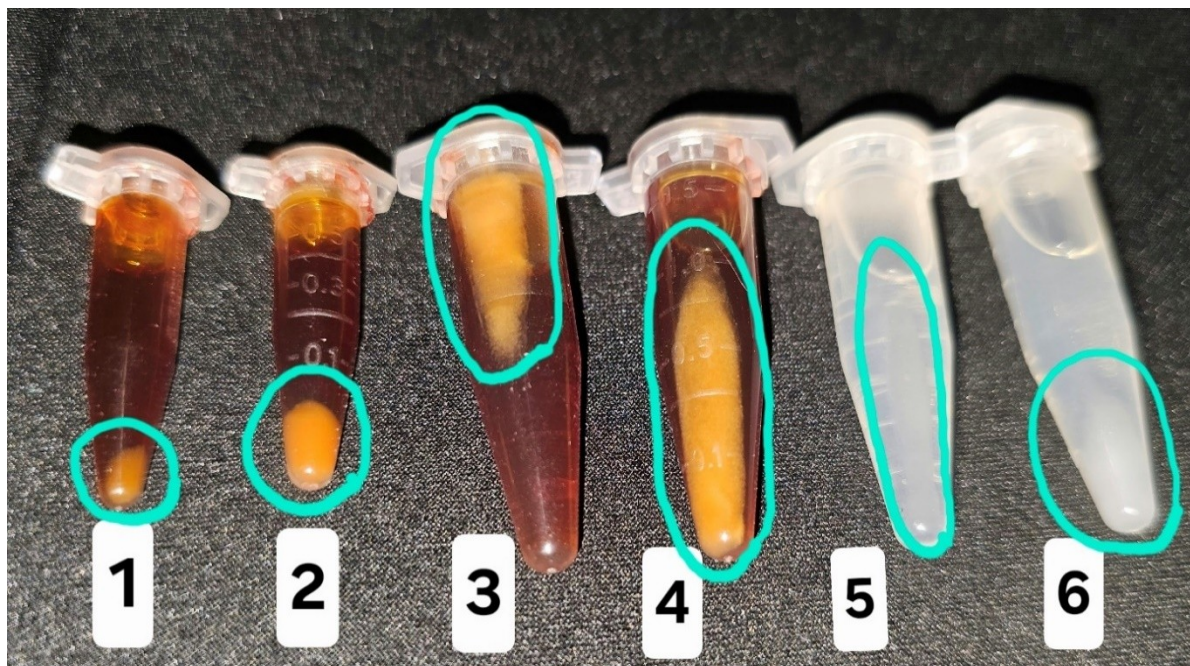
1g	5	3	-	-	Presente
1g	5	4	-	-	Presente
1g	5	5	-	-	Presente
1g	5	1,25	-	0,1	Presente
1g	5	2,5	-	0,1	Presente
1g	5	5	-	0,1	Presente
1g	5	5	1	-	Presente
1g	5	5	2	-	Presente
1g	5	5	5	-	Presente
1g	-	1	-	-	Presente
1g	-	2	-	-	Presente
1g	-	3	-	-	Presente
1g	-	4	-	-	Presente
1g	-	5	-	-	Presente

Fonte: Autor.

Conforme se pode constatar a partir desses resultados, há uma incompatibilidade visível entre o NaF e a base de etilcelulose. Foram feitas tentativas de resolução para essa

incompatibilidade utilizando-se agentes suspensores, como a carboximetilcelulose e o EDTA, mas não se obteve sucesso em nenhuma das concentrações testadas. Foram então preparados vernizes apenas com flúor, sem PVB, nas concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5%. Em todos os casos foi observada a formação de precipitado. Alguns exemplos são mostrados abaixo nas figuras 07 e 08.

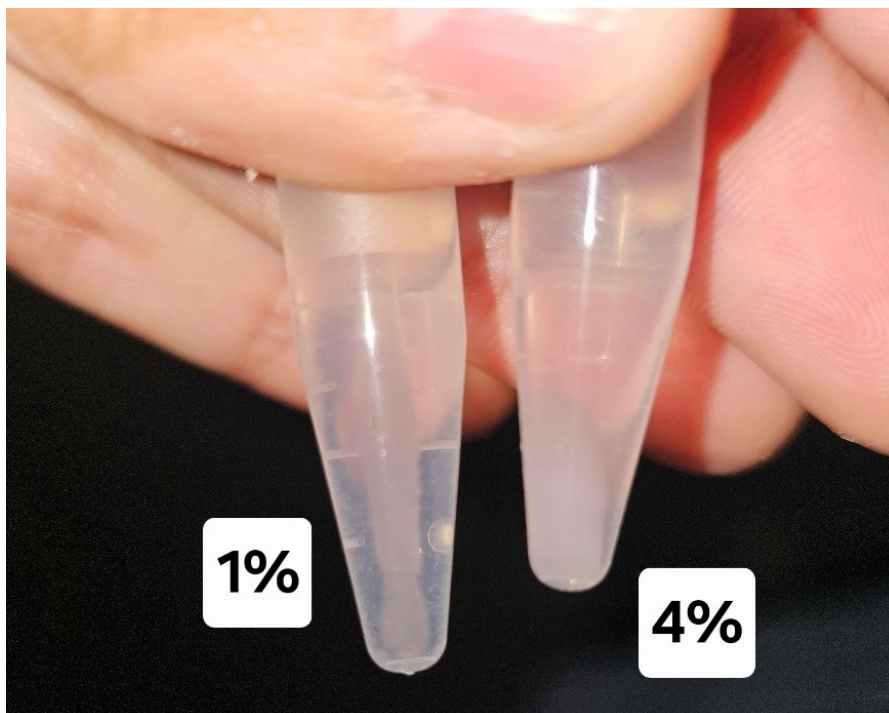
Figura 07 – Testes de interação entre NaF e outros componentes da formulação.



Legenda: 1 – PVB 5% + NaF 1%; 2 – PVB 5% + NaF 5%; 3 – PVB 5% + NaF 2,5% + EDTA 0,1%; 4 – PVB 5% + NaF 5% + EDTA 0,1%; 5 – NaF 1%; 6 – NaF 4%.

Fonte: Autor (2024).

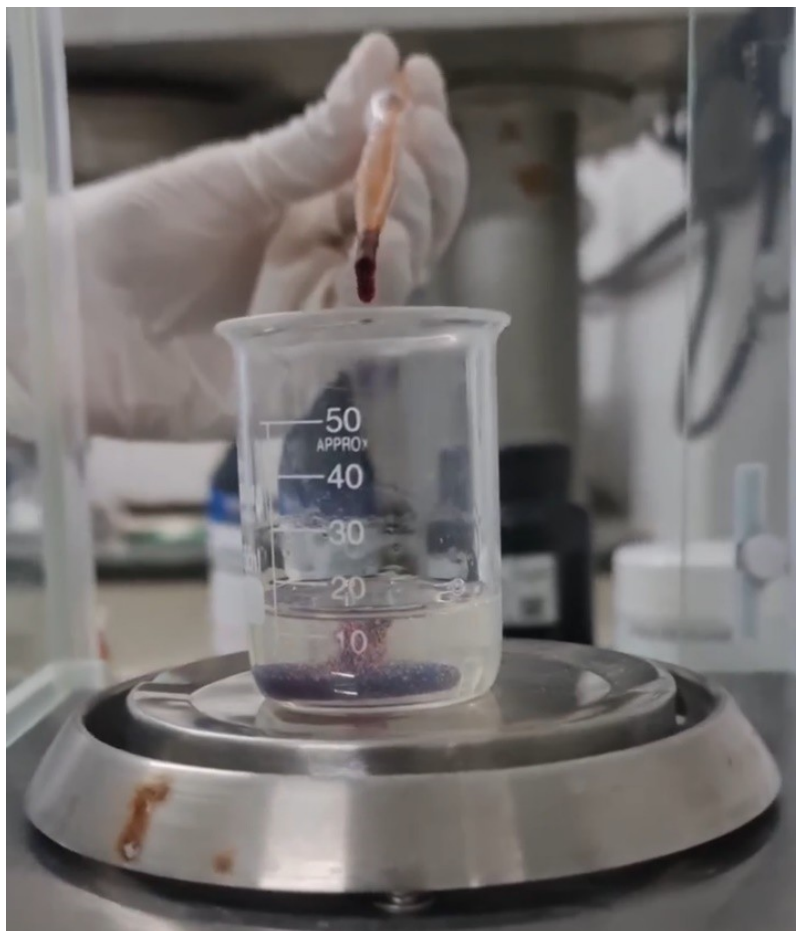
Figura 08 – Testes de interação entre NaF a 1% e 4% na base polimérica do verniz.



Fonte: Autor (2024).

Foram realizados testes de formulação com o extrato líquido e com o extrato seco para as concentrações escolhidas. Como o extrato líquido utiliza o mesmo solvente que o utilizado para formular a base do verniz, ao tentar fazer a mistura dos dois componentes a viscosidade da base era diminuída de forma inversamente proporcional à concentração de PVB utilizada (figura 09). Portanto, foi observado que, principalmente para concentrações menores, o mais recomendado seria o uso do extrato seco. Conforme observado também, não há nenhuma incompatibilidade visível entre o verniz base e o extrato seco de PVB em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 09 – Incorporação do extrato líquido de PVB à base do verniz.



Fonte: Autor (2024).

O verniz se apresenta como um líquido viscoso, de coloração vermelha intensa e brilhante (figura 10).

Apresenta densidade relativa de 0.908 e pH de 5.5, que foi comparado com o estudo feito por Carvalho (2011), que realizou testes de pH nos vernizes Duraphat[®], pH=4.5, Duofluorid[®] e vernizes contendo glicerofosfato de cálcio, pH=8.0. Indicando que o verniz de PVB está dentro dos padrões comerciais.

Figura 10 – Apresentação final do verniz formulado.



Fonte: Autor (2024).

Os valores medidos para viscosidade dinâmica, encontrados para o verniz final são indicados abaixo na tabela 22.

Tabela 22 – Valores de viscosidade dinâmica do verniz.

Rotação (rpm)	Viscosidade (mPa.s)
10	123,6
20	113,7
30	110,6
40	110,2

Fonte: Autor.

Os valores reportados na literatura consultada foram medidos para viscosidade cinemática, que está inversamente relacionada com a densidade da formulação. O valor de densidade da formulação, obtido de acordo com o indicado na metodologia, foi de 0,908. Os valores de viscosidade dinâmica foram aqui convertidos para viscosidade cinemática através da equação 10, e estão demonstrados na tabela 23.

$$1 \text{ mPa.s} = 1 \text{ cSt} \times \text{Densidade} \quad (10)$$

Onde:

mPa.s: Milipascal segundo

cSt: centistoke

Tabela 23 – Valores de viscosidade cinemática do verniz.

Rotação (rpm)	Viscosidade (cSt)
10	136,1
20	125,2
30	121,8
40	121,3

Fonte: Autor.

Asian, Quenta e Castillo (2021) fizeram um estudo verificando a viscosidade e molhabilidade de três marcas comerciais de vernizes fluoretados: Duraphat®, Clinpro™ White Varnish e Flúor Protector®, além de um produto controle produzido pelos autores. A viscosidade de cada verniz foi de 841.10 ± 16.2 ; 35.27 ± 0.06 ; 21.60 ± 0.20 e 14.23 ± 0.21 , respectivamente. Independente da rotação (rpm) aplicada, o verniz de PVB na base de etilcelulose produzido no nosso estudo, manteve viscosidade maior do que duas marcas comerciais e do verniz desenvolvido por Asian, Quenta e Castillo. No entanto, possui viscosidade seis vezes menor que o padrão ouro, o Duraphat®. Sendo assim, o verniz

produzido encontra-se dentro dos parâmetros de viscosidade aceitáveis para vernizes fluoretados comerciais.

5. CONCLUSÃO

O extrato de própolis vermelha brasileira apresentou características compatíveis com a literatura, identificamos a presença de compostos fenólicos, componentes reportados na literatura como responsáveis pela ação antimicrobiana e anti-inflamatória, alvos importantes para o tratamento e prevenção da cárie dentária.

O método analítico para quantificação de compostos fenólicos na PVB foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos em normativa da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

A técnica para a produção da base polimérica de etilcelulose se mostrou simples e exitosa, bem como a incorporação do extrato de PVB a essa base produzida. Entretanto, a incorporação do NaF à formulação se mostrou dificultosa, uma vez que foi observada uma clara incompatibilidade com o verniz base.

O verniz produzido à base de Própolis Vermelha Brasileira apresentou características organolépticas e físico-químicas consistentes com os vernizes já utilizados comercialmente em todas as concentrações e condições analisadas, se apresentando, portanto, como uma possível alternativa terapêutica para o tratamento e prevenção da cárie.

REFERÊNCIAS

ABANTO J, BERTI GO, MIGUITA L, BONECKER M. Monitoring of caries disease by risk assessments and activity. **Rev. Gaúcha de Odontologia**, v. 64, n. 1, 2016.

ALEJANDRA, B.M; DANIEL, O.M. Virulence factors of Streptococcus mutans related to dental caries. **Staphylococcus and Streptococcus** v. 11, 2020.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R; 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. **J. Ethnopharmacol.** ed.113, P. 278-283, 2007.

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.C. Chemical and microbiological characterization of tinctures and

microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 7, p. 280-287, 2017.

AMISSAH, F.; ANDEY, T.; AHLSCHEDE, K. M. Nanotechnology-based therapies for the prevention and treatment of *Streptococcus mutans*-derived dental caries. **Journal of Oral Biosciences**. v. 63, p. 327-336, 2021.

ANTUNES J. L. F.; PERES M.A.; CRIVELLO JÚNIOR O. Epidemiologia da saúde bucal. In: **Fundamentos de odontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 441–2.

ASIAN, J.; QUENTA, E.; CASTILLO, JI. Do viscosity and wettability of fluoride varnishes affect their fluoride release? **Journal Of Clinical And Experimental Dentistry**, [S.L.], p. 221-226, 2021. *Medicina Oral*, S.L. <http://dx.doi.org/10.4317/jced.56985>.

BAIK, A.M.; ALAMOUDI, N.M.; EL-HOUSSEINY, A.A.; ALTUWIRQI, A.A. Fluoride Varnishes for Preventing Occlusal Dental Caries: A Review. **Dentistry Journal**. v. 9, 2021.

BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**. v. 31, n. 1, p. 3–15, 2000.

BANKOVA, V.S.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**. v. 8, n. 1, 2014.

BATISTA, T. R. M., VASCONCELOS, M. G., VASCONCELOS, R. G. Fisiopatologia da cárie dentária: entendendo o processo carioso. **Salusvita**, Bauru, v. 39, n. 1, p. 169-187, 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. v. 1, 6. ed., Brasília, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 141, p. 87, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 216, p. 97, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 658, de 30 de março de 2022. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 62, p. 320, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Instrução Normativa SDA nº 03, de 19 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Polén Apícola, Propólis e Extrato de Propólis. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal**: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Ministério da Saúde, 2012.

BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, E.S.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L.; MAYER, M.P.A. Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in lps-activated macrophages. **PLoS One**, 2015.

BUZALAF, M.A.R.; PESSAN, J.P.; HONÓRIO, H.M. Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control. **Karger Publishers**. 2011.

CARVALHO, Grimaldo Jorge Lemos. **PRÓPOLIS: ORIGEM BOTÂNICA E SUA APLICAÇÃO NAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2019.

CARVALHO, Thiago Saads. **Avaliação do efeito preventivo do verniz contendo glicerofosfato de cálcio frente a desafios cariogênicos e erosivos**. 2011. 95 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CCANA-CCAPATINTA, G.V.; MEJIA, J.A.A.; TANIMOTO, M.H.; GROPPPO, M.; CARVALHO, J.; BASTOS, J.K. Dalbergia ecastaphyllum (L.) Taub. and Symphonia globulifera L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis, **Molecules** v.25, 2020.

CHEN, L.; CHENG, C. ; LIANG, J. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. **Food Chemistry**, v. 170, p. 10-15, 2015.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Fundação Calouste Gulbenkian.v. 3, ed. 5. Lisboa, 1994

CZAKO, M.; MARTON, L. A heartwood pigment in Dalbergia cell cultures. **Phytochemistry**. v.57, p. 1013-1022, 2001.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT P.; PARK, Y.K. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med**. v.5, p. 435-441, 2008.

DE LUCA, Mariana Passos. **VERNIZ À BASE DE QUITOSANA CONTENDO PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, CITOTOXICIDADE E PERFIL DE LIBERAÇÃO**. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado), Curso de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

DOMINGUES, J. J.; OLIVEIRA, L.T.A.; COSTA, M.D.M.A.; SILVA, L.A.M.; NASCIMENTO, F.; DIETRICH, L. Uso de fitoterápicos e demais componentes vegetais e minerais na fabricação de produtos odontológicos naturais: Revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n.3, e57610313678, 2021.

FABREGAS, R.; RUBINSTEIN, J. On the initial propagation of dental caries. **Journal of The Royal Society Interface**. v. 11, 2014.

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. 367-279, 2016.

FROZZA C.O.S.; GARCIA C.S.C.; GAMBATO G.; SOUZA, M.D.O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLADOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Toxicol**. v.53, p. 137-142, 2013.

GIACAMAN, R.A.; MUÑOZ-SANDOVAL, C.; NEUHAUS, K.W.; FONTANA, M.; CHALAS, R. Evidence-based strategies for the minimally invasive treatment of carious lesions: Review of the literature. **Adv Clin Exp Med**, Talca-Chile, v. 27, n. 7, p. 1009- 1016, 2018.

GLICK, M.; BERGQVIST, D.; KLEINMAN, D.V.; VUJICIC, M.; WATT, R.C.; WEYANT, R.J. A new definition for oral health developed by the FDI World Dental Federation opens the door to a universal definition of oral health. **J. Am. Dent. Assoc**. v.147, p. 915–917, 2016.

GOMEZ, J. Detection and diagnosis of the early caries lesion. **BMC Oral Health**. v. 15, n. 1, p. 53, 2015.

HAUSEN, B.M.; WOLLENWEBER, E.; SENFF, H.; POST, B. Propolis allergy. (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. **Contact Dermatitis**. v. 17, n. 3, p. 171–177, 1987.

HELFENBERG, K.D. The analysis of beeswax and propolis. **Chemiker Zeitungm**. v. 31, p. 987–998, 1908.

IRIGOITI, Y. ; NAVARRO, A.S. ; YAMUL, D.K. ; LIBONATTI, C. ; TABERA, A. ; BASUALDO, M. The use of propolis as a functional food ingredient: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 115, p. 297-306, 2021.

ISAKSSON, M.; BRUZE, M.; BJÖRKNER, B.; NIKLASSON, B. Contact allergy to Duraphat. **Eur. J. Oral Sci**. ed. 101, p. 49-51, 1993.

ISO 14502-1:2005 **Determination of substances characteristic of green and black tea**. ed. 1, 2005

KAWAKITA, E. T. ; SOUZA, E.A. ; UEHARA, D.M.; ORSI, R.O. Avaliação da vida útil do extrato hidroalcoólico de própolis mantido sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Asa – atas de saúde ambiental**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 33-46, jan./abr., 2015.

KOCAK, N.; CENGİZ-YANARDAG, E. Clinical performance of clinical-visual examination, digital bitewing radiography, laser fuorescence, and near-infrared light transillumination for detection of non-cavitated proximal enamel and dentin caries. **Lasers in Medical Science**. v. 35, n. 7, p. 1621–1628, 2020.

KOHN, W.G.; MAAS, W.R.; MALVITZ, D.M.; PRESSON, S.M.; SHADDIX, K.K. Recommendations for Using Fluoride to Prevent and Control Dental Caries in the United States. 2021.

LAZZAROTTO, S. R. S.; SCHERRUTH, M. S. F.; CALIXTO, P. S.; CARRARO, M. M.; SILVEIRA, A. C.; LAZZAROTTO, M. “Método de Folin Ciocalteu adaptado para quantificar polifenóis em extratos de erva-mate”. **Revista Movimenta**, v. 13, nº 3, p. 419-42. 2020.

LIMA, A. B. S.; BATISTA, A.S.; SANTOS, M.R.C.; ROCHA, R.S.; SILVA, M.V.; FERRÃO, S.P.B.; ALMEIDA, V.V.S.; SANTOS, L.S. Spectroscopy NIR and MIR toward predicting simultaneous phenolic contents and antioxidant in red propolis by multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 367, 2022.

LUBNA, A.; MUSHTAQ, M.; SIDDIQUI, A.R. ; KHALID, A.; UL-HAQ, Z. Targeting glucosyltransferases to combat dental caries: Current perspectives and future prospects. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 278, 2024.

MACEDO, Rayssa Prado; MARRA, Vanessa Ferreira. **INFLUÊNCIA DE AGENTES REMINERALIZANTES NA RUGOSIDADE SUPERFICIAL DO ESMALTE DENTÁRIO ERODIDO: ESTUDO IN VITRO**. 2019. 25 f. TCC (Graduação) - Curso de Odontologia, Universidade de Uberaba, Uberaba, 2019.

MARINHO, V.C.; WORTHINGTON, H.V.; WALSH, T.; CLARKSON, J.E. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst. Rev**. 2013.

MARIANO, Juliano Souza. **EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DOIS TIPOS DE PRÓPOLIS: VERDE (MINEIRA) E VERMELHA (ALAGOANA)**. 2014. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MARTINEZ-MIER, E.A.; SHONE, D.B.; BUCKLEY, C.M.; ANDO, M.; LIPPERT, F.; SOTO-ROJAS, A.E. Relationship between enamel fluorosis severity and fluoride content. **Journal of Dentistry**. v. 46, p. 42-46, 2016.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2ª ed. Fortaleza: UFC, 1997. 126 p.

MATOS, F.J.A.; GOTTLIEB, O.R.; ANDRADE, C.H.S. Flavonoids from *D. ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 825-826, 1975.

MAYHÖFER, T.G; PAHLOW, S.; POPP, J. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. **ChemPhysChem**, v. 21, p. 2029-2046, 2020.

MENDES, Suellen de Lima. **AVALIAÇÃO “IN VIVO” DA EFICÁCIA DE GEL A BASE DE PRÓPOLIS VERMELHA NO TRATAMENTO DA HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA**. 2019. 77f. Dissertação (Mestrado), Curso de Odontologia, UNIARARAS, Araras, 2019.

MENDEZ-PFEIFFER, P.; JUÁREZ, J. ; HERNÁNDEZ, J. ; TABOADA, P. ; VIRUÉS, C. ; VALENCIA, D. ; VELÁZQUEZ, C. Nanocarriers as drug delivery systems for propolis: A therapeutic approach. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 65, e102762, 2021.

MENDONÇA, I.C.G; PORTO, I.C.C.M.; NASCIMENTO, T.G.; SOUZAS, N.O.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; MOUSINHO, K.C.; SANTOS, A.F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 357-368, 14 out. 2015.

MOMENI, S.; CAO, X.; XIE, B.; RAINEY, K. CHILDERS, N.K.; WU, H. Intraspecies interactions of *Streptococcus mutans* impact biofilm architecture and virulence determinants in childhood dental caries. **American Society for Microbiology**. v. 9, 2024.

MOMOI, Y.; HAYASHI, M.; FUJITANI, M.; FUKUSHIMA, M.; IMAZATO, S.; KUBO, S.; NIKAIDO, T.; SHIMIZU, A.; UNEMORI, M.; YAMAKI, C. Clinical guidelines for treating caries in adults following a minimal intervention policy--evidence and consensus-based report. **Journal of Dentistry**. v. 40, n. 2, p. 95–105, 2012.

MONTI, M.; BERTI, E.; CARMINATI, G.; CUSINI, M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**. v. 9, n. 2, p. 163, 1983.

MORETTO, M.J. ; DELBEM, A.C.B. ; MANARELLI, M.M. ; PESSAN, J.P. ; MARTINHON, C.C.R. Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: an in situ/ex vivo study. **Journal Of Dentistry**, [S.L.], v. 41, n. 12, p. 1302-1306, dez. 2013. Elsevier BV.

MOTALLAEI, M.N.; YAZDANIAN, M.; TEBYANIAN, H.; TAHMASEBI, E.; ALAM, M.; ABBASI, K.; SEIFALIAN, A.M.; RANJBAR, R.; YAZDANIAN, A. The Current Strategies in Controlling Oral Diseases by Herbal and Chemical Materials. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2021.

NETO, E. M. R. **DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DE UM VERNIZ DENTÁRIO DE PRÓPOLIS SOBRE REDUÇÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EM CRIANÇAS**. Tese de doutorado. 101p. Universidade Federal do Ceará. 2017.

NUNES, Danielle Devequi Gomes. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTIMICROBIANA E LEISHMANICIDA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS OBTIDOS PELO MÉTODO CONVENCIONAL OU POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA**. 2019. 72 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

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, n. 9, pp. 2502–2506, 2002.

PAPOTTI, G.; BERTELLI, D.; BORTOLOTTI, L.; PLESSI, M. Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, n. 11, p. 2852–2862, 2012.

PICCINELLI, A.L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** v. 59, p. 6484-6491, 2011.

PIETTA, P.G.; GARDANA, C.; PIETTA, A.M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**. v. 73, n. 1, pp. S7– S20, 2002.

RUFATTO, L. C.; SANTOS, D.A.; MARINHO, F.A.; HENRIQUES, J.A.P; ROESCH-ELY, M.; MOURA, S. Red própolis; Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, p. 591–598, 2017.

SALATINO, A.S.M.L.F. Brazilian red propolis: legitimate name of the plant resin source. **MOJ Food Processing & Technology**. v. 6, p. 21-22, 2018

SANTOS, Lucas Adriel Tavares. **CONTROLE DE QUALIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS COMERCIALIZADOS EM MACEIÓ**. 2020. 72 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2020.

SCHMIDT, E.M.; STOCK, D.; CHADA, F.J.G; FINGER, D.; SAWAYA, A.C.H.F; EBERLIN, M.N.; FELSNER, M.L.; QUIÁIA, S.P.; MONTEIRO, M.C. A Comparison between Characterization and Biological Properties of Brazilian Fresh and Aged Propolis. **BioMed Research International**. 2014.

SHARMA, P.R. Allergic contact stomatitis from colophony. **Dent. Updat.** ed.33, p. 440-442, 2006.

SHELLIS, R.P.; WILSON, R.M. Apparent solubility distributions of hydroxyapatite and enamel apatite. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 278, p. 325-332, 2004.

SHRESTHA, A.; HOANG, H.; GARDNER, S.; PRADHAN, A.; CROCOMBE, L. *et al.* Global early childhood caries: a review of literature. **Nepal Med Coll J**. v. 23, p. 264-271, 2021.

SILVA B.B.; ROSALEN P.L.; CURY J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.5, p. 313-316, 2008.

SILVA, F.A.; BIZERRA, A.M.C.; FERNANDES, P.R.D.; Testes Fítoquímicos Em Extratos Orgânicos De Bixa Orellana L (Urucum). **Holos**. v.2, ed. 34, p. 484-498, 2018.

SILVA, H. C. A.; ESPINOSA, M.M.; MOI, G.P.; FERREIRA, M.G. Cárie dentária e fatores associados aos 12 anos na Região Centro-Oeste do Brasil em 2010: um estudo transversal. **Ciênc. saúde coletiva** 25 (10), 2020.

SILVA, N.B.S.; CALEFI, G.G.; TEIXEIRA, S.C.; FERNANDES, T.A.M.; TANIMOTO, M.H.; CASSANI, N.M.; JARDIM, A.C.G.; AMBROSIO, M.A.L.V.; VENEZIANI, R.C.S.; BASTOS, J.K.; FERRO, E.A.V.; BARBOSA, B.F.; SILVA, M.J.B.; SABINO-SILVA, R. MARTINS, C.H.G. Brazilian red propolis reduces the adhesion of oral biofilm cells and the *Toxoplasma gondii* intracellular proliferation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 181, 2024.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v. 299, P. 152-178, 1999.

SOARES, R. S. **Estudo Fitoquímico de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Fabaceae)**. 2012. 125 p. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

SOUSA, F.S.O.; SANTOS, A.P.P.; NADANOVSKY, P.; HOJOEL, P.P.; CUNHA-CRUZ, J.; OLIVEIRA, B.H. Fluoride Varnish and Dental Caries in Preschoolers: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Caries Research**. v. 53, p. 502-513, 2019.

VERGILIVS MARO, PUBLIUS. **ÆNEIS**. Liber VI, linea 95, Sec I a.C.

WAGH, V.D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**. 2013.

WARRETH, A. Dental Caries and Its Management. **International Journal of Dentistry**. 2023.

WIEGAND, A., BISCHSEL, D.; MAGALHÃES, A.C.; ATTIN, T. Effect of sodium, amine and stannous fluoride at the same concentration and different pH on in vitro erosion. **J Dent**. 2009 Aug;37(8):591-5.

WHO. **Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030**. 2022.

WHO. **Sugar and Dental Caries**. Who Technical Information Note. 2017.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of Propolis: Some Parameters and Procedures for Chemical Quality Control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, p. 99-105. 1998.

WOLLENWEBER, E.; HAUSEN, B.M.; GREENAWAY, W. Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru. **Bulletin de Liaison—Groupe Polyphenols**. v. 15, p. 112–120, 1990.

ZULHENDRI, F.; FELITTI, R.; FEARNLEY, J.; RAVALIA, M. The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. **Journal of Oral Biosciences**, v. 63, p. 23-34, 2021.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO COM RESULTADOS PARCIAIS EM MAIO DE 2024. REVISTA QUALIS A4.



DOI: 10.55905/cuadv16n2-055

Originals received: 01/02/2024
Acceptance for publication: 02/05/2024

Desenvolvimento de verniz odontológico à base de própolis vermelha para tratamento e prevenção da cárie dentária

Development of dental varnish based on red propolis for the treatment and prevention of dental caries

Desarrollo de barniz dental basado en propóleo rojo para el tratamiento y prevención de caries dentales

Lucas Alisson do Nascimento Santos

Graduado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP: 50670-420

E-mail: lucas.nsantos@ufpe.br

Áquila Priscilla Ferreira de Mendonça

Graduanda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP: 50670-420

E-mail: aquila.mendonca@ufpe.br

Paulo André Gomes Barros

Mestre em Odontologia pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP: 50670-420

E-mail: paulo.gbarros@ufpe.br

Maria José Cristiane da Silva

Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, CEP: 50670-420

E-mail: jose.cristiane@ufpe.br

ANEXO B – COMPROVANTE DE CADASTRO NO SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº ABC4614

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	ABC4614
Usuário:	Rosali Maria Ferreira da Silva
CPF/CNPJ:	025.322.244-36
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

dalbergia ecastophyllum

Título da Atividade:	DESENVOLVIMENTO DE VERNIZ ODONTOLÓGICO À BASE DE PRÓPOLIS VERMELHA PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA CÁRIE DENTÁRIA
----------------------	---

Equipe

Rosali Maria Ferreira da Silva	Universidade Federal de Pernambuco
Pedro José Rolim Neto	Universidade Federal de Pernambuco
Arnaldo de França Caldas Júnior	Universidade Federal de Pernambuco

Data do Cadastro: **24/04/2023 13:55:28**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:56** de **24/04/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**