

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos acrescidos  
de geoprópolis (*Melipona scutellaris*): avaliação da bioadesividade**

TABATA EMI SILVEIRA FURUKO

ARARAQUARA

2012

Tabata Emi Silveira Furuko

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS LÍQUIDO-  
CRISTALINOS ACRESCIDOS DE GEOPRÓPOLIS (*MELIPONA SCUTELLARIS*):  
AVALIAÇÃO DA BIOADESIVIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Farmácia-Bioquímica da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
de Araraquara, da Universidade  
Estadual Paulista para obtenção do  
grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Departamento de Fármacos e Medicamentos

Araraquara 2012

Dedico este trabalho aos meus pais, Edson e Magna,  
e irmãos, Agatha, Cayo e Igor,  
por todo apoio durante a minha fase acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta e indiretamente, contribuíram para este trabalho.

Primeiramente à Deus, pela oportunidade;

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela paciência, dedicação, compreensão e sabedoria;

Ao Prof. Dr. Pedro Luis Rosalen da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por disponibilizar os dados de estudos com a fração hexânica de Geoprópolis;

À Giovana Calixto pela grande ajuda, paciência e conhecimento;

Ao Matheus Garcia, que foi um grande companheiro de laboratório;

Aos amigos Daniel Martins, Pedro Sundfeld, Roberta Nobre e Gabriela Robi pela amizade e apoio por todos esses anos de graduação;

Ao Thiago Barral, pelo companheirismo, apoio e carinho de sempre.

“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”

-Mahatma Gandhi-

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	20
3. DESENVOLVIMENTO.....	21
3.1. Materiais.....	21
3.2. Equipamentos.....	21
3.3. Métodos.....	21
3.3.1. Preparação da dispersão de quitosana.....	21
3.3.2. Construção do diagrama de fases ternário.....	22
3.3.3. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados.....	22
3.3.3.1. Microscopia de luz polarizada.....	23
3.3.3.2. Análise reológica contínua.....	23
3.3.3.3. Análise do perfil de textura.....	23
3.3.3.4. Bioadesão <i>in vitro</i> em superfície de dente bovino.....	24
3.3.3.4.1. Preparação de saliva humana.....	24
3.3.3.4.2. Obtenção do disco de dente bovino.....	24
3.3.3.4.3. Avaliação <i>in vitro</i> da força bioadesiva.....	25
3.3.4. Incorporação do extrato de própolis nos sistemas selecionados.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Diagrama de fases ternário e caracterização visual dos sistemas.....	27
4.2. Escolha dos Sistemas - 23, 24 e 25.....	29
4.3. Microscopia de Luz Polarizada (MLP).....	30

4.4. Estudo do Comportamento Reológico.....	34
4.5. Ensaio de Bioadesão.....	36
4.6. Análise de Textura (TPA).....	37
5. CONCLUSÃO.....	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## RESUMO

A alta incidência da cárie no Brasil vem despertando muito interesse para estudos que visem combatê-la. Tem-se observado a procura pela utilização de produtos naturais (plantas medicinais e resinas) que buscam atividade contra a principal bactéria causadora da cárie, que é o *Streptococcus mutans*, entre estas a geoprópolis (*Melipona scutellaris*). Todavia, apesar de os estudos mostrarem ação destes produtos de origem animal contra este micro-organismo, muitas vezes a baixa substantividade (bioadesão) deste material ao substrato determina uma baixa efetividade. Este estudo promoveu o desenvolvimento de um sistema líquido cristalino objetivando aumento da substantividade da própolis. Foram desenvolvidos sistemas constituídos por dispersão de quitosana, ácido oleico e álcool cetílico propoxilado e etoxilado (Procetyl<sup>®</sup> AWS), de acordo com o diagrama de fases ternário. Foram selecionadas 3 formulações, as quais foram submetidas a ensaios de microscopia de luz polarizada, análise de textura, bioadesão e reologia. Os resultados mostraram que os sistemas são viáveis para incorporação do extrato de própolis, aumentando sua bioadesão em ensaios *in vitro*.

## **ABSTRACT**

The high incidence of caries in Brazil is attracting a lot of interest for studies that aim to combat it. It has been observed the demand for use of natural products (medicinal plants and resins), seeking activity against the main bacterium that causes caries, which is *Streptococcus mutans*, among them propolis (*Melipona scutellaris*). However, studies showing activity of plant products against this micro-organism, a low substantivity of this products to the substrate determines a low effectiveness. This study promoted the development of a liquid crystalline system aiming increased substantivity of propolis. Systems were developed consisting of dispersions of chitosan 5%, oleic acid and alkoxyated cetyl alcohol (Procetyl<sup>®</sup> AWS) according to the ternary phase diagram. Three formulations were selected, which were subjected to tests of polarized light microscopy analysis, texture, rheology and bioadhesion. The results showed that the systems are viable for incorporation of propolis extract, increasing the *in vitro* bioadhesion.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Bioadesão.....	19
<b>Figura 2.</b> Diagrama de Fases Ternário.....	27
<b>Figura 3.</b> Análise do Diagrama de Fases Ternário.....	29
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografia da formulação 23 (água:óleo:tensoativo = 40:20:40) em aumento de 20x A) Sistema 23 Ácido B) Sistema 23 Neutro.....	31
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografia da formulação 23 (água:óleo:tensoativo = 40:20:40) acrescida de fração Hexânica de Geoprópolis 400µg/mL, em aumento de 20x C) Sistema 23 Ácido com Extrato D) Sistema 23 Neutro com Extrato.....	31
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografia da formulação 24 (água:óleo:tensoativo = 30:30:40) em aumento de 20x E) Sistema 24 Ácido F) Sistema 24 Neutro.....	32
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografia da formulação 24 (água:óleo:tensoativo = 30:30:40) acrescida de fração Hexânica de Geoprópolis 400µg/mL, em aumento de 20x G) Sistema 24 Ácido com Extrato H) Sistema 24 Neutro com Extrato.....	32
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia da formulação 25 (água:óleo:tensoativo = 20:40:40) em aumento de 20x I) Sistema 24 Ácido J) Sistema 24 Neutro.....	32
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografia da formulação 25 (água:óleo:tensoativo = 20:40:40) acrescida de fração Hexânica de Geoprópolis 400µg/mL, em aumento de 20x K) Sistema 25 Ácido com Extrato L) Sistema 25 Neutro com Extrato.....	33
<b>Figura 10.</b> Reograma dos ensaios de fluxo dos sistemas 23 (F1), 24(F2) e 25(F3) ácidos sem incorporação da Formulação Hexânica Geoprópolis 400µg/ML.....	34
<b>Figura 11.</b> Reograma dos ensaios de fluxo dos sistemas 23(F1), 24(F2) e 25(F3) neutros sem incorporação da Formulação Hexânica Geoprópolis 400µg/mL.....	34

<b>Figura 12.</b> Reograma dos ensaios de fluxo dos sistemas 23 (F1), 24(F2) e 25(F3) ácidos incorporados com Formulação Hexânica Geoprópolis 400µg/mL.....	35
<b>Figura 13.</b> Reograma dos ensaios de fluxo dos sistemas 23(F1), 24(F2) e 25(F3) neutros incorporados com Formulação Hexânica Geoprópolis 400µg/mL.....	35
<b>Figura 14.</b> Dados de compressibilidade da análise de textura.....	39
<b>Figura 15.</b> Dados de dureza da análise de textura.....	40
<b>Figura 16.</b> Dados de adesividade da análise de textura.....	40
<b>Figura 17.</b> Dados de coesividade da análise de textura.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição (%) dos sistemas selecionados para a caracterização físico-química.....	30
<b>Tabela 2.</b> Interpretação das fotomicrografias de MLP.....	33
<b>Tabela 3.</b> Resultados do Ensaio de Bioadesão.....	37
<b>Tabela 4.</b> Resultados da análise de textura nos sistemas não incorporados com própolis.....	38
<b>Tabela 5.</b> Resultados da análise de textura nos sistemas incorporados com própolis.....	38

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as afecções odontológicas as mais comuns são a gengivite, a periodontite, a estomatite aftosa, a herpes simples e a cárie (REGEZI; SCIUBBA, 2000; NEWMAN, 2004).

A gengivite é uma inflamação dos tecidos gengivais que pode ocorrer em forma aguda, subaguda ou crônica. Esta pode aparecer devido a fatores locais, como pela presença de microrganismos e impactação de alimentos, ou devido a fatores sistêmicos como distúrbios de nutrição e características hereditárias. A periodontite é uma evolução da gengivite quando não envolve somente a gengiva, mas também o osso alveolar, o cemento e o ligamento periodontal podendo levar à perda de dentes (REGEZI; SCIUBBA, 2000).

A estomatite aftosa é o desenvolvimento de ulcerações recidivantes dolorosas, podendo ser solitárias ou múltiplas, na mucosa bucal. Herpes simples é uma doença infecciosa comum causada pelo vírus do herpes simples (HSV), sendo do tipo 1 o que geralmente afeta a região da boca (REGEZI; SCIUBBA, 2000).

A cárie é uma doença de origem infecciosa que causa um processo de descalcificação do esmalte dentário e da dentina por ação de ácidos orgânicos formados por bactérias fermentadoras, principalmente *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, que atuam sobre os carboidratos obtidos pelo homem através da dieta alimentar. Acredita-se que o *S. mutans* esteja envolvido com o desenvolvimento inicial da cárie, enquanto o *L. casei* seja o responsável pelo comprometimento da lesão (VAN HOUTE, 1993).

O *S. mutans* é considerado um dos microrganismos orais mais cariogênico, pois a partir da sacarose produz ácido lático em grande quantidade, é acidúrico mantendo o metabolismo mesmo em pH baixo e forma polissacarídeos de reserva intra e

extracelulares, além do polissacarídeo extracelular insolúvel responsável pela adesividade da placa bacteriana. O *S. mutans* adere-se à superfície dos dentes e fermenta carboidratos ingeridos proporcionando a formação de ácidos orgânicos responsáveis pela desmineralização inicial do esmalte dentário. Posteriormente, o *L. casei* causa lesões progressivas formando as cavidades (LOESCHE, 1986; MACPHERSON et al., 1992).

São três os fatores essenciais para o início do processo de cárie: o hospedeiro (dente), a microflora (bactérias) e o substrato (alimentos ingeridos). Também deve-se considerar a condição de mineralização e a resistência do dente, além do fator tempo para que ocorra a doença (KEYES, 1962; SOUZA et al., 2001).

As estratégias para a prevenção da cárie visam à diminuição do ataque cariogênico e o aumento da resistência da superfície dentária. Uma das maneiras de se alcançar esse objetivo é pelo controle do biofilme dentário, mecânica e/ou quimicamente (STOOKEY, 1998).

O biofilme é uma estrutura complexa e dinâmica que se desenvolve pela colonização ordenada da superfície dentária por várias bactérias orais, organizando-se no interior de uma matriz extracelular de polissacarídeos (MARSH, 2004). Seu desenvolvimento inicial ocorre pela adesão das células bacterianas planctônicas (colonizadores primários) à película adquirida sobre a superfície dental e posterior co-agregação de outros microorganismos (colonizadores secundários) havendo comunicação metabólica e troca genética inter e intra-espécies (JENKINSON & LAMONT, 2005; HOJO et al., 2009).

Os compostos fluoretados apresentam reconhecida capacidade de interferir na evolução da cárie e também apresentam propriedades que merecem ser investigadas, no que tange a sua atividade antibacteriana (BERNARDO et al., 1996; ZARÁTE, 2003).

Quando aplicadas topicamente no esmalte dos dentes, mesmo em baixas concentrações, as soluções fluoretadas reduzem a incidência de cárie (SANTOS et al., 1998).

O flúor pode interferir na colonização e composição do biofilme dentário, na atividade metabólica dos depósitos bacterianos e, mesmo em baixas concentrações, atua na remineralização do esmalte. O maior efeito cariostático, tanto da água fluoretada quanto dos dentifrícios e dos bochechos, se deve provavelmente à manutenção regular dos íons flúor nos fluídos orais (FERJERSKOV et al., 1981; MARKIS, 1999) que dificulta a destruição do esmalte e acelera o processo de remineralização. Os novos cristais de esmalte formados na presença do flúor são mais resistentes ao ácido responsável pela desmineralização. Em crianças, na fase de desenvolvimento dos dentes o flúor se concentra nos ossos em crescimento ajudando a endurecer o esmalte dos dentes de leite e permanentes que ainda não nasceram.

Porém, ao mesmo tempo em que o flúor é importante no controle da cárie a sua ingestão deve ser rigorosamente controlada, pois traz efeitos indesejáveis principalmente em crianças. Por esse motivo, é imprescindível a procura por agentes com atividade bactericida eficiente contra microrganismos cariogênicos que não tragam esses efeitos.

Desde a antiguidade as plantas vêm sendo usadas por ser um recurso ao alcance do ser humano. Desta forma o homem encontrou virtudes nas plantas medicinais que foram transmitidas de geração em geração representando assim um marco na história do desenvolvimento de nações. E hoje, até mesmo nas sociedades mais industrializadas, o uso de vegetais *in natura* vem cada vez mais se intensificando (MIGUEL; MIGUEL,1999). O uso de produtos naturais em odontologia tem sido bastante estudado e tem estimulado a presença da fitoterapia em programas

preventivos e curativos que avaliam a atividade de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme dental (BUFFON et al., 2011). Estes produtos têm despertado interesse pelas ações farmacológicas e encontrado significativa aceitação popular.

O Brasil, por ter a maior diversidade vegetal do mundo, possui grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia, aplicada inclusive a odontologia. O uso da plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologia podem validar cientificamente suas aplicações (MARTINS, 2000; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Inúmeros estudos vêm sendo realizados para avaliar espécies vegetais com aplicação na odontologia. Exemplos desse vegetais são: *Equinacea purpúrea*, *Copaifera multijuga*, *Lippia sidoides*, *Stryphnodendron barbatiman* e *Melípona scutellaris* (BANDEIRA, 1999; COUTO, 2000; FERES et al., 2005; FERREIRA, 1996; MELO JUNIOR et al., 2000; PAIXÃO, 2002; VENDOLA, 2004;). Dentre essas espécies, a geoprópolis (*Melípona scutellaris*) tem se destacado devido as suas diversas propriedades terapêuticas que são: bactericida, bacteriostática, antiviral, fungicida, fungistática, antiflogística, antialérgica, bioestimuladora, dermatoplástica, anestésica local (LEYVA, 1989), atividade citotóxica, cicatrizante do tecido ósseo, tecido cartilaginoso, polpa dental entre outros (MARCUCCI, 1996; MATOS,1989). Em odontologia tem se estudado a ação da própolis em doenças periodontais como: gengivites, periodontites, Gengivite Ulcerativa Necrosante Aguda (GUNA) (COLITA et al., 1976; GAFAR et al., 1976), mumificação pulpar (SCHELLER, 1978) e cárie dental (IKENO et al., 1991).

A própolis é obtida a partir de uma resina que as abelhas retiram das plantas e utilizam para fechar frestas da colméia, o que evita a entrada de frio e insetos, impedindo a ação de fungos e bactérias. Ao ser transportada para as colméias pelas

abelhas, a resina se transforma em própolis. Características da própolis como cor, sabor, odor, consistência, composição química e até mesmo atividade biológica dependem das precedências das espécies vegetais e das estações do ano (MARCUCCI, 1996). A composição da própolis é de 50 a 55% de resinas, 30% de cera de mel, 8 a 10% de óleos essenciais e 5% de pólenes e, além disso, também é encontrada pequena quantidade de ácidos graxos, ácidos orgânicos, aminoácidos e vitaminas (MATSUNO, 1997; FERREIRA et.al,1996).

A geoprópolis é um tipo especial de própolis produzida por abelhas sem ferrão, formado por uma mistura de resinas vegetais, cera e terra (Barth, 2006). A geoprópolis é um composto de própolis formada por própolis + argila (barro). Normalmente são utilizadas para vedar frestas maiores.

Estudos experimentais, *in vitro*, da própolis demonstraram sua ação antimicrobiana frente aos diversos microrganismos patogênicos bucais (HAVSTEEN, 1983; MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005). A cárie dental é uma doença de alta incidência em toda a população mundial, sendo que no Brasil representa historicamente o problema de saúde bucal coletiva mais relevante. Segundo avaliação de Ikeno e colaboradores (1991) a própolis apresenta propriedade de eliminar alguns microrganismos pertencentes à cárie através de sua atividade antibacteriana sobre amostras de *S. mutans*. Ainda, a própolis apresenta o poder de inibir a aderência dos microrganismos na superfície dentinária, como demonstrou o estudo, *in vitro*, de Gebara e colaboradores (1996). Duailibe (2004) demonstrou que o uso de bochecho da solução do extrato alcoólico de geoprópolis da tíuba diminuiu em 48,5% o número de colônias de *Streptococcus mutans*, na saliva dos pacientes.

Os resultados dos testes pré-clínicos de medicamentos raramente satisfazem as expectativas devido a uma série de barreiras anatômicas, químicas ou biológicas, entre



o local de administração e o órgão ou tecido alvo as quais contrariam a obtenção do efeito terapêutico desejado. Neste contexto está inserido o conceito dos sistemas de liberação de fármacos, que apresentam capacidade de compartimentalizar uma substância e direcioná-la para os sítios onde deverá exercer o seu efeito farmacológico, além de controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada (BENITA, 1998; OLIVEIRA et al., 1992; OLIVEIRA; SCARPA, 2001).

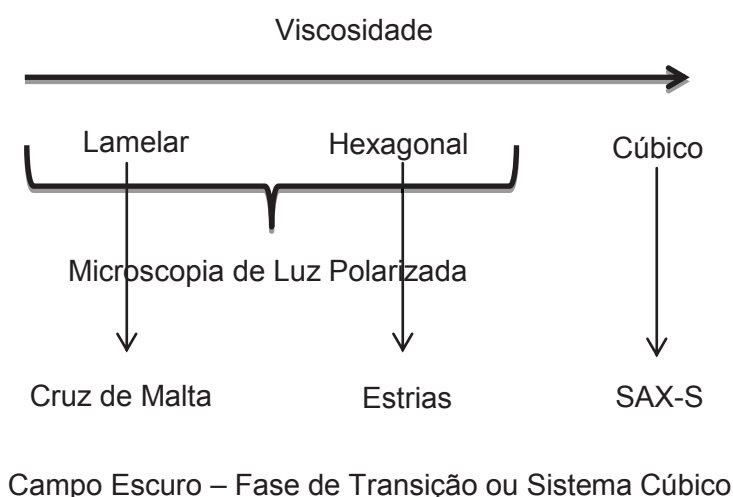
Pesquisadores começaram então a estudar sistemas nanoestruturados de liberação de substâncias como lipossomas, cristais líquidos, microemulsões e nanopartículas (KANG, CHO & YOO, 2009). Sistemas líquido-cristalinos foram desenvolvidos por Stevenson e colaboradores para a incorporação e liberação controlada de insulina. O veículo mais eficiente nas vacinas de DNA são microemulsões comparando-se com soluções aquosas (KUBIK, BOGUNIA-KUBIK & SUGISAKA, 2005; OLIVEIRA, A. G., 2004). As nanopartículas vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de hormônio do crescimento (GH ou somatotrofina) e insulina para administração nasal (CHALASANI et al., 2007).

Com isso, fica evidente que nos últimos anos tornou-se muito relevante a procura por novos sistemas de liberação no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com maior segurança e minimizar os efeitos colaterais (CERA, 2001).

Dentre os sistemas de liberação que podem ser usados para a incorporação de fármacos destacam-se os sistemas líquido-cristalinos (SLC), que apresentam vantagens principalmente no que tange a liberação prolongada e a proteção da substância de degradação térmica ou fotodegradação, além de aumentar a eficácia do fármaco (GUTERRES et al., 2007; MOHANRAJ & CHEN, 2006). Os cristais líquidos

podem mudar significativamente a velocidade de liberação dos fármacos, aumentando solubilidade, absorção e controle da biodisponibilidade, além de alterar a farmacocinética, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica.

Os SLC são estados intermediários que apresentam características tanto de sólidos quanto de líquidos. Assim como os sólidos apresentam ordem estrutural, rigidez e ligações bem definidas e assim como os líquidos apresentam mobilidade, regiões desordenadas e fluídas. Dessa forma, constitui uma fase fluída ordenada (MORAIS, 2006; HYDE, 2001). Por esse motivo também são chamados de mesofases (HYDE, 2001). Os SLC podem ser divididos em dois grupos: termotrópicos, que possuem formação do estado mesomórfico dependente de temperatura, e os liotrópicos que dependem da presença e concentração de um solvente, em geral a água, além da temperatura (LI et al., 2009). Os SLC liotrópicos formam diferentes formas líquido-cristalinas dependendo da concentração de tensoativo e as mais importantes e comumente encontradas são: lamelar, hexagonal e cúbica (GABBOUN et al., 2001).



A incorporação de moléculas bioadesivas em sistemas de liberação tem sido amplamente explorada com o intuito de aumentar o tempo de permanência da preparação, evitando sua rápida eliminação. Dentre as várias moléculas bioadesivas,

destaca-se a quitosana, que aumenta a adesão através de interações eletrostáticas. Diferentes sistemas de liberação já conhecidos podem ser formulados utilizando moléculas bioadesivas, e dentre eles estão os sistemas estabilizados com tensoativos. A mistura de tensoativos com água, em determinadas proporções, pode formar diferentes tipos de estruturas, como os agregados micelares e os sistemas líquidos-cristalinos, os quais possuem diferentes características estruturais e reológicas, que permitem sua ampla aplicação como sistemas de liberação de fármacos.

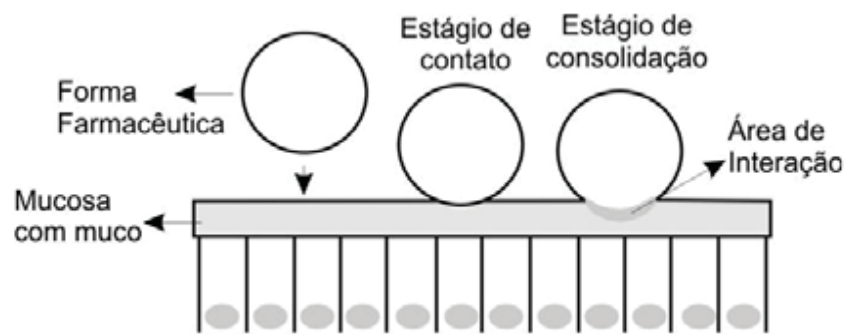
Os SLC podem apresentar alta viscosidade (fases hexagonal e cúbica), o que é mais um fator que favorece a permanência do sistema no local de aplicação. A incorporação de moléculas bioadesivas como a quitosana nestes sistemas aumenta a adesão, já que, a quitosana age na união de dois materiais, em que pelo menos um é de origem biológica, durante um longo período de tempo mediante forças interfaciais (interação eletrostática – diferença de carga).

A bioadesão é importante na administração de fármacos, pois implica na ligação do sistema transportador do fármaco (SLC) a um substrato biológico específico.

A interação eletrostática entre a quitosana (catiônica) e a mucina (presente na saliva) promove a adesão da molécula transportadora do fármaco e a superfície do dente objetivando uma ação prolongada através da aplicação tópica. A bioadesão se dá pela diferença nas estruturas eletrônicas. Quando as duas superfícies entram em contato, forma-se uma camada de carga elétrica na interface, que é responsável pela criação de forças atrativas e consequente desenvolvimento da adesão.

O processo de adesão pode ser descrito basicamente por meio de duas etapas (como ilustrado na figura abaixo), sendo estas: Etapa 1 - Estágio de contato: Um contato íntimo ocorre entre o material bioadesivo e a membrana; Etapa 2 – Estágio de

consolidação: as várias interações físico-químicas ocorrem para consolidar a força da junção adesiva, conduzindo à adesão prolongada, conforme descrito na Figura 1.



**Figura 1.** Biadesão

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema líquido-cristalino para incorporação de extrato de própolis, objetivando aumentar sua substantividade, de forma a otimizar o seu uso no tratamento da cárie dental.

### 3. DESENVOLVIMENTO

#### 3.1. Materiais

- Fração Hexânica de geoprópolis;
- Ácido Clorídrico;
- Quitosana;
- Procetyl (Álcool cetílico etoxilado 20 OE e propoxilado 5 OP) AWS (Croda do Brasil);
- Ácido Oléico;
- Trietanolamina.

#### 3.2. Equipamentos

- Analisador de textura TA-XTplus Stable Micro Systems;
- Banho de ultrassom, Unique ,Ultra Sonic Cleaner;
- Centrífuga, Sorval, modelo TC 6 Du Pont;
- Reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlado MARS II (Haake®);
- Agitador mecânico.

#### 3.3. Métodos

##### 3.3.1. Preparação da dispersão de quitosana (QS)

A dispersão de QS foi preparada na concentração de 5% (m/m). A quitosana foi suspensa em solução de ácido acético a 2% e misturada por agitação mecânica por 24 horas.

### **3.3.2. Construção do diagrama de fases ternário**

Foi construído um diagrama de fase ternário utilizando ácido oleico como fase oleosa, Procetyl<sup>®</sup> AWS como tensoativo e dispersão de quitosana 0,5% como fase aquosa.

O diagrama de fase ternário foi construído pela preparação de dois gramas de 54 sistemas variando-se de 0 a 100% (m/m) as proporções de fase aquosa, de tensoativo e de fase oleosa, as quais foram misturadas com agitação em vórtex, à temperatura ambiente.

A fase aquosa dos sistemas foi preparada, inicialmente, com a mistura manual de 10% da dispersão polimérica a 5% com água, de modo que resultasse numa percentagem final nos sistemas de 0,5% de quitosana.

Todos os sistemas foram analisados visualmente e classificados como sistemas viscosos ou líquidos opticamente transparentes, translúcidos ou opacos, ou ainda separação de fases. Desse modo, foi possível determinar os pontos das diferentes regiões no diagrama de fase.

A partir desses dados, as diversas regiões do sistema foram ou não neutralizados (pH= 7,0) com trietanolamina. Em seguida, foi realizada a caracterização físico-química dos sistemas ácidos e neutralizados.

### **3.3.3. Caracterização físico-química dos sistemas selecionados**

Para realização da caracterização físico-química, foram selecionados alguns sistemas, fixando a percentagem do tensoativo (40%) e variando as proporções de água e óleo.

### 3.3.3.1. Microscopia de luz polarizada

Uma pequena alíquota dos sistemas selecionados foi colocada em uma lâmina, cobrindo-a com a lamínula e analisada em microscópio sob luz polarizada. Foram utilizadas lentes de aumento de 5, 10 e 20 vezes, dependendo da amostra.

### 3.3.3.2. Análise reológica contínua

Os reogramas dos sistemas escolhidos foram obtidos através do reômetro RS-1 (Haake) no modo *fluency (flow)*, utilizando geometria cone/placa (C35/2° Ti) e placa/placa de 35 mm, de acordo com a consistência de cada formulação, à temperatura de 37 °C.

Uma pequena amostra dos sistemas foi colocada, cuidadosamente, na placa inferior do reômetro, e esperou-se o tempo de repouso de 3 minutos para o início da análise. A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0 a 100 s<sup>-1</sup> para a curva ascendente e de 100 a 0 s<sup>-1</sup> para a curva descendente, durante 120 segundos cada.

### 3.3.3.3. Análise do perfil de textura

O perfil de textura dos sistemas selecionados foi analisado utilizando um analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Inglaterra) através do teste Análise de Perfil de Textura (ATP), a partir do qual é possível extrair propriedades mecânicas, tais como a dureza, compressibilidade, adesividade e coesão.

Para a realização do teste, os sistemas selecionados (15 g) foram colocados em tubos de centrífuga cônicos de 50 mL (Falcon, BD ®, Franklin Lakes, EUA) e centrifugados a 4000 rotações por minuto, por 3 minutos, para eliminar as bolhas de ar e tornar a sua superfície lisa. Em seguida, esses tubos foram colocados embaixo da



sonda analítica (10 mm de diâmetro) do analisador de textura, que foi programada para comprimir a amostra a velocidade de 0,5 mm/s até a profundidade pré-definida (10 milímetros) e retornar para a superfície da amostra na mesma velocidade. Após 5 segundos de repouso, uma segunda compressão inicia-se, nas mesmas condições. Todas as análises foram realizadas em triplicata, à temperatura de 37 °C.

#### **3.3.3.4. Bioadesão *in vitro* em superfície de dente bovino**

Para a avaliação *in vitro* da força bioadesiva em superfície de dente bovino, as etapas 3.3.3.4.1 e 3.3.3.4.2 foram realizadas inicialmente.

##### **3.3.3.4.1. Preparação de saliva humana**

A saliva não estimulada foi obtida de vários doadores adultos e saudáveis, de ambos os sexos, e que não tenha usado antibióticos, soluções para bochecho ou qualquer outro medicamento conhecido por afetar a composição e fluxo salivar, nos últimos três meses. A saliva foi coletada em tubos de centrifuga cônicos de 50 mL resfriados por gelo e, posteriormente, uma quantidade igual de saliva de cada doador foi misturada, homogeneizada e submetida à centrifugação 10.000 g por 5 minutos a 4 °C (MOURA, 2006), sendo, em seguida, filtrada por meio de sistema de filtração com membrana de 0,22 µm (PEROS & GIBBONS, 1981) e se não utilizada imediatamente, a saliva foi armazenada a -70 °C. É importante salientar que esta etapa do projeto teve parecer (nº 47/2011) favorável pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, sob o protocolo 14/2011.

##### **3.3.3.4.2. Obtenção do disco de dente bovino**

O disco de esmalte bovino foi obtido a partir de incisivos de novilhos com 20 a 30 meses de idade. Dentes com trincas no esmalte, cálculo no terço médio coronário, desgaste do terço incisal, alterações morfológicas da coroa e hipoplasias de esmalte foram descartados. Depois de limpos, foram obtidos discos de 1 cm de diâmetro do terço médio da face vestibular dos dentes, com auxílio de um motor de alta rotação (modelo MRS 400 Torque- Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) acoplado a um disco de ponta diamantada cilíndrica (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil). Para a regularização da superfície, os blocos foram desgastados com lixas d'água de granulação 200 (T469-SF).

#### **3.3.3.4.3. Avaliação *in vitro* da força bioadesiva**

A força necessária para remover os sistemas selecionados da superfície do dente bovino foi avaliada *in vitro*, utilizando o analisador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Surrey Inglaterra), no modo Adhesion Test.

O disco de dente bovino foi fixado com fita adesiva dupla face à extremidade inferior da sonda cilíndrica (10 mm de diâmetro) do equipamento. Antes do ensaio, o dente foi imerso em saliva humana para simular o ambiente bucal. Na temperatura de 37°C, as formulações foram acondicionadas em recipientes de vidro pequenos sob a sonda. O teste foi iniciado abaixando a sonda a uma velocidade constante (1 mm/s) até que o dente entrasse em contato com a amostra. O dente e a amostra foram mantidos em contato durante 60 segundos e nenhuma força foi aplicada durante este tempo. Em seguida, a sonda subiu a velocidade constante (0,5 mm/s) até ocorrer o destacamento do dente da amostra. A força necessária para remover o dente da amostra foi calculada pela curva força versus tempo. O teste foi realizado em triplicata.

### 3.3.4. Incorporação do extrato de própolis nos sistemas selecionados

A incorporação da fração hexânica de Geoprópolis foi baseada em dados de estudos realizados pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, coordenados pelo Prof. Dr. Pedro Luis Rosalen, que indicam que o extrato tem atividade antimicrobiana na concentração de 400µg/mL. A incorporação do extrato aos sistemas seguiu a seguinte sequência:

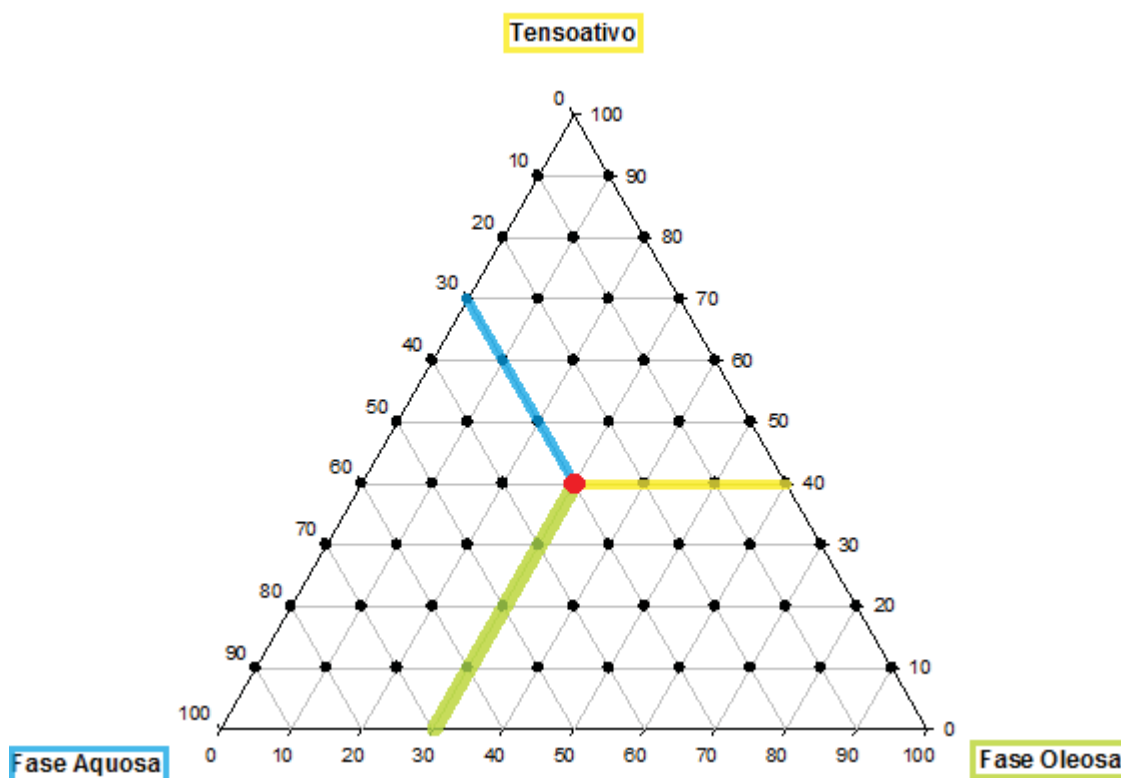
- Pesagem do extrato;
- Solubilização do extrato na fase oleosa (ácido oleico);
- Separadamente, em outro frasco, formação da fase aquosa (dispersão de quitosana 0,5%);
- Dispersão da fase aquosa na fase oleosa;
- Adição do tensoativo;
- Agitação vigorosa até completa solubilização.

Após a incorporação do extrato, os sistemas foram caracterizados por microscopia de luz polarizada, análise de perfil de textura e pela avaliação *in vitro* da força bioadesiva em superfície de dente bovino, descritos pelos itens 3.3.3.1, 3.3..3.2, 3.3.3.3 e 3.3.3.4, respectivamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Diagrama de fases ternário e caracterização visual dos sistemas

O diagrama de fases ternário é um triângulo equilátero o qual representa as porcentagens de cada componente do sistema, sendo os vértices do triângulo o equivalente a 100% da fase. A leitura do diagrama é realizada no sentido horário sendo então o lado direito referente ao tensoativo, a base referente à fase oleosa e o lado esquerdo referente à fase aquosa, como mostra a Figura 2.



**Figura 2.** Diagrama de Fases Ternário

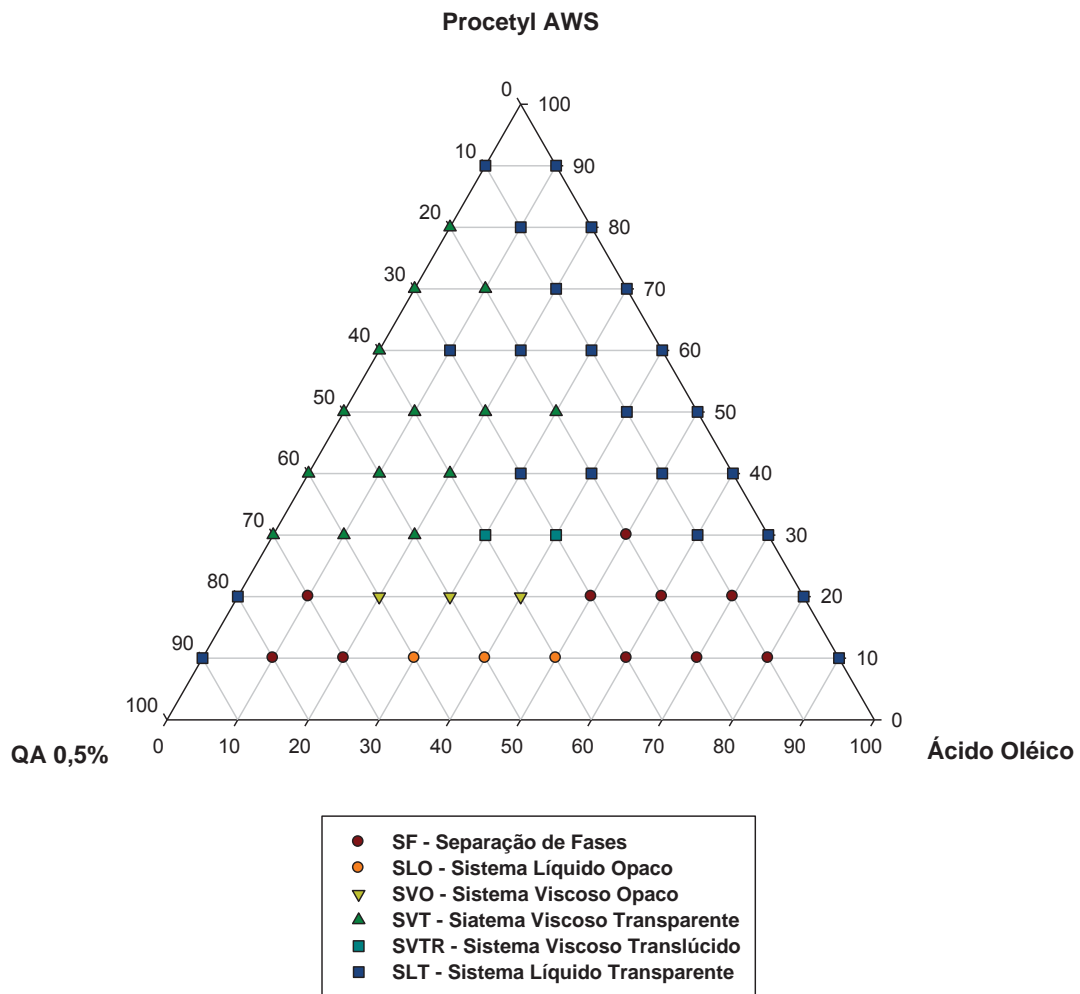
Portanto, a leitura das quantidades de cada componente no ponto destacado em vermelho na figura acima se dá da seguinte forma: 40% de tensoativo, 30% de fase oleosa e 30% de fase aquosa, totalizando 100% dos componentes do sistema.

Os sistemas foram obtidos respeitando as quantidades determinadas para cada ponto do diagrama de fases ternário, obtendo-se então 54 proporções, as quais foram caracterizadas visualmente contra campo escuro.

Sistemas em que as fases aquosa e oleosa não se misturaram formando duas fases, foram caracterizados como separação de fases (SF).

Os sistemas em que não houve separação de fases foram classificados quanto à fluidez e cor. Foi considerado um sistema viscoso aquele que apresentou pouca ou nenhuma fluidez ao verter o frasco onde estava contido, enquanto que o sistema líquido foi aquele que apresentou fluidez ao verter-se o frasco. A classificação pela cor dos sistemas foi realizada em transparente, opaco e translúcido (intermediário entre o transparente e o opaco).

A figura 3 abaixo ilustra o diagrama de fases ternário com a classificação visual dos sistemas constituídos por Procetyl AWS<sup>®</sup>, Ácido Oléico e Dispersão de Quitosana 0,5%.



**Figura 3.** Análise do Diagrama de Fases Ternário

Como ilustrado no diagrama, os sistemas com concentração de 30% a 100% de tensoativo foram predominantemente transparentes.

Não houve formação de SLTR em nenhum sistema.

A obtenção de sistemas transparentes com baixa porcentagem de tensoativo torna esses sistemas interessantes para o estudo, pois uma alta concentração deste componente pode ser irritante.

#### 4.2. Escolha dos Sistemas - 23, 24 e 25

A Tabela 1 descreve a composição dos sistemas selecionados para a caracterização físico-química.

**Tabela 1.** Composição (%) dos sistemas selecionados para a caracterização físico-química

<b>Sistemas</b>	<b>% AO</b>	<b>% PRO</b>	<b>% A</b>	<b>% QS 5%</b>
<b>23 ácido</b>	20	40	30	10
<b>24 ácido</b>	30	40	20	10
<b>25 ácido</b>	40	40	10	10
<b>23 neutro</b>	20	40	30	10
<b>24 neutro</b>	30	40	20	10
<b>25 neutro</b>	40	40	10	10

Após análise visual dos sistemas, foram escolhidos os pontos 23, 24 e 25 para os estudos de microscopia de luz polarizada, reologia, TPA e biadesão. A escolha desses sistemas se deu por serem transparentes, com possível sucesso na liberação prolongada de fármacos e pela baixa porcentagem de tensoativo.

#### **4.3. Microscopia de Luz Polarizada (MLP)**

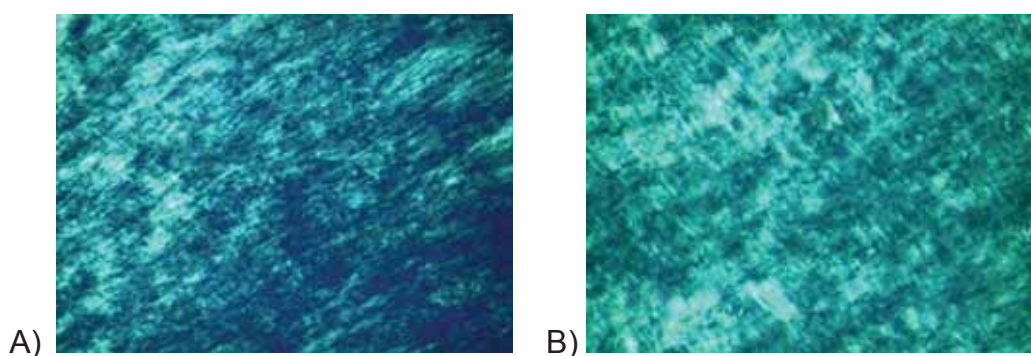
A MLP possibilita o estudo da isotropia óptica do sistema quanto ao desvio da luz. Desta maneira, os sistemas podem ser divididos em duas classes: isotrópicos, sendo estes incapazes de desviar o plano da luz incidente, e anisotrópicos os quais desviam a luz.

Sistemas Líquidos Cristalinos de fase cúbica, assim como Microemulsões, são isotrópicos, ou seja, não são capazes de desviar o plano da luz polarizada, sendo observado um campo escuro. Sistemas líquidos cristalinos de fases lamelar e hexagonal são anisotrópicos e, portanto capazes de desviar a luz polarizada sendo

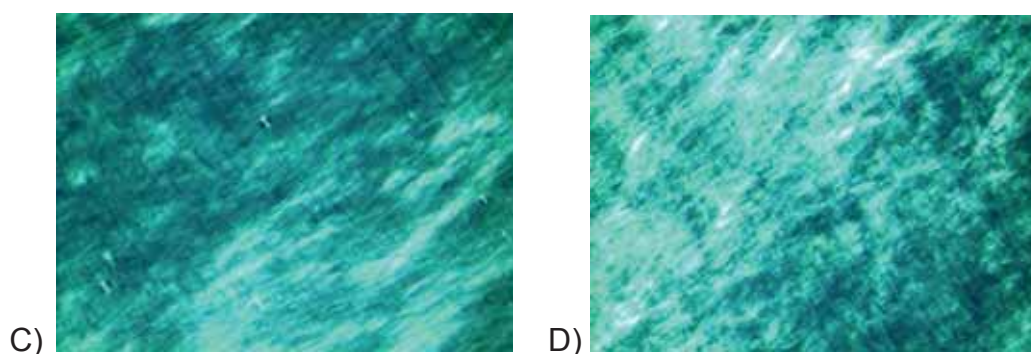
visíveis através de estruturas semelhantes a estrias quando hexagonal e parecidas com cruces de malta quando lamelar.

Através da polarização da luz foi possível observar no microscópio se os sistemas apresentam área de anisotropia ou isotropia. As análises foram realizadas após repouso dos sistemas por 24 horas, para que não houvesse bolhas de ar incorporadas.

As figuras de 4 a 9 são fotomicrografias de algumas formulações do sistema estudado.

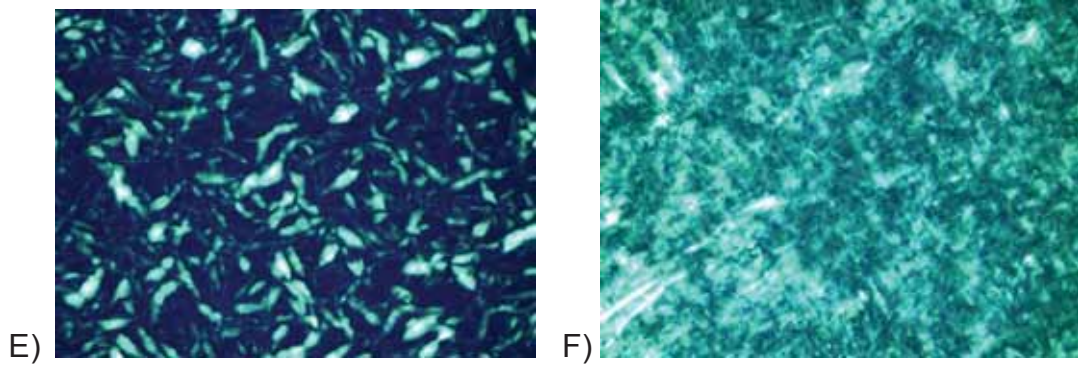


**Figura 4.** Fotomicrografia da formulação 23 (água:óleo:tensoativo = 40:20:40) em aumento de 20x A) Sistema 23 Ácido B) Sistema 23 Neutro

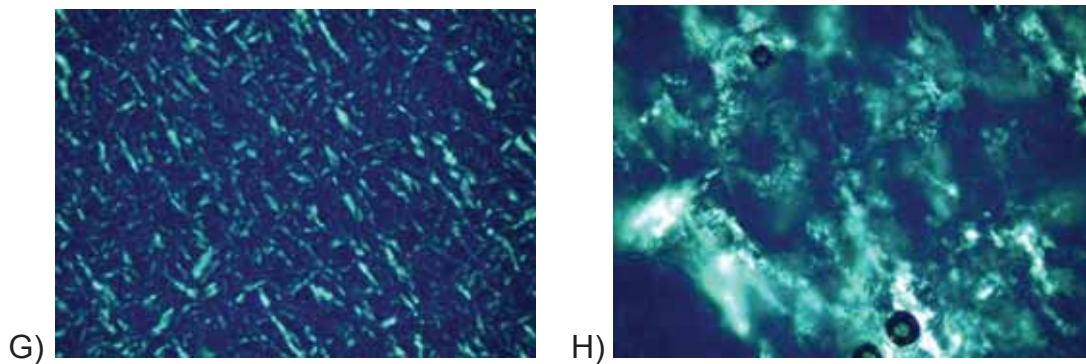


**Figura 5.** Fotomicrografia da formulação 23 (água:óleo:tensoativo = 40:20:40) acrescida de fração Hexânica de Geoprópolis 400µg/mL, em aumento de 20x C) Sistema 23 Ácido com Extrato D) Sistema 23 Neutro com Extrato

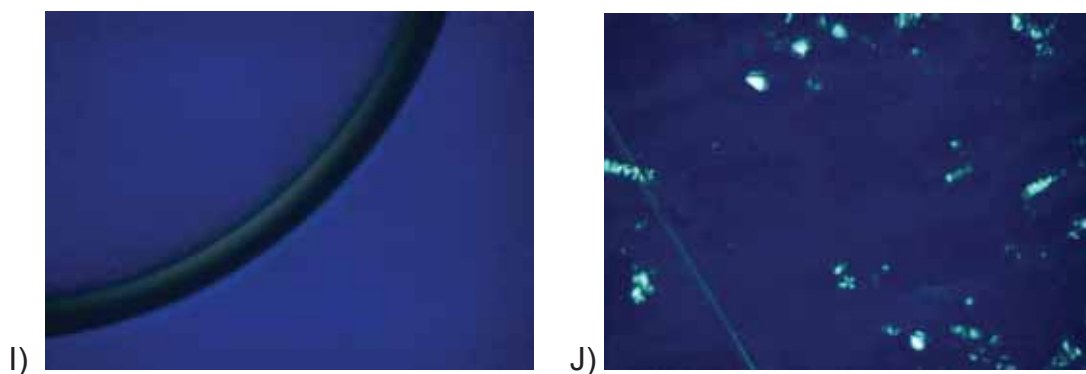




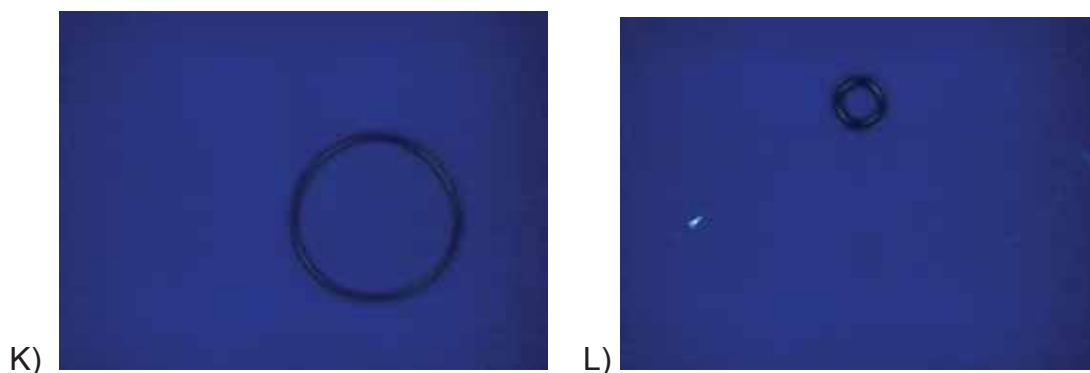
**Figura 6.** Fotomicrografia da formulação 24 (água:óleo:tensioativo = 30:30:40) em aumento de 20x E) Sistema 24 Ácido F) Sistema 24 Neutro



**Figura 7.** Fotomicrografia da formulação 24 (água:óleo:tensioativo = 30:30:40) acrescida de fração Hexânica de Geoprópolis 400µg/mL, em aumento de 20x G) Sistema 24 Ácido com Extrato H) Sistema 24 Neutro com Extrato



**Figura 8.** Fotomicrografia da formulação 25 (água:óleo:tensioativo = 20:40:40) em aumento de 20x I) Sistema 25 Ácido J) Sistema 25 Neutro



**Figura 9.** Fotomicrografia da formulação 25 (água:óleo:tensoativo = 20:40:40) acrescida de fração Hexânica de Geoprópolis 400µg/mL, em aumento de 20x K) Sistema 25 Ácido com Extrato L) Sistema 25 Neutro com Extrato.

A Tabela 2 descreve a interpretação das fotomicrografias de MLP.

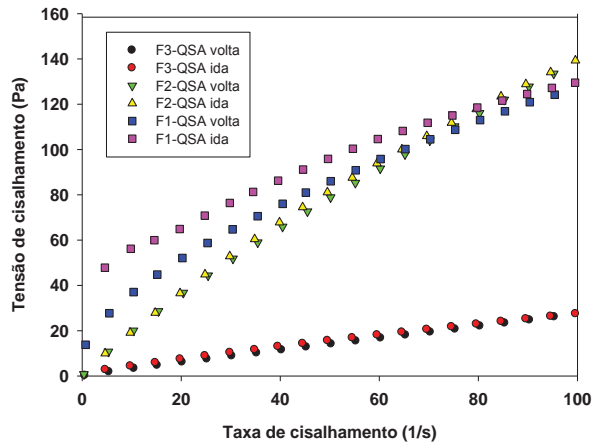
**Tabela 2.** Interpretação das fotomicrografias de MLP.

<b>Figura</b>	<b>Sistema</b>	<b>Estrutura Observada</b>	<b>Caracterização do Sistema</b>
<b>A</b>	23 ácido	Estria	Cristal líquido hexagonal
<b>B</b>	23 neutro	Estria	Cristal líquido hexagonal
<b>C</b>	23 ácido c/ extrato	Estria	Cristal líquido hexagonal
<b>D</b>	23 neutro c/ extrato	Estria	Cristal líquido hexagonal
<b>E</b>	24 ácido	Estria	Cristal líquido hexagonal
<b>F</b>	24 neutro	Estria	Cristal líquido hexagonal
<b>G</b>	24 ácido c/ extrato	Estria	Cristal líquido hexagonal
<b>H</b>	24 neutro c/ extrato	Estria	Cristal líquido hexagonal
<b>I</b>	25 ácido	Campo escuro	Região de transição
<b>J</b>	25 neutro	Cruz de malta	Cristal líquido fase lamelar
<b>K</b>	25 ácido c/ extrato	Campo escuro	Região de transição
<b>L</b>	25 neutro c/ extrato	Campo escuro	Região de transição

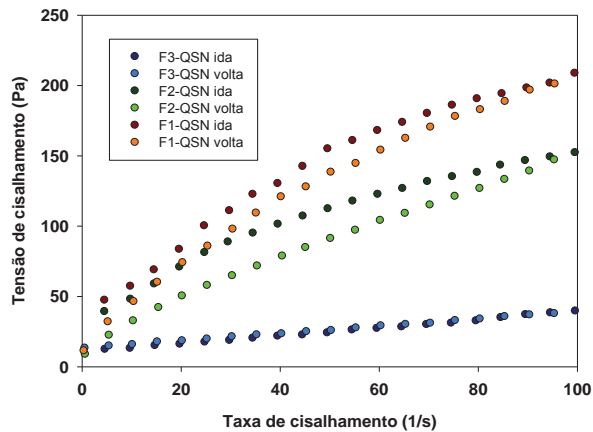
#### 4.4. Estudo do Comportamento Reológico

##### Análise de Escoamento

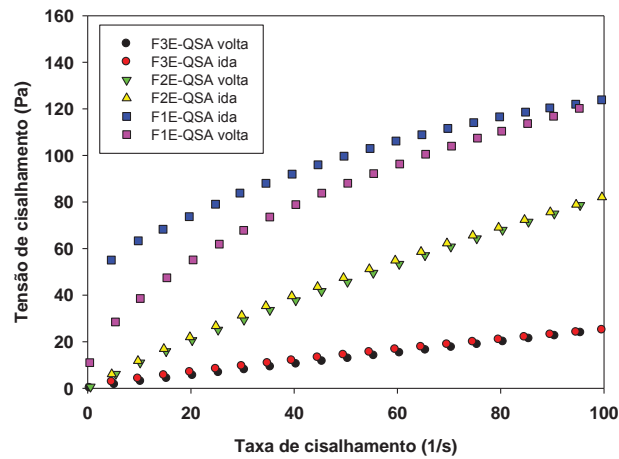
Através do estudo do escoamento dos sistemas, foram construídos os reogramas, apresentados nas Figuras de 10 à 13:



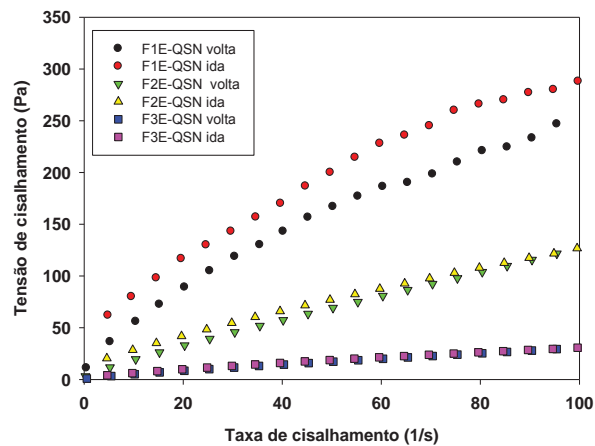
**Figura 10.** Reograma dos ensaios de fluxo dos sistemas 23 (F1), 24(F2) e 25(F3) ácidos sem incorporação da Formulação Hexânica Geoprópolis 400µg/mL



**Figura 11.** Reograma dos ensaios de fluxo dos sistemas 23(F1), 24(F2) e 25(F3) neutros sem incorporação da Formulação Hexânica Geoprópolis 400µg/mL



**Figura 12.** Reograma dos ensaios de fluxo dos sistemas 23 (F1), 24(F2) e 25(F3) ácidos incorporados com Formulação Hexânica Geoprópolis 400µg/mL



**Figura 13.** Reograma dos ensaios de fluxo dos sistemas 23(F1), 24(F2) e 25(F3) neutros incorporados com Formulação Hexânica Geoprópolis 400µg/mL

Os dados obtidos no estudo foram utilizados para construção dos reogramas ilustrados acima, nos quais foram estabelecidas relações entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento. Sistemas em que não há proporcionalidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento são denominados não-Newtoniano (SCHRAMM, 2006).

Flúidos tixotrópicos são caracterizados por diminuição da viscosidade em função do tempo de aplicação de uma taxa de cisalhamento. Os flúidos reopéxicos apresentam comportamento oposto aos flúidos tixotrópicos, ou seja, aumentam a viscosidade em função do tempo de aplicação de uma taxa de cisalhamento. Ambos são fenômenos reversíveis, pois após a retirada da força de cisalhamento, o sistema volta parcialmente à conformação inicial

Os reogramas que evidenciam diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, são característicos de sistemas pseudoplásticos (SCHRAMM, 2006). Sistemas pseudoplásticos apresentam comportamento favorável a produtos de uso tópico. A tensão durante a aplicação faz com que o produto tenha fluidez adequada, garantindo um bom espalhamento e formação de um filme uniforme na superfície (BOODTS, 2003).

Todos os sistemas analisados são não-Newtonianos e pseudoplásticos. Porém, por apresentar maior área de histerese que é a principal característica de um comportamento pseudoplástico, o sistema 23, tanto ácido como neutro, é o mais adequado para o uso tópico, como pretendido.

#### **4.5. Ensaio de Bioadesão**

A Tabela 3 descreve os resultados do ensaio de bioadesão.

**Tabela 3.** Resultados do Ensaio de Bioadesão

<b>Amostra</b>	<b>Pico de Adesão (N.s)</b>	<b>Trabalho de Adesão (N.s)</b>
<b>23 ácido</b>	0,016 ± 0,001	0,076 ± 0,001
<b>24 ácido</b>	0,009 ± 0,001	0,035 ± 0,002
<b>25 ácido</b>	0,01 ± 0,0004	0,02 ± 0,0008
<b>23 neutro</b>	0,0403 ± 0,001	0,165 ± 0,006
<b>24 neutro</b>	0,035 ± 0,001	0,095 ± 0,002
<b>25 neutro</b>	0,019 ± 0,0004	0,085 ± 0,002
<b>23 ácido c/ extrato</b>	0,008 ± 0,0002	0,025 ± 0,002
<b>24 ácido c/ extrato</b>	0,005 ± 0,0001	0,0181 ± 0,0007
<b>25 ácido c/ extrato</b>	0,007 ± 0,0003	0,011 ± 0,0002
<b>23 neutro c/ extrato</b>	0,0181 ± 0,0007	0,0502 ± 0,001
<b>24 neutro c/ extrato</b>	0,007 ± 0,001	0,024 ± 0,001
<b>25 neutro c/ extrato</b>	0,01 ± 0,0002	0,026 ± 0,001

A neutralização aumentou a força de adesão e o trabalho de adesão em todos os sistemas, sendo então um indicativo de que o sistema neutro apresenta melhor fixação comparada ao sistema ácido.

A incorporação do extrato as formulações resultou em uma diminuição da força de adesão e do trabalho de adesão, o que pode interferir na fixação do produto. Portanto a incorporação da quitosana pode não ter favorecido a adesão, sendo uma possível causa para isso uma desestabilização das fases.

#### **4.6. Análise de Textura (TPA)**

A dureza é a força máxima pra que a sonda penetre na amostra durante o primeiro ciclo de compressão. A compressão é o trabalho total para deformar a amostra no primeiro ciclo de compressão. A adesão é o trabalho para vencer as forças atrativas entre a sonda e a amostra. Coesão corresponde à razão entre as áreas positivas das

duas compressões. Indica a taxa de desintegração do material diante das compressões.

**Tabela 4.** Resultados da análise de textura nos sistemas não incorporados com própolis

<b>SISTEMAS NÃO INCORPORADOS</b>				
<b>Amostra</b>	<b>Compressibilidade (N.s)</b>	<b>Dureza (N)</b>	<b>Adesividade (N.s)</b>	<b>Coesividade</b>
<b>23 ácido</b>	0,950 ± 0,011	0,078 ± 0,001	0,498 ± 0,003	0,696 ± 0,015
<b>23 neutro</b>	1,517 ± 0,011	0,097 ± 0,002	1,026 ± 0,011	0,738 ± 0,006
<b>24 neutro</b>	1,323 ± 0,027	0,095 ± 0,001	1,022 ± 0,003	0,856 ± 0,010

**Tabela 5.** Resultados da análise de textura nos sistemas incorporados com própolis

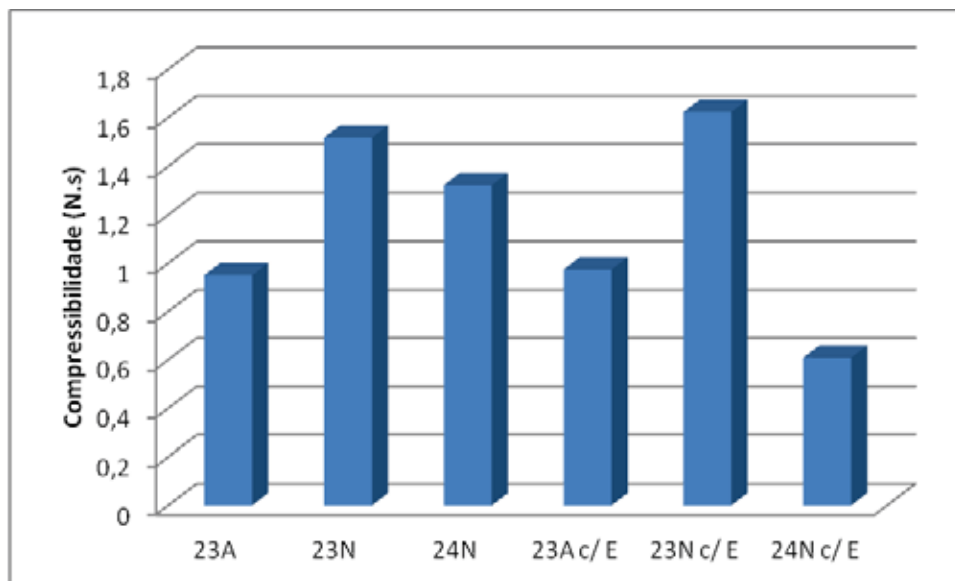
<b>SISTEMAS INCORPORADOS</b>				
<b>Amostra</b>	<b>Compressibilidade (N.s)</b>	<b>Dureza (N)</b>	<b>Adesividade (N.s)</b>	<b>Coesividade</b>
<b>23 ácido c/ extrato</b>	0,974 ± 0,022	0,076 ± 0,004	0,541 ± 0,013	0,703 ± 0,011
<b>23 neutro c/ extrato</b>	1,623 ± 0,024	0,103 ± 0,002	1,037 ± 0,004	0,686 ± 0,008
<b>24 neutro c/ extrato</b>	0,609 ± 0,001	0,073 ± 0,001	0,942 ± 0,018	0,768 ± 0,008

Não é possível realizar análise de TPA em amostras muito líquidas, pois é necessário que a amostra apresente resistência à entrada da sonda. Por este motivo, somente as amostras que apresentam maior viscosidade foram testadas, sendo então excluídas as amostras 24 ácida e 25 ácida e neutra, ambas com e sem extrato incorporado.

Os dados da tabela 4 mostram que o sistema 23 neutro possui a maior compressibilidade, dureza e adesividade comparado aos outros sistemas analisados. O parâmetro de coesividade foi maior no sistema 24 neutro.

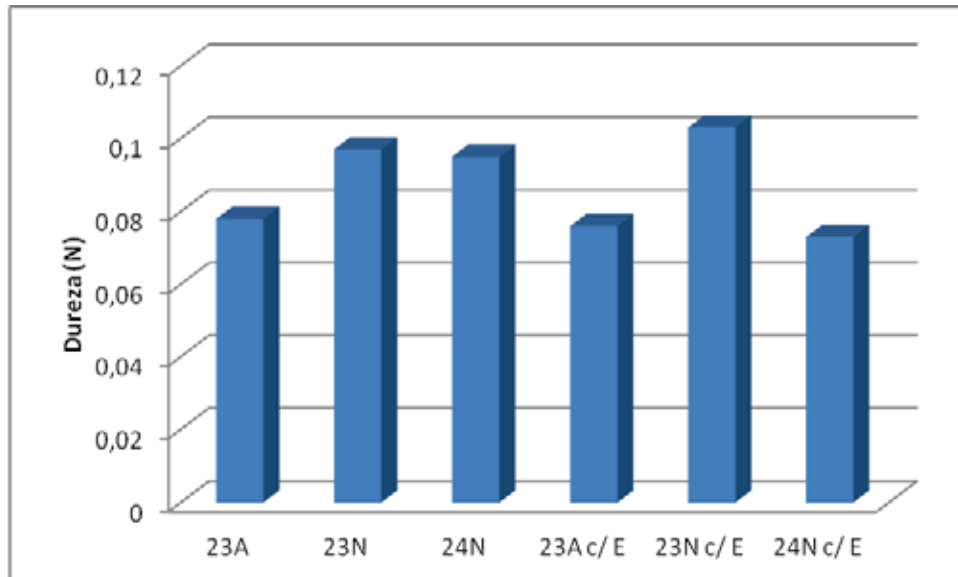
Os dados da tabela 5 mostram que os resultados continuam sendo os mesmos quando o extrato é incorporado, ou seja, o sistema 23 neutro com extrato incorporado possui a maior compressibilidade, dureza e adesividade comparado aos outros sistemas analisados. E o parâmetro de coesividade foi maior no sistema 24 neutro com extrato incorporado.

As Figuras 14, 15, 16 e 17 ilustram os resultados da análise de textura para cada parâmetro.

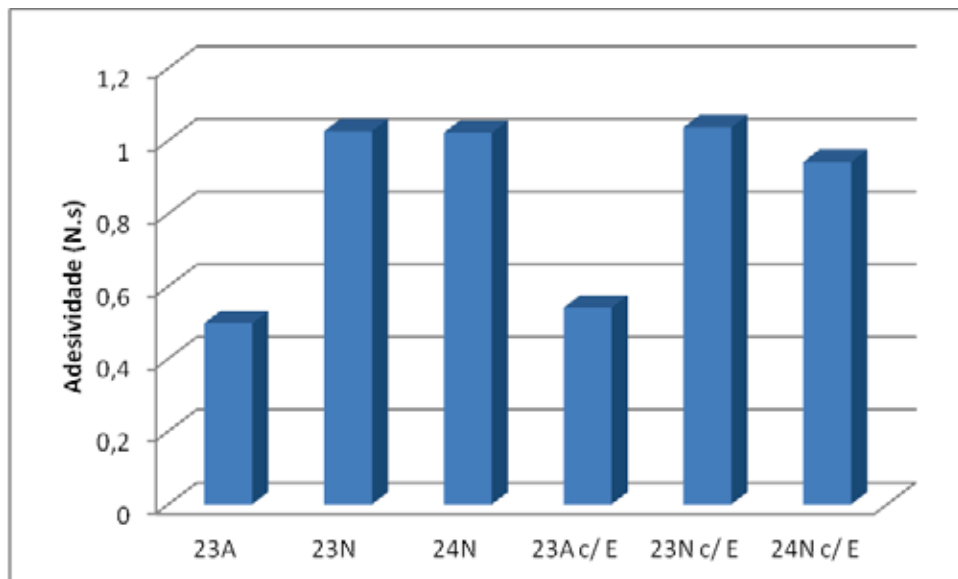


**Figura 14.** Dados de compressibilidade da análise de textura

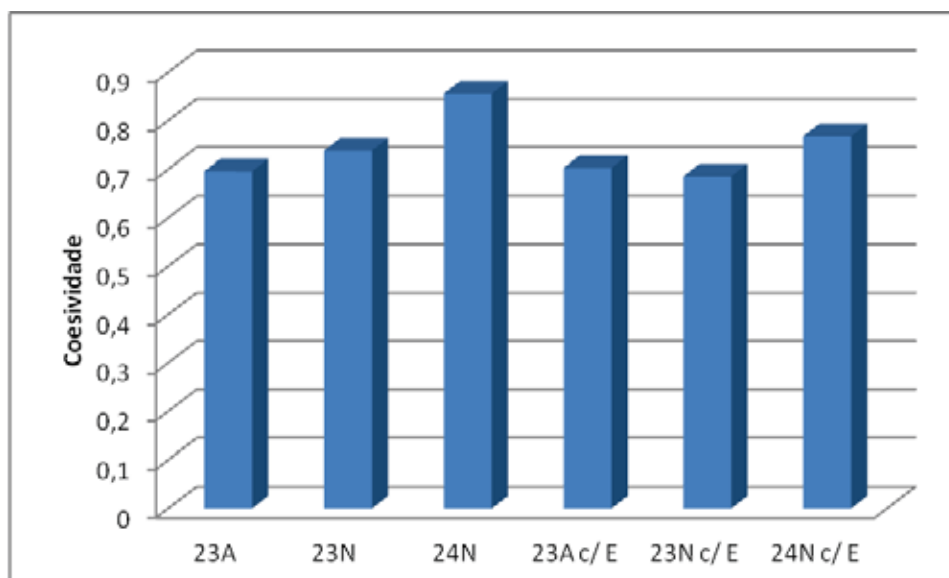




**Figura 15.** Dados de dureza da análise de textura



**Figura 16.** Dados de adesividade da análise de textura



**Figura 17.** Dados de coesividade da análise de textura

Um sistema mucoadesivo de liberação prolongada não dever ser muito rígido e coeso.

A dureza e a compressibilidade são parâmetros que se relacionam com a rigidez do sistema analisado. A análise dos resultados mostra que quanto maior a rigidez do sistema, maior será também a sua adesividade. Sugerindo que a organização do cristal líquido promove maior adesão.

A coesividade das amostras diminuiu quando o extrato foi incorporado, indicando que a força necessária para penetrar a amostra no segundo ciclo de compressão foi menor. Este fator pode proporcionar um balanço mais eficiente entre a adesão e a depuração da formulação para que esta não permaneça por um período muito prolongado na mucosa, o que pode ser prejudicial por impedir sua função.

Os resultados mostram que dentre os sistemas escolhidos para análise, os pontos 23 neutro e 24 neutro, tanto com extrato como sem extrato incorporado, apresentam melhores parâmetros para a aplicação desejada.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os sistemas 23 e 24 estudados apresentam ótima bioadesão, o que poderá aumentar a substantividade da própolis.

Quando neutralizado, o sistema apresentou resultados melhores do que na forma ácida, o que é interessante, já que um pH ácido favoreceria a desmineralização do esmalte dental.

Portanto, os resultados sugerem que o sistema 23 neutro é o mais adequado para a incorporação da fração hexânica de geoprópolis, o que a torna uma formulação em potencial para o tratamento da cárie dental.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE UP, HANAZAKI N 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Rev Bras Farmacogn 16(Supl.): 678-689.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T.; 1983. Surfactants Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology, Chapman and Hall: London.

BANDEIRA MFCL 1999. Estudo farmacológico preliminar de Copaifera multijuga (óleo de copaíba). J Bras Clin Estet Odontol 3: 39-41.

B ENITA, S., ed.; 1998. Submicron emulsion in drug targeting and delivery Harwood Academic: Amsterdam.

BERNADO PC, PAIVA JAS, TAKENAKA IT, RODRIGUES CRMD; 1996. Comparação entre soluções fluoretadas indicadas para bochecho na deposição de placa bacteriana. RPG Rev Pos-grad; 3: 230-3.

BUFFON MCM, LIMA MLC, GALARDA I, COGO L 2001. Avaliação da eficácia dos extratos de Malva sylvestris, Calendula officinalis, Plantago major e Curcuma zedoaria no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". Revista Visão Acadêmica 2: 31-38.

CERA, R.F.L.; 2001. Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsão lipídicas: formulação e liberação in vitro. Araraquara, 145p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].

CHALASANI, K.B.; RUSSELL-JONES, G.J.; YANDRAPU, S.K.; DIWAN, P.V.; JAIN, S.K.; 2007. A novel vitamin B12 -nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. J. Control. Release, v. 117, p. 421-429.

COLITA, D. et al.; 1976. Primeiros resultados del empleo de los preparados apifitoterapeuticos, como adyuvantes en el tratamiento de hemorragias cutaneas y lesiones de la mucosa bucal, en varias enfermedades de la sangre. In: Simpósio Internacional De Apiterapia, 2, 1976, Bucarest. Anais...Bucarest: Apimondia,1976. p.274-79.

COUTO GBL 2000. Biocompatibilidade do extrato hidroalcoólico da Lippia sidoides Cham (Verbenaceae). Rev Cons Reg Odontol Pernambuco.3: 83-90.

FERES M, FIGUEIREDO LC, BARRETO IM, COELHO MH, ARAUJO MW, CORTELLI SC 2005. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. J Int Acad Periodontol 7: 90-96.

FERJERSKOV O, THYLSTRUP A, LARSEN M.J.; 1981. Rational use of fluorides in caries preventions: a concept based on possible cariostatic mechanisms. Acta Odontol Scand; 39: 241-9.

FERREIRA B. 1996. Fitoterapia: plante essa idéia. Rev ABO Nac 4: 2-5 [36].

FERREIRA RC, VALENTE PHM, BARBOSA AD 1996. Atividade antibacteriana da propolis. Lecta-USF 14: 65-93.

GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S.; 2001. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. Int. J. Pharm., Amsterdam, v.212, p.73-80.

GAFAR, M. et al.; 1976. Preparados farmaceuticos con extracto de propoleos empleados en el tratamiento de las parodontopatias marginales cronicas. In: Simpósio Internacional De Apiterapia, 2, 1976, Bucarest. Anais...Bucarest: Apimondia, p.189-92.

GEBARA, E.C.E., ZARDETTO, C.G.C., MAYER, M.P.A.; out./dez. 1996. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre o S.mutans e S.sobrinus. Rev. Odontol UESP (São Paulo), v.10, n.4, p.251-6.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R.; 2007. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. *Drug Target Insights*, v.2, p.147-157.

HAVSTEEN B 1983. H.Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. *Biol Pharm* 32:1141-1148.

HYDE, S.T.; 2001. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: Holmberg, K., ed. *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry*. New York:John Wiley & Sons, cap.16, p.299-332.

HOJO; K.; NAGAOKA, S.; OHSHIMA, T.; MAEDA, N.; 2009. Bacterial interections in dental biofilm development. *J. Dent. Res.*, v.88, p.982-990.

IKENO, K., IKENO, T., MIYAZAWA, C.; 1991. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res*, v.25, n.5, p.347-51.

JENKINSON, H.F.; LAMONT, R.J.; 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiol.*, v.13, p.589-595.

KANG, M.L.; CHO, C.S.; YOO, H.S.; 2009. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnol. Adv.*, v.27, p.857–86.

KEYES PH; 1962. Recent advances in dental caries research *Bacteriology. Int Dent J*; 12(4):443-64.

KUBIK, T.; BOGUNIA-KUBIK, K.; SUGISAKA, M.; 2005. Nanotechnology on duty in medical application, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v.6, p.17–33.

LEYVA, D.J.C.; 1989. (Coord.) *Los propoleos: sus aplicaciones en La medicina humana: experiência cubana*. Cuba: s.n. 44p. (Apostila).

LI, P.; HYNES, S.R.; HAEFELE, T.F.; PUDIPEDDI, M.; ROYCE, A.E.; SERAJUDDIN, A.T.; 2009. Development of clinical dosage forms for a poorly water-soluble drug II: formulation and characterization of a novel solid microemulsion

preconcentrate system for oral delivery of a poorly water-soluble drug. *J. Pharm. Sci.*, v.98, n.5, p.1750-1764.

LOESCHE WJ; Rev 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol*; 50(4):353-80.

MACPHERSON LM, MACFARLANE TW, GEDDES DAM, STEPHEN KW.; 1992. Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship to in vivo caries experience. *Oral Microbiol Immunol*; 7:142-7.

MARCUCCI MC 1996. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim Nova*. 19: 529-535.

MARKIS RE.; 1999. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Can J Microbiol*; 41: 955-64.

MARTINS ER 2000. Plantas medicinais. Viçosa: UFV.

MARSH, P.D.; 2004. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res.*, v.38, p.204-211

MATOS, F.T.C.; nov./dez. 1989. Mumificação pulpar pelo emprego da própolis. *Rev Bras Odontol*, v.46, n.6, p.44.

MATSUNO, T. O; 1997. efeito terapêutico da própolis. Trad. Y.Odo. São Paulo: Nair Tazue Itice. 133p.

MELO JÚNIOR EJM, RAPOSO MJ, SANT'ANA, AEG, LISBOA NETO JÁ, DINIZ MFA. 2000. Estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre microrganismos presentes na alveolite. *Revista ABO Nac* 8: 4-9.

MENEZES H 2005. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.* 72: 405-441.

MIGUEL MD, MIGUEL OG 1999. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Editora Robe.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y.; 2006. Nanoparticles – A review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v.5, n.1, p.561-573.