**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

MARCOS LUCIANO BRUSCHI

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação
de própolis intrabolsa periodontal**

Ribeirão Preto
2006

MARCOS LUCIANO BRUSCHI

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa
periodontal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos
Orientadora: Profa. Dra. Elza Helena Guimarães Lara

Ribeirão Preto

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Bruschi, Marcos Luciano

Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal. Ribeirão Preto, 2006.

318 f.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Lara, Elza Helena Guimarães

1. Doença periodontal. 2. Microencapsulação. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Reologia. 5. Viscoelasticidade.

Marcos Luciano Bruschi

Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A minha esposa Michelle e aos meus filhos.

A Nossa Senhora

“Cubra-me com seu manto de amor
Guarda-me na paz desse olhar
Cura-me as feridas e a dor me faz suportar
Que as pedras do meu caminho
Meus pés suportem pisar
Mesmo ferido de espinhos me ajude a passar
Se ficaram mágoas em mim
Mãe tira do meu coração
E aqueles que eu fiz sofrer peço perdão
Se eu curvar meu corpo na dor
Me alivia o peso da cruz
Interceda por mim minha mãe junto a Jesus...
Sempre que o meu pranto rolar
Ponha sobre mim suas mãos
Aumenta minha fé e acalma o meu coração
Grande é a procissão a pedir
A misericórdia o perdão
A cura do corpo e pra alma a salvação
Pobres pecadores oh mãe
Tão necessitados de vós
Santa Mãe de Deus tem piedade de nós
De joelhos aos vossos pés
Estendei a nós vossas mãos
Rogai por todos nós vossos filhos meus irmãos
Nossa Senhora me de a mão
Cuida do meu coração
Da minha vida do Meu destino
Do meu caminho
Cuida de mim”

(Roberto Carlos)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, o compositor de nossos destinos.

Aos meus pais, Marco e Cleusa, pelo amor, carinho, dedicação, incentivo, entendimento e apoio dedicados durante toda minha vida. A minha irmã, Sandra, e todo o restante de minha família por acreditarem e torcerem pelo meu sucesso.

À professora Dra. Elza Helena Guimarães Lara pela orientação, dedicação e amizade e por ampliar o horizonte do meu pensar.

Aos professores Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Dr. Osvaldo de Freitas e Dr. Heitor Panzeri pela co-orientação e amizade.

Ao professor Dr. David Simon Jones da *Queen's University of Belfast* pela co-orientação, amizade e apoio total ao meu projeto de estágio de doutorado no exterior, tornando meu sonho realidade. Aos amigos Tommy, Catherine e ao professor Dr. Gavin P. Andrews pelo apoio e amizade durante meu estágio de doutorado na *QUB (Belfast)*.

Aos professores Dr. João Luis Callegari Lopes, Dra. Selma Lucy Franco, Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso, Dra. Marli Miriam Souza Lima e Ms. Elza Maria Guimarães Barbosa pela amizade e apoio ilimitado durante todo este trabalho.

Aos professores Dra. Luciana A. Casemiro e Dr. Carlos Henrique G. Martins, pela amizade e apoio.

Aos técnicos e funcionários da FCFRP (USP), em particular ao José Orestes, José Maria, Mário e Franklin pela amizade, carinho e atenção.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação da FCFRP, Ana, Rosana e Eleni pela ajuda e atenção.

A todos meus amigos de laboratório Ricardo, Mônica, Paulo, Karla, Camila, Camila Redigueri, Giovana, Daniel, Alessandra, Katiana, Priscila, Renata e Alexandre pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos e funcionários da Universidade Estadual de Maringá Cláudio, Nair, Sônia e Helena pela amizade e apoio ilimitado.

Aos professores Dr. Luiz Fernando Lopes Guimarães e Dr. Roberto Santana da Silva por disponibilizar o aparelho de CLAE e também a funcionária Maria Perpétua F. M. Del Lama, pelo apoio.

Ao professor Dr. Lionel Segui Gonçalves da FFCLRP-USP pelo apoio, material bibliográfico e amostra de própolis.

Ao Departamento de Físico-química do Instituto de Química (UNESP), pelas fotomicrografias eletrônicas.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PPG) e ao Departamento de Farmácia e Farmacologia (DFF) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela dedicação e apoio ilimitados.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a CAPES pelo suporte financeiro.

Faça algo mais do que existir:
viva;
Faça algo mais do que ler:
assimile;
Faça algo mais do que olhar:
observe;
Faça algo mais do que ouvir:
escute;
Faça algo mais do que escutar:
compreenda;
Faça algo mais do que pensar:
medite;
Faça algo mais do que falar:
diga algo útil;
Faça algo mais do que projetar:
execute;
Faça algo mais do que esperar o momento favorável:
crie-o.

(Anônimo)

RESUMO

BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal.** 2006. 318 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

As doenças periodontais constituem um grupo de condições inflamatórias e infecciosas que afetam as estruturas de suporte dental, resultando na formação de bolsas entre a gengiva e o dente que causam retração gengival e a formação de um ambiente ideal para o crescimento de microorganismos, podendo progredir e causar a perda do dente. O tratamento fundamenta-se na remoção dos microorganismos responsáveis pela infecção e a utilização de antimicrobianos e/ou antiinflamatórios. Existem vários estudos comprovando a atividade da própolis no tratamento de doenças periodontais, na forma de solução extrativa. Além disso, nos dias de hoje, busca-se o controle das bactérias subgengivais através da liberação dos fármacos no interior da bolsa periodontal a partir de sistemas biodegradáveis ou não, permanecendo por tempo pré-determinado, exercendo ação terapêutica. Nesse sentido, no presente trabalho, dois sistemas para liberação de própolis no interior da bolsa periodontal foram desenvolvidos e caracterizados. Os sistemas contendo micropartículas de própolis foram baseados em semi-sólido bioadesivo termo-sensível, formado por poloxamer 407 e Carbopol 934P[®], e em precursor de fase líquida cristalina, formado por álcool cetílico etoxilado 20-OE e propoxilado 5-OP e miristato de isopropila, sendo que ambos demonstraram propriedades adequadas à liberação de própolis intrabolsa periodontal. A determinação do perfil de liberação *in vitro* desses sistemas demonstrou que a própolis pode ser liberada de forma controlada por um período de, no mínimo, sete dias no interior da bolsa periodontal.

Palavras-chave: Doença periodontal. Microencapsulação. Atividade antimicrobiana. Reologia. Viscoelasticidade.

ABSTRACT

BRUSCHI, M. L. **Development and characterisation of into the periodontal pocket propolis delivery systems.** 2006. 318 s. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Periodontal diseases are a group of inflammatory and infectious conditions that affects the supporting structures of the teeth. It results in the formation of pockets between the soft tissue of the gingiva and the tooth, producing gingival retraction and an ideal environment to the microorganisms growth and can eventually cause the tooth loss. The treatment of periodontal diseases is based on the removing of microorganisms and the utilization of antimicrobial and anti-inflammatory agents. There are many studies showing the propolis activity on the periodontal diseases treatment, using propolis extractive solution. Moreover, nowadays, the treatments aim the control of subgingival bacteria through the drug delivery into the periodontal pocket from biodegradable or not-biodegradable systems, staying of a pre-determined time, exerting therapeutic action. Thus, in this exclusive study, two into the periodontal pocket propolis delivery systems were developed and characterised. Systems containing propolis microparticles were based in thermo-sensitive bioadhesive semi-solid, composed by poloxamer 407 with Carbopol 934P[®], and based in precursor system of liquid crystalline phase, composed by 20-OE ethoxilated and 5-OP propoxylated cetyl alcohol with isopropyl myristate. Both of the systems had showed suitable properties to delivery propolis into the periodontal pocket. The determination of *in vitro* delivery behaviour of these systems showed that the propolis can be delivered of a controlled way for a time of, at least, seven days within the periodontal pocket.

Keywords: Periodontal disease. Microencapsulation. Antimicrobial activity. Rheology. Viscoelasticity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama de corte longitudinal de um dente molar.....	33
Figura 2.	Estrutura histológica dos tecidos gengivais.....	34
Figura 3.	Diagrama ilustrando uma bolsa periodontal.....	39
Figura 4.	Analizador de textura TA-XTplus e curva típica de análise do perfil de textura (TPA).....	104
Figura 5.	Esquema do teste in vitro de mucoadesão e gráfico típico do tempo versus força necessária para a remoção do disco de mucina a partir da formulação.....	105
Figura 6.	Desenho do equipamento utilizado na determinação do trabalho de seringueamento.....	106
Figura 7.	Aparato utilizado como suporte e para agitação do meio de dissolução....	116
Figura 8.	Dispositivo mimetizador de bolsa periodontal para estudo do perfil de liberação in vitro de fármacos a partir de sistemas semi-sólidos SLIB.....	117
Figura 9.	Perfil cromatográfico da crisina (padrão), obtido por CLAE em 310 nm..	124
Figura 10.	Curva de calibração da crisina, obtida por CLAE em 310 nm.....	125
Figura 11.	Cromatogramas obtidos para os extratos de própolis EFEI 97 e EFEI 2002.....	126
Figura 12.	Micrografias de micropartículas de gelatina contendo própolis obtidas por spray-drying com extrato EFEI 97 e EFEI 2002.....	128
Figura 13.	Distribuição de tamanho das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis FEI 97 (MPEFEI 97).....	129
Figura 14.	Distribuição de tamanho das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis FEI 2002 (MPEFEI 2002).....	131
Figura 15.	Reogramas de fluxo das formulações monopoliméricas contendo 10%, 15% ou 20% de poloxamer 407.....	136
Figura 16.	Reogramas de fluxo das formulações monopoliméricas contendo 0,10%; 0,15%; 0,20% ou 0,25% de Carbopol 934P®	137
Figura 17.	Reogramas de fluxo das formulações poliméricas binárias contendo 10% de poloxamer 407 e 0,10%; 0,15%; 0,20% ou 0,25% de Carbopol 934P®	138
Figura 18.	Reogramas de fluxo das formulações poliméricas binárias contendo 15% de poloxamer 407 e 0,10%; 0,15%; 0,20% ou 0,25% de Carbopol 934P®	139

Figura 19. Reogramas de fluxo das formulações poliméricas binárias contendo 20% de poloxamer 407 e 0,10%; 0,15%; 0,20% ou 0,25% de Carbopol 934P®	140
Figura 20. Módulo elástico G' e módulo viscoso G'' em função da frequência para as formulações monopoliméricas contendo poloxamer 407 (P407) nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	144
Figura 21. Viscosidade dinâmica η' e tangente de perda $\tan \delta$ em função da frequência para as formulações monopoliméricas contendo poloxamer 407 (P407) nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	145
Figura 22. Módulo elástico G' e módulo viscoso G'' em função da frequência para as formulações monopoliméricas contendo Carbopol 934P® (C934P) nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	147
Figura 23. Viscosidade dinâmica η' e tangente de perda $\tan \delta$ em função da frequência para as formulações monopoliméricas contendo Carbopol 934P® (C934P) nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	148
Figura 24. Módulo elástico G' e módulo viscoso G'' em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 10% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P® nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	149
Figura 25. Viscosidade dinâmica η' e tangente de perda $\tan \delta$ em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 10% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P® nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	150
Figura 26. Módulo elástico G' e módulo viscoso G'' em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 15% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P® nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	151
Figura 27. Viscosidade dinâmica η' e tangente de perda $\tan \delta$ em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 15% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P® nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	152
Figura 28. Módulo elástico G' e módulo viscoso G'' em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 20% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P® nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	153
Figura 29. Viscosidade dinâmica η' e tangente de perda $\tan \delta$ em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 20% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P® nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	154

Figura 30. Módulo elástico G' em função da temperatura na frequência oscilatória de 1,0 Hz das formulações monopoliméricas contendo P407 (% p/p) e poliméricas binárias contendo P407 – C934P (% p/p).....	159
Figura 31. Fotografia obtida por microscopia óptica (400X) do sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis SBTS-1 preparado a 20 °C.....	163
Figura 32. Fotografia obtida por microscopia óptica (400X) do sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis SBTS-2 preparado a 20 °C.....	163
Figura 33. Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema SBTS-1.....	165
Figura 34. Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema SBTS-2.....	166
Figura 35. Reograma de fluxo do sistema bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis SBTS-1 nas temperaturas de 5°C, 25 °C e 37 °C.....	167
Figura 36. Reograma de fluxo do sistema bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis SBTS-2 nas temperaturas de 5°C, 25 °C e 37 °C.....	167
Figura 37. Módulo elástico G' e módulo viscoso G'' em função da frequência para os sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	169
Figura 38. Viscosidade dinâmica η' e tangente de perda $\tan \delta$ em função da frequência para os sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C.....	170
Figura 39. Fotografias obtidas por microscopia óptica (400X) dos sistemas com micropartículas de gelatina contendo própolis PFCL-2 e PFCL-3.....	176
Figura 40. Reogramas de fluxo do sistema PFCL-2 sem e com micropartículas contendo própolis nas temperaturas de 25 °C e 37 °C.....	177
Figura 41. Reogramas de fluxo do sistema PFCL-3 sem e com micropartículas contendo própolis nas temperaturas de 25 °C e 37 °C.....	178
Figura 42. Curvas de viscosidade (25 e 37 °C) dos sistemas PFCL-2 e PFCL-3 com e sem micropartículas.....	179
Figura 43. Módulo elástico G' em função da frequência para as formulações PFCL-2 e PFCL-3 com e sem micropartículas.....	181

Figura 44.	Módulo viscoso G'' em função da frequência para as formulações PFCL-2 e PFCL-3 com e sem micropartículas.....	181
Figura 45.	Viscosidade dinâmica η' em função da frequência para as formulações PFCL-2 e PFCL-3 com e sem micropartículas.....	182
Figura 46.	Tangente de delta $\tan \delta$ em função da frequência para as formulações PFCL-2 e PFCL-3 com e sem micropartículas.....	183
Figura 47.	Perfil de liberação da dispersão 4% (V/V) do extrato EFEI 2002 e das micropartículas de gelatina contendo própolis MPEFEI 2002.....	186
Figura 48.	Perfis de liberação a partir dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis PFCL-2 e PFCL-3.....	187
Figura 49.	Perfis de liberação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida contendo extrato de própolis não-microencapsulado PFCL-2 e PFCL-3...	187
Figura 50.	Perfis de liberação a partir dos sistemas semi-sólidos bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis SBTS-1 e SBTS-2.....	188
Figura 51.	Perfis de liberação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida, com micropartículas de gelatina contendo própolis, e dos sistemas semi-sólidos bioadesivos contendo micropartículas de própolis.....	190

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Origem botânica da própolis.....	45
Quadro 2.	Principais flavonas e flavonóis presentes na própolis.....	48
Quadro 3.	Flavanonas isoladas e identificadas na própolis.....	49
Quadro 4.	Derivados do álcool e do ácido cinâmico observados na própolis.....	50
Quadro 5.	Derivados do ácido benzóico encontrados na própolis.....	51
Quadro 6.	Filmes biodegradáveis estudados para a utilização com dispositivos intrabolsa na doença periodontal.....	72
Quadro 7.	Géis hidrofilicos estudados para a utilização como dispositivos SLIB na doença periodontal.....	74
Quadro 8.	Fórmula da saliva artificial utilizada no estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> dos sistemas de liberação intrabolsa.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sistema de eluição por gradiente utilizado na análise cromatográfica.....	94
Tabela 2 –	Condições experimentais de secagem.....	96
Tabela 3 –	Composição dos sistemas semi-sólidos bioadesivos termo-sensíveis (SBTS) contendo micropartículas de própolis.....	108
Tabela 4 –	Fórmulas de sistema precursor de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis.....	112
Tabela 5 –	Resultados das análises físico-químicas das amostras de própolis.....	121
Tabela 6 –	Resultados das análises físico-químicas dos extratos de própolis.....	123
Tabela 7 –	Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de crisina analisadas.....	126
Tabela 8 –	Resultados da quantificação do extrato de própolis por CLAE.....	127
Tabela 9 –	Distribuição de tamanho das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis EFEI 97 (MPEFEI 97).....	128
Tabela 10 –	Distribuição de tamanho das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis EFEI 2002 (MPEFEI 2002).....	130
Tabela 11 –	Teor de encapsulação do extrato de própolis nas micropartículas de gelatina.....	131
Tabela 12 –	Eficiência de encapsulação do extrato de própolis nas micropartículas de gelatina.....	132
Tabela 13 –	Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição de crescimento microbiano produzidos pelos extratos de própolis, pelas micropartículas de gelatina contendo própolis e pelos controles positivo e negativo (Álcool etílico), através da técnica de DA.....	133
Tabela 14 –	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos de própolis e das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis frente aos microrganismos testados.....	134
Tabela 15 –	Valores obtidos para o índice de consistência (k) das formulações compostas de poloxamer 407 (P407), Carbopol 934P [®] (C934P) e suas misturas binárias.....	141
Tabela 16 –	Valores obtidos para o índice de comportamento de fluxo (n) das formulações compostas de poloxamer 407 (P407), Carbopol 934P [®] (C934P) e suas misturas binárias.....	142

Tabela 17 – Valores observado e calculado para o modulo elástico (G') das formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 (P407) e Carbopol 934P [®] (C934P).....	156
Tabela 18 – Temperatura de transição sol/gel ($T_{sol/gel}$) obtida para as formulações monopoliméricas de P407 e para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 (P407) e Carbopol 934P [®] (C934P).....	158
Tabela 19 – Propriedades mecânicas das formulações compostas de poloxamer 407(P407), Carbopol 934P [®] (C934P) e suas misturas binárias determinadas através da análise do perfil de textura.....	160
Tabela 20 – Força mucoadesiva das formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 (P407) e Carbopol 934P [®] (C934P).....	161
Tabela 21 – Efeitos do poloxamer 407 (P407) e do Carbopol 934P [®] (C934P) no trabalho de seringueamento das formulações poliméricas binárias.....	162
Tabela 22 – Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema bioadesivo termo-sensível SBTS-1.....	164
Tabela 23 – Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema bioadesivo termo-sensível SBTS-2.....	165
Tabela 24 – Índice de consistência (k) e índice de comportamento de fluxo (n) dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis com micropartículas contendo própolis.....	168
Tabela 25 – Temperatura de gelificação ($T_{sol/gel}$) obtida através do método mecânico (preliminar) e método reológico oscilatório dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis.....	171
Tabela 26 – Propriedades mecânicas dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis determinadas através de análise do perfil de textura.....	172
Tabela 27 – Força mucoadesiva dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis.....	172
Tabela 28 – Trabalho necessário para expelir a partir de uma seringa os sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis.....	173
Tabela 29 – Teor de própolis nos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis.....	174
Tabela 30 – Recuperação do método de quantificação por CLAE da própolis presente nos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis.....	174

Tabela 31 – Volume de sedimentação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis.....	175
Tabela 32 – Valores obtidos dos parâmetros da Lei da Potência para os sistemas PFCL contendo ou não micropartículas.....	180
Tabela 33 – Propriedades mecânicas dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com e sem micropartículas de gelatina contendo própolis.....	184
Tabela 34 – Seringueabilidade dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com e sem micropartículas de gelatina contendo própolis.....	185
Tabela 35 – Teor de própolis nos sistemas precursores de fase cristalina líquida contendo micropartículas de própolis.....	185
Tabela 36 – Recuperação do método de quantificação por CLAE da própolis presente nos sistemas precursores de fase cristalina líquida.....	186
Tabela 37 – Análise dos dados obtidos com o ensaio de liberação <i>in vitro</i> a partir dos sistemas com micropartículas.....	188
Tabela 38 – Tempo necessário para a liberação de 10, 30 ou 50% da concentração original de própolis a partir dos sistemas desenvolvidos.....	189

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACEP	Álcool Cetílico Etoxilado 20-OE e Propoxilado 5-OP
ANOVA	Análise de Variância
APT	Análise do Perfil de Textura
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
C934P	Carbopol 934P [®]
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DA	Difusão em Agar
EFEI2002	Extrato de própolis FEI2002
EFEI97	Extrato de própolis FEI97
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fase em Acetato de Etila
FEI	Fazenda Experimental de Iguatemi
FEI2002	Amostra de própolis coletada na Fazenda Experimental de Iguatemi em 2002
FEI97	Amostra de própolis coletada na Fazenda Experimental de Iguatemi em 1997
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MI	Miristato de Isopropila
MPEFEI2002	Micropartículas preparadas com extrato de própolis EFEI2002
MPEFEI97	Micropartículas preparadas com extrato de própolis EFEI97
P407	Poloxamer 407

PFCL	Sistema Precursor de Fase Cristalina Líquida
pH	Potencial Hidrogeniônico
RS	Resíduo Seco
RVL	Região Viscoelástica Linear
SBTS	Sistema Bioadesivo Termo-Sensível
SLIB	Sistema de Liberação Intrabolsa
SM	Solução Mãe
TSB	<i>Trypitic Soy Broth</i>
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultra Violeta
VIS	Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

ε	absortividade específica
%	por cento
λ	comprimento de onda
®	marca registrada
A	absorvância
F	volume de sedimentação
FD	fator de diluição
g	grama
G'	módulo elástico
G''	módulo viscoso
G'_{mix}	módulo elástico da mistura
h	hora
Hz	Hertz
K	constante cinética de incorporação de características estruturais e geométricas do dispositivo de liberação
k	índice de consistência
m	massa
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
M_t	quantidade liberada
M_ϕ	quantidade total
n	expoente indicador do mecanismo de liberação
n	índice de fluxo

N	Newtons
°C	graus Celsius
°GL	graus Gay Lussac
p	peso
p	significância do teste estatístico
Pa	Pascal
r^2	coeficiente de regressão
s	desvio padrão
S	inclinação da curva de calibração
s	segundo
t	tempo de liberação
$\tan \delta$	tangente de perda
TF	teor de flavonóides
$T_{\text{sol/gel}}$	temperatura de transição sol/gel (gelificação)
V	volume
V_s	volume do sedimento formado
V_t	volume total
γ	gradiente de cisalhamento
$\Delta G'$	diferença do módulo elástico
η'	viscosidade dinâmica
μL	microlitro
σ	tensão de cisalhamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	32
2.1 A DOENÇA PERIODONTAL.....	33
2.1.1 Especificidade bacteriana.....	37
2.1.2 A bolsa periodontal.....	38
2.1.3 Tratamento da doença periodontal.....	40
2.2 PRÓPOLIS.....	42
2.2.1 Histórico.....	43
2.2.2 Origem botânica.....	44
2.2.3 Composição química.....	46
2.2.4 Atividade biológica.....	53
2.2.5 Toxicidade e efeitos alergênicos.....	54
2.2.5.1 Efeitos alergênicos.....	55
2.2.5.2 Efeitos tóxicos.....	56
2.3 PRÓPOLIS E PERIODONTIA.....	59
2.3.1. Preparações farmacêuticas com própolis para periodontia.....	62
2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO INTRABOLSA PERIODONTAL.....	63
2.4.1 Vantagens e desvantagens.....	66
2.4.2 Características.....	66
2.4.3 Classificação.....	67
2.4.3.1 Fibras.....	68
2.4.3.2 Filmes.....	69
2.4.3.2.1 Filmes não-biodegradáveis.....	70

2.4.3.2.2 Filmes biodegradáveis.....	71
2.4.3.3 Dispositivos injetáveis.....	73
2.4.3.3.1 Pomadas.....	73
2.4.3.3.2 Géis hidrofílicos.....	73
2.4.3.3.3 Precursor de fase cristalina líquida.....	76
2.4.3.3.4 Híbridos.....	78
2.4.4 Sistemas bioadesivos na liberação de fármaco intrabolsa periodontal.....	79
2.4.5 Avaliação da efetividade do tratamento da doença periodontal com SLIB.....	80
3 OBJETIVOS.....	82
3.1 OBJETIVO GERAL.....	83
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	83
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
4.1 MATERIAL.....	85
4.1.1 Reagentes, solventes, soluções e matérias-primas.....	85
4.1.2 Equipamentos e acessórios.....	86
4.1.3 Outros.....	88
4.2 MÉTODOS.....	88
4.2.1 Coleta e avaliação da própolis.....	88
4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação.....	88
4.2.1.2 Determinação do teor de cinzas.....	89
4.2.1.3 Determinação do teor de ceras.....	89
4.2.1.4 Determinação do teor de extrativos em água.....	89
4.2.1.5 Determinação do teor de extrativos em etanol 96 °GL.....	90
4.2.1.6 Determinação do teor de flavonóides totais.....	90
4.2.2 Preparação e avaliação dos extratos de própolis.....	91

4.2.2.1 Determinação do pH.....	92
4.2.2.2 Determinação da densidade relativa.....	92
4.2.2.3 Determinação do resíduo seco.....	92
4.2.2.4 Determinação do teor alcoólico.....	92
4.2.2.5 Determinação do teor de flavonóides totais.....	93
4.2.2.6 Validação do método de análise dos extratos de própolis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	94
4.2.2.7 Análise dos extratos por CLAE.....	95
4.2.3 Preparação e avaliação de micropartículas de gelatina contendo própolis.....	95
4.2.3.1 Análise morfológica.....	96
4.2.3.2 Análise granulométrica.....	96
4.2.3.3 Determinação do teor de encapsulação.....	97
4.2.3.4 Determinação da eficiência de encapsulação.....	97
4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos de própolis e das micropartículas de gelatina contendo própolis.....	98
4.2.4.1 Difusão em agar.....	98
4.2.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima.....	99
4.2.5 Seleção do extrato de própolis e das micropartículas de gelatina contendo própolis a serem utilizados no desenvolvimento dos sistemas de liberação intrabolsa periodontal.....	100
4.2.6 Desenvolvimento e caracterização de sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível.....	100
4.2.6.1 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	101
4.2.6.2 Análise reológica oscilatória.....	102
4.2.6.3 Cálculo do parâmetro de interação.....	102
4.2.6.4 Determinação da temperatura de gelificação.....	103
4.2.6.5 Análise do perfil de textura.....	103

4.2.6.6 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	104
4.2.6.7 Determinação da seringueabilidade.....	106
4.2.6.8 Análise estatística.....	107
4.2.6.9 Preparação e caracterização de sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível com micropartículas contendo própolis.....	107
4.2.6.9.1 Análise morfológica.....	108
4.2.6.9.2 Análise granulométrica.....	108
4.2.6.9.3 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação.....	108
4.2.6.9.4 Determinação da densidade relativa.....	109
4.2.6.9.5 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	109
4.2.6.9.6 Análise reológica oscilatória.....	109
4.2.6.9.7 Determinação da temperatura de gelificação.....	109
4.2.6.9.8 Análise do perfil de textura.....	110
4.2.6.9.9 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	110
4.2.6.9.10 Determinação da seringueabilidade.....	110
4.2.6.9.11 Determinação do teor de própolis.....	110
4.2.6.9.12 Análise estatística.....	111
4.2.7 Desenvolvimento e caracterização de sistema precursor de fase cristalina líquida.....	112
4.2.7.1 Determinação das características de sedimentação.....	112
4.2.7.2 Análise morfológica.....	113
4.2.7.3 Determinação da densidade relativa.....	113
4.2.7.4 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	113
4.2.7.5 Análise reológica oscilatória.....	114
4.2.7.6 Análise do perfil de textura.....	115
4.2.7.7 Determinação da seringueabilidade.....	115

4.2.7.8 Determinação do teor de própolis.....	115
4.2.7.9 Análise estatística.....	115
4.2.8 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da própolis a partir das preparações.....	116
5 RESULTADOS.....	120
5.1 Avaliação das própolis e de seus extratos.....	121
5.2 Preparação e avaliação de micropartículas de gelatina contendo própolis.....	127
5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos de própolis e das micropartículas de gelatina contendo própolis.....	132
5.4 Desenvolvimento e caracterização sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível.....	135
5.4.1 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	135
5.4.2 Análise reológica oscilatória.....	143
5.4.3 Cálculo do parâmetro de interação.....	155
5.4.4 Determinação da temperatura de gelificação.....	158
5.4.5 Análise do perfil de textura.....	159
5.4.6 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	161
5.4.7 Determinação seringueabilidade.....	161
5.4.8 Preparação e caracterização do sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível com micropartículas contendo própolis.....	162
5.4.8.1 Análise morfológica.....	162
5.4.8.2 Análise granulométrica.....	164
5.4.8.3 Determinação da densidade relativa.....	166
5.4.8.4 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	166
5.4.8.5 Análise reológica oscilatória.....	168
5.4.8.6 Determinação da temperatura de gelificação.....	171
5.4.8.7 Análise do perfil de textura.....	172

5.4.8.8 Avaliação <i>in vitro</i> da força mucoadesiva.....	172
5.4.8.9 Determinação da seringueabilidade.....	173
5.4.8.10 Determinação do teor de própolis.....	173
5.5 Desenvolvimento e caracterização de sistema precursor de fase cristalina líquida.....	174
5.5.1 Determinação das características de sedimentação.....	175
5.5.2 Avaliação morfológica.....	176
5.5.3 Determinação da densidade relativa.....	176
5.5.4 Análise reológica de cisalhamento contínuo.....	176
5.5.5 Análise reológica oscilatória.....	180
5.5.6 Análise do perfil de textura.....	183
5.5.7 Determinação da seringueabilidade.....	185
5.5.8 Determinação do teor de própolis.....	185
5.6 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da própolis a partir das preparações.....	186
6 DISCUSSÃO.....	191
6.1 Avaliação das própolis, dos extratos e das micropartículas de gelatina contendo própolis.....	192
6.2 Sistemas de liberação intrabolsa periodontal.....	196
6.2.1 Desenvolvimento e caracterização de sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível.....	197
6.2.2 Desenvolvimento e caracterização de sistema precursor de fase cristalina líquida.....	210
6.3 Estudo do perfil de liberação <i>in vitro</i> da própolis a partir das preparações.....	216
7 CONCLUSÕES.....	220
REFERÊNCIAS.....	223
APÊNDICES.....	265

1 INTRODUÇÃO

A origem do homem moderno é africana e data de aproximadamente 100.000 anos atrás (PENA, 2002). Apesar de ser relativamente novo, o *Homo sapiens* possui um organismo complexo, formado a partir de uma única célula, o óvulo fertilizado, que se divide em outras duas, as quais por sua vez resultam em outras quatro, e assim por diante. Além da divisão, essas unidades básicas do organismo humano vão também se diferenciando e formando tecidos, órgãos e sistemas (VANDER; SHERMAN; LUCIANO, 1981).

Entre os vários sistemas do corpo humano, o digestório possui a importante função de mastigação, ingestão e absorção dos alimentos, e eliminação de parte dos resíduos. É composto por um longo tubo com cerca de 9 metros de comprimento, estendendo-se da cavidade oral ao ânus, chamado de tubo digestivo. A cavidade oral, ou boca, consiste de uma parte anterior menor, o vestíbulo da boca, e outra posterior maior, a cavidade oral propriamente dita. Comunica-se anteriormente com o exterior pela rima bucal, fenda limitada pelos lábios, e posteriormente com a parte bucal da faringe, através do istmo da garganta. As bochechas direita e esquerda constituem suas paredes laterais; a anterior é constituída pelos lábios; a superior pelo palato; e a inferior, pelas partes moles que se estendem da concavidade da mandíbula ao osso hióide. Ainda na cavidade da boca, abrem-se os ductos das glândulas salivares e fazem saliência a língua e os arcos alvéolos-dentários (ERHART, 1987).

Os dentes são órgãos acessórios do sistema digestório. Duros e esbranquiçados, são providos de projeções e facetas que se imbricam (oclusão), de forma que cada conjunto de dentes adapta-se ao outro. Estão implantados nos arcos alveolares das maxilas e mandíbula e têm por função essencial a mastigação, cortando, moendo e misturando os alimentos ingeridos (GUYTON, 1989).

A saúde bucal é muito importante para a manutenção da saúde global do organismo humano. No entanto, vários problemas, tais como neoplasias, disfunções glandulares, cáries e doenças periodontais, acometem a cavidade oral.

As doenças periodontais são condições inflamatórias e infecciosas que afetam as estruturas de suporte dos dentes (MEDLICOT et al., 1994), resultando na formação de bolsas entre a gengiva e o dente que causam retração gengival, além do desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento de microrganismos (PERIOLI et al., 2004). A progressão desse processo destrutivo pode causar a perda do dente (BECKER; BEGER; BECKER, 1979; LINDHE et al., 1983; LISTGARTEN, 1987). A inflamação local, quando severa, pode levar ao aumento dos níveis plasmáticos de marcadores da inflamação sistêmica (D'AIUTO et al., 2004).

O tratamento das doenças periodontais fundamenta-se na remoção das bactérias responsáveis pela infecção através de procedimentos clínicos realizados pelo dentista e aplicação tópica de agentes antimicrobianos e/ou antiinflamatórios (AKALIN et al., 2004; JONES et al., 1996; NORKIEWICZ et al., 2001).

A constante evolução da ciência, buscando a cura de enfermidades e o bem-estar do ser humano, faz com que o mesmo utilize recursos dos reinos mineral, vegetal e animal. O Homem, com seu conhecimento, busca constantemente o desenvolvimento de novos fármacos (BRUSCHI, 2002). Assim, com a pesquisa, foi possível encontrar nas plantas medicinais virtudes, cujo valor tornou-se conhecido (MIGUEL; MIGUEL, 2000). Essas virtudes também foram descobertas por outros seres do reino animal, como é o caso das abelhas *Apis mellifera* L. que, a partir da coleta de material resinoso, gomoso ou balsâmico de botões de flores, sépalas e pétalas, folhas, caules e cascas de árvores, produzem a própolis.

A própolis é uma matéria-prima muito importante na produção de medicamentos, possuindo inúmeras ações farmacológicas, tais como antiinflamatória, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antioxidante, antiprotzoária, hepatoprotetora e cicatrizante (BURDOCK, 1998; BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; BANKOVA, 2005). Além disso, ela tem sido amplamente utilizada na terapêutica, na forma de solução extrativa (etanólica), principalmente pela via oral, ou, ainda, através de preparações semi-sólidas.

Produtos à base de extrato de própolis na forma de dentifrícios e em enxaguatórios bucais têm sido utilizados na odontologia (BURDOCK, 1998; MANARA et al., 1999), sendo que o desenvolvimento e a produção dos mesmos, muitas vezes, ainda são realizados com certo grau de empirismo. Além disso, observam-se na odontologia que algumas formas farmacêuticas utilizadas no controle das bactérias subgengivais não permitem que os fármacos contidos penetrem além de 1 a 2 mm abaixo da margem gengival (BADERSTEN; NILVÉUS; EGELBERG, 1981; FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; ITO et al., 1980; PITCHER; NEWMAN; STRAHAN, 1980; YEUNG; NEWMAN; ADDY, 1983). Por outro lado, a utilização de antimicrobianos e/ou antiinflamatórios por via sistêmica, pode causar vários efeitos colaterais indesejáveis como: gastrite, úlceras, outros transtornos digestivos, hipersensibilidade e desenvolvimento de resistência pelos microrganismos (FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; FRIEDMAN; STEINBERG, 1990).

Nos dias de hoje, os estudos que buscam o controle das bactérias subgengivais estão sendo direcionados no sentido de que os fármacos sejam liberados no interior da bolsa periodontal a partir de sistemas biodegradáveis ou não, permanecendo por tempo pré-

determinado, exercendo ação terapêutica (CESCHEL et al., 2002; JONES et al., 2000; LANGER; PEPPAS, 1981; SAKELLARI et al., 2000).

Existem vários estudos comprovando a atividade da própolis na prevenção de cáries dentais e no tratamento de doenças periodontais. A maioria destas atividades terapêuticas tem sido relacionada com os extratos etanólicos (BURDOCK, 1998; CESCHEL et al., 2002; PARK et al., 1998a). Bruschi et al. (2003a) desenvolveram e caracterizaram micropartículas de gelatina contendo própolis, obtidas por *spray-drying*, demonstrando ser possível a transformação de uma forma farmacêutica líquida, com extrato etanólico de própolis, em sólida, sem a presença de etanol, com velocidade de liberação lenta dos componentes ativos (BRUSCHI et al., 2004) e com a possibilidade de administração no interior da bolsa periodontal.

Dentre os sistemas de liberação intrabolsa periodontal, os injetáveis são vantajosos por serem administrados com relativa simplicidade pelo dentista, através de seringa, por atingir todos os espaços da bolsa, por serem biodegradáveis e por produzirem pouco ou nenhum desconforto ao paciente quando da inserção. Esses sistemas devem possuir inicialmente certa fluidez, facilitando a injeção através de seringa, permitindo o preenchimento de todos os espaços. Em seguida, para que seja mantida no local, a formulação deve sofrer um determinado aumento de viscosidade e/ou possuir propriedades bioadesivas, dificultando a sua remoção da bolsa pelo fluxo do fluido crevicular gengival e da saliva (MEDLICOTT et al., 1994; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996).

Nesse sentido, o presente trabalho, teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal, para o tratamento de doenças periodontais, utilizando-se dois novos sistemas, baseados nas propriedades bioadesivas e de termo-sensibilidade ou liotrópicas.

Dentro deste contexto, foi elaborada uma revisão bibliográfica sobre a doença periodontal, própolis e os sistemas de liberação intrabolsa existentes.

Utilizou-se um conjunto de critérios e normas preestabelecidas de identificação e pureza, tanto farmacopéicos como de uso consagrado na prática analítica, e comparação com outros estudos, além de ensaios microbiológicos, para avaliar a qualidade das duas amostras de própolis e de seus extratos etanólicos.

As características observadas nas própolis e nos extratos levaram a preparação de micropartículas de gelatina contendo própolis, utilizando a técnica por *spray-drying* (BRUSCHI et al., 2003a), e a avaliação das mesmas quanto à distribuição e análise do

tamanho de partículas, estudo por microscopia eletrônica de varredura, eficiência de encapsulação, atividade microbiológica e perfil de liberação *in vitro*.

A partir dos resultados obtidos, foram selecionados um extrato e as respectivas micropartículas de gelatina, assim como a concentração dos mesmos, para serem utilizados no desenvolvimento dos sistemas de liberação intrabolsa periodontal.

Um novo sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível, composto por poloxamer 407 e Carbopol 934P[®], foi desenvolvido, no qual foram incorporadas micropartículas de própolis preparadas *in situ*. Essas micropartículas foram avaliadas quanto à morfologia e granulometria. Ainda foram avaliadas as características de temperatura de gelificação, densidade relativa, propriedades reológicas e mecânicas, mucoadesão, seringueabilidade e o teor de própolis dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis obtidos.

Também foi desenvolvido e caracterizado um sistema precursor de fase cristalina líquida liotrópica, composto por álcool cetílico etoxilado 20-OE e propoxilado 5-OP e miristato de isopropila. O sistema possibilitou a preparação de duas formulações com micropartículas de gelatina contendo própolis, as quais foram avaliadas quanto às características de sedimentação, microscopia óptica, densidade relativa, propriedades reológicas e mecânicas, seringueabilidade e teor de própolis.

O perfil de liberação *in vitro* da propolis a partir dos sistemas desenvolvidos também foi avaliado, utilizando-se um aparelho de liberação simulador de bolsa periodontal, adaptado de Gabarra (2002).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A DOENÇA PERIODONTAL

O termo ‘doença periodontal’ define várias doenças associadas com o periodonto (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988). Trata-se de uma morbidade que afeta as estruturas de suporte dos dentes, nomeadamente o ligamento periodontal, cemento, osso alveolar e gengiva (SEYMOUR; HEASMAN, 1992). Afeta virtualmente a maioria da população mundial sendo a maior fonte de perda de dente após os 25 anos de idade (DEASY et al., 1989).

Os dentes completamente desenvolvidos são constituídos fundamentalmente por tecidos conjuntivos muito modificados (Figura 1), distinguindo-se o órgão dentário (dentina, polpa dentária e esmalte), o periodonto de inserção (cemento, desmodonto e osso alveolar) e o periodonto de proteção (gengiva e cutícula do dente) (COSTACURTA, 1979).

Figura 1. Diagrama de corte longitudinal de um dente molar.

A dentina, constituída por substância orgânica calcificada impregnada de sais minerais, constitui o corpo do dente, reproduzindo sua forma e delimitando sua cavidade, cujo prolongamento na raiz (canal da raiz) termina em um orifício, o forame do ápice do dente. A polpa dental preenche a cavidade e o canal do dente, sendo constituída por tecido conjuntivo mucoso rico em vasos e nervos (ERHART, 1987). O esmalte reveste externamente a dentina da coroa e confina com o cemento ao nível do colo do dente. É extremamente duro e constituído por um tecido inerte quase que exclusivamente inorgânico.

O periodonto de inserção compreende o complexo tecidual (cimento, desmodonto e osso alveolar) responsável pela articulação do dente no alvéolo. O cimento é um tecido ósseo modificado que reveste a raiz dos dentes e confina com o esmalte ao nível de colo do dente. O periósteo alveolar (desmodonto ou ligamento periodontal) é o tecido conjuntivo fibroso que une o cimento ao osso alveolar. Suas fibras colágenas, ligeiramente frouxas, contribuem para permitir a mobilidade dessa articulação. O osso alveolar forra internamente as paredes das cavidades alveolares, possuindo numerosos e pequenos orifícios para a passagem de vasos e fibras nervosas destinados ao periodonto (COSTACURTA, 1979). Já o periodonto de proteção compreende a gengiva e a cutícula do dente. A gengiva é a continuação da mucosa dos lábios e das bochechas que se reflete ao nível dos processos alveolares das arcadas dentárias. Forma ao redor de cada dente uma bainha que circunda o colo do dente. É ricamente vascularizada, mas pouco innervada. A cutícula do dente recobre o esmalte e parece protegê-lo contra a cárie (ERHART, 1987). Juntos, o periodonto de inserção e o de proteção formam o periodonto propriamente dito. Trata-se de um intrincado mosaico de células e proteínas que é primariamente responsável pela inserção dos dentes na cavidade oral. É constituídos de tecidos fibrosos e tecidos mineralizados, cuja interação na formação e convivência destes determinam sua fisiologia na saúde e no reparo da ferida periodontal (ZENÓBIO et al., 1996).

Figura 2. Estrutura histológica dos tecidos gengivais.

O epitélio juncional dental (Figura 2) representa o único exemplo de tecido indiferenciado que persiste até a maturidade e idade avançada. A ausência de diferenciação nesse epitélio pode ser uma adaptação à aderência na superfície do esmalte ou serve para limitar a migração apical do epitélio oral adjacente. Apesar da razão, o resultado é um tecido que não possui a barreira de permeabilidade superficial, mostrando ser permeável a uma variedade de materiais, desde partículas de carbono até proteínas (WILKINS, 1994).

Existe uma forte evidência de que a doença periodontal é causada por componentes microbianos do biofilme dental no interior das áreas subgengival do periodonto (FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; JONES et al., 1996; LISTGARTEN, 1986; SIHORKAR; VYAS, 2001; MONBELLI, 2003). O epitélio juncional é, portanto, uma via pela qual toxinas, antígenos e enzimas derivados de biofilme bacteriano, que se forma na superfície dental, podem penetrar e atingir o tecido conjuntivo subepitelial. Isto inicia um ciclo inflamatório e de injúrias teciduais que facilitam a entrada de irritantes pelo sulco dental e exacerbará os danos (SEYMOUR; HEASMAN, 1992). Eventualmente a destruição tecidual envolverá as estruturas suportes dos dentes e acarretará a perda dental (MEDLICOTT et al., 1994).

Assim, a doença periodontal é uma consequência de uma interação do biofilme bacteriano e seus produtos com as respostas imunológica e inflamatória do hospedeiro. Ela pode ser classificada de acordo com a extensão do tecido periodontal envolvido. A gengivite, o estágio moderado da doença, é causada pelo acúmulo de placa supragengival, a resposta inflamatória é restrita aos tecidos gengivais, sendo caracterizada por intumescimento, vermelhidão e sangramento da gengiva marginal (MEDLICOTT et al., 1994; STEINBERG; FRIEDMAN, 1988). O componente bacteriano do biofilme produz e libera vários tipos de enzimas e toxinas (por exemplo, lipopolissacarídeos e ácido lipoteicoico) os quais difundem através do epitélio juncional e iniciam as alterações inflamatórias no tecido conectivo gengival. Essas mudanças são mediadas por uma variedade de mediadores inflamatórios endógenos incluindo histamina, cininas, eicosanóides de fosfolípídeos de membrana, fatores complemento e lisozimas liberadas de leucócitos polimorfonucleares (SEYMOUR; HEASMAN, 1992). No caso de periodontite, o estágio mais severo da doença periodontal (LISTGARTEN, 1986), as alterações podem se estender a tecidos mais profundos. É caracterizada por uma alteração dramática da microflora, sendo que o número de bactérias Gram-negativas pode aumentar para 70% do total da flora, na maioria anaeróbia (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988). As alterações inflamatórias resultam no rompimento do ligamento do tecido conectivo à superfície da raiz do dente e migração apical do epitélio juncional, que podem resultar na recessão gengival e formação de bolsa, na exposição do

cimento, na perda de osso alveolar e num aumento na mobilidade do dente (SEYMOUR; HEASMAN, 1992).

Assim, a progressão de uma gengivite estabelecida para uma lesão avançada leva a periodontite. Essa pode ser de pré-puberdade, juvenil, de progressão rápida, adulta crônica e refratária (SEYMOUR; HEASMAN, 1992), podendo estar relacionada com alterações na oclusão dos dentes, classificando-se em (LISTGARTEN, 1986):

- periodontite simples (inflamação crônica da gengiva causada por irritação local, por exemplo, biofilme e cálculo, e associada com perda óssea horizontal);
- periodontite composta (destruição óssea angular devida à irritação local e desarmonia oclusal);
- periodontose (degeneração não inflamatória dos tecidos periodontais de suporte que pode ser agravada por trauma oclusal de alterações inflamatórias);
- periodontite oclusal (alterações degenerativas e necróticas nos tecidos periodontais de suporte com alargamento do espaço do ligamento periodontal e reabsorção óssea angular);
- atrofia periodontal (redução da altura do periodonto com afinamento do ligamento periodontal e redução de número de células, provavelmente associada com forças oclusais diminuídas).

A progressão da periodontite é episódica com aumentos súbitos de atividade seguidos por períodos de quiescência (SEYMOUR; HEASMAN, 1992). A perda das estruturas de suporte do dente faz com que o mesmo se torne móvel, não desempenhando seu papel adequadamente (MELICOTT et al., 1994). Se não houver tratamento, as estruturas de suporte degeneram ao ponto onde não é possível reparar e a extração do dente é requerida (BECKER; BERG; BECKER, 1979; BUCKLEY; CROWLEY, 1984; LINDHE et al., 1983).

As respostas inflamatória e imunológica presentes na doença periodontal podem ser afetadas por uma variedade de fatores sistêmicos que podem alterá-las do tecido ao biofilme. Além disso, certas desordens sistêmicas podem ter um efeito direto nos tecidos periodontais, representando as manifestações periodontais de uma doença sistêmica. Como exemplos, destacam-se as desordens endócrinas, tais como o diabetes melitus, desordens genéticas, tais como a Síndrome de Down (Mongolismo), hipofosfatasia (SEYMOUR; HEASMAN, 1992), gravidez (LÖE; SILNESS, 1963), estresse psicossocial e estilo de vida (ALEKSEJÚNIENÈ et al., 2002).

2.1.1 Especificidade bacteriana

Existem centenas de espécies de bactérias na cavidade oral, mas apenas um número limitado exerce importância na doença periodontal (RODRIGUES et al., 1999). O papel bacteriano na etiologia dessa doença é bem estabelecido (CETIN, 2005; LISTGARTEN, 1986; MEDLICOTT, 1994; PAGE, 2004). O sulco gengival não é completamente livre de bactérias e uma escassa microflora consistindo principalmente de espécies aeróbias Gram-positivas podem ser isoladas a partir de sítios normais (SLOTS, 1979; LOESCHE et al., 1985). Essas bactérias são compatíveis com o tecido saudável, havendo um equilíbrio com os mecanismos de defesa do hospedeiro. Um aumento no número de bactérias subgengivais, seguida pela alteração da microflora é observada no desenvolvimento das doenças periodontais (MEDLICOTT et al., 1994). As bactérias se acumulam no espaço, ou bolsa, que desenvolve entre as raízes do dente afetado e os tecidos moles, podendo interagir com o hospedeiro sem a penetração direta no tecido (MONBELLI, 2003).

Frank (1980) avaliou a penetração bacteriana na bolsa periodontal em periodontite humana avançada, observando que entre o biofilme subgengival apical e o epitélio juncional da parede da bolsa, várias camadas de leucócitos polimorfonucleares foram observados com numerosos fagossomas demonstrando a fagocitose de bactérias.

Existem numerosos tipos de bactérias relacionadas com doença periodontal, sendo que uma microflora específica tem sido evidenciada em determinados pacientes. As bactérias mais comumente isoladas nesses casos são Gram-negativas anaeróbias restritas ou facultativas (SLOTS, 1979; LOSCHE et al., 1985; TANNER et al., 1979). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (KAPLAN et al., 1989; SLOTS, 1982), *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum* (BOLSTAD; JENSEN; BAKKEN, 1996), *Wolinella recta*, *Capnocytophaga* sp., *Selomonas sputigen*, *Eikenella corrodens*, *Bacterioides* sp. (*Bacterioides gingivalis*, *Bacterioides intermedius*, *Bacterioides forsythus*, *Bacterioides melaninogenicus*) (SEYMOUR; HEASMAN, 1992), *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Treponema* sp. (JORGENSEN; SLOTS, 2000), *Eubacterium* sp. (LOESCHE et al., 1985), *Candida* sp. (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*) (SEYMOUR; HEASMAN, 1992) e espiroquetas (SAGLIE et al., 1982) têm sido freqüentemente associadas com várias formas de periodontites.

Bactérias Gram-negativas anaeróbias pigmentadas de preto também têm sido freqüentemente isoladas em uma variedade de casos clínicos (DAHLEN, 1993). Na cavidade oral, são conhecidas como periodontopatogênicas, sendo *Prevotella intermedia*,

Porphyromonas gingivalis e *Prophyromonas endodontalis* as espécies mais patogênicas do grupo (JORGENSEN; SLOTS, 2000; RODRIGUES et al., 1999).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que muitas dessas bactérias podem produzir uma variedade de enzimas e toxinas as quais podem interferir com muitas funções celulares (SEYMOUR; HEASMAN, 1992). Espécies *Bacterioides* e *A. actinomycetemcomitans* produzem colagenase e outras enzimas proteolíticas que podem contribuir para a destruição do tecido local. Essas bactérias também podem produzir fatores que inibem o mecanismo de defesa normal na bolsa, inativa anticorpos e previne a fagocitose. *A. actinomycetemcomitans* secretam uma leucotoxina e *B. gingivalis* pode produzir um lipopolissacarídeo que induz destruição por uma ação direta nas células ósseas (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

2.1.2 A bolsa periodontal

Uma das características clínicas da doença periodontal é a formação de uma bolsa, a qual é constituída por um sulco aprofundado patologicamente (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988) entre a gengiva e o dente, que causa retração da gengiva marginal (Figura 3) e o desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento de bactérias anaeróbias responsáveis pela doença (PERIOLI et al., 2004).

Em um sulco gengival normal, o espaço entre a gengiva e o dente mede entre 1 a 3 mm de profundidade. Entretanto, durante a periodontite, a profundidade da bolsa excede 5 mm, podendo chegar a 12 mm (MEDLICOTT et al., 1994). Essa progressiva formação de bolsa leva à destruição dos tecidos de suporte periodontal, seguido por alta mobilidade e esfoliação do dente (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

A bolsa periodontal é constituída por um epitélio de um dos lados e cemento do dente do outro. Não existe um espaço real entre esses dois tecidos. A falta de adesão é demonstrada pela inserção de uma sonda periodontal, e alterações no nível de adesão ou profundidade da bolsa são monitoradas para avaliar a progressão da doença. A formação da bolsa periodontal permite que bactérias colonizem a superfície da raiz do dente e a camada mais externa do cemento. O ambiente da bolsa facilita o crescimento de microrganismos anaeróbios (SEYMOUR; HEASMAN, 1992).

Figura 3. Diagrama ilustrando uma bolsa periodontal.

Overman e Salomen (1994) caracterizaram as células do epitélio juncional diretamente aderidas ao dente, na doença periodontal. Observaram que alterações degenerativas com formação de bolsa afetam células individuais numa proporção maior que regiões inteiras, e que a estrutura de ligamento epitelial parece ser mais resistente, persistindo na superfície do dente durante a degeneração das células diretamente aderidas ao dente. Além disso, o estudo demonstrou que essas células, no caso de doença periodontal, exibem habilidade proliferativa, sugerindo uma característica de regeneração para as mesmas.

O epitélio de bolsas periodontais provocadas em cães foi avaliado por microscopia (MULLER-GLAUSER; SCHOROEDER, 1982). Os estudos revelaram que o epitélio da bolsa não adere ao dente, forma estrias irregulares, apresenta-se às vezes ulcerado, consiste de células com tendência à diferenciação, apresenta uma lâmina basal complexa com descontinuidade e multiplicidade, é infiltrado principalmente por linfócitos, blastos T e B e células plasmáticas, sendo transmigrado por granulócitos neutrofílicos. Concluíram, ainda, que a estrutura do epitélio da bolsa reflete a heterogeneidade do biofilme adjacente, que essa estrutura juntamente com a ausência de grânulos revestidores de membrana é a base para uma

permeabilidade extremamente alta, e que as estrias epiteliais podem conduzir e coletar substâncias estranhas às quais podem ser mais facilmente reconhecidas pelos leucócitos.

Em sítios saudáveis do periodonto ocorre a presença de pequenas quantidades de fluido crevicular gengival (0,04 μL), com baixas taxas de fluxo (0,03 $\mu\text{L}/\text{min}$) e concentração de proteínas similar ao fluido extracelular (HATTINGH; HO, 1980). Por outro lado, nos sítios doentes há um aumento na produção de fluido e a composição protéica é semelhante à do soro, indicando a formação de exsudato nesses locais. O volume e a taxa de fluxo dependem do grau da infecção e da inflamação em cada local. Volumes de 0,5 μL e fluxos de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 0,9 $\mu\text{L}/\text{min}$ têm sido freqüentemente relatados (GOODSON, 1989; HATTINGH; HO, 1980; STOLTZE, 1992), podendo alcançar valores de 150 $\mu\text{L}/\text{h}$ (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

2.1.3 Tratamento da doença periodontal

Como a especificidade do biofilme dental em relação à infecção na doença periodontal é fato evidente (GABARRA, 2002; PAGE, 2004), o combate às bactérias, a adequação do meio e a prevenção são fatores primordiais na restituição da saúde (ADDY, 1986; GREENSTEIN et al., 1986; LOESCHE, 1976; QUEE, 1989; SLOTS, 1976; MEDLICOTT et al., 1994; NEWMAN, 1995; WILLIAMS; HOWELL, 1993). Assim, o tratamento periodontal tem por objetivo a cura do tecido inflamado, a redução do número de bactérias patogênicas e a eliminação da bolsa (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

O aumento da patogenicidade da placa subgengival modifica sua estrutura fazendo com que ocorra a evolução da doença. Dessa maneira, o tempo torna o tratamento progressivamente mais difícil, necessitando de procedimentos terapêuticos cada vez mais agressivos e complexos (CETIN et al., 2005; GABARRA, 2002).

É difícil o controle dos microrganismos, uma vez que há um processo contínuo de formação de biofilme na cavidade bucal, sendo fonte permanente na indução da cárie e/ou inflamação gengival (GREENSTEIN et al., 1986; KILIAN et al., 1979; LINDHE et al., 1983; LOESCHE, 1990; NEWMAN, 1995; SEYMOUR; HEASMAN, 1992; POULET; DUFFAUT; LODTER, 1999).

Estudos evidenciaram diferenças marcantes entre as metodologias e as substâncias utilizadas para o combate da moléstia periodontal (GABARRA, 2002). A gengivite pode ser controlada por meios mecânicos, porém muitas pessoas não conseguem um

controle domiciliar efetivo da placa bacteriana; nesses casos, o uso de agentes químicos, como os anti-sépticos, pode ser útil, embora em poucas horas o número de microrganismos possa voltar a ser como o inicial (JEFFCOAT, 1994; JOYSTON-BECHAL; EMSLIE, 1987; PEDRAZZI, 1999). Assim, o tratamento periodontal tradicional consiste no controle do biofilme subgengival, através de um meticuloso desbridamento periódico da bolsa (curetagem), raspagem e aplainamento radicular, realizado pelo dentista, associado ao controle da placa supragengival, através de cuidados domiciliares por parte do paciente (HELLDÉN; LISTGARTEN; LINDHE, 1979; HOLBOROW, 1986; JOYSTON-BECHAL; EMSLIE, 1987; LINDHE; NYMAN, 1984; RAMFJORD, 1987; VAN DER OUDERAA, 1991). A raspagem é um meio mecânico de se remover o cálculo e o biofilme, a curetagem envolve a limpeza do tecido mole inflamado e o aplainamento ou alisamento da radicular remove o tecido dental necrótico da superfície da raiz (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

Agentes antiinflamatórios esteroidais (glicocorticóides) e não-esteroidais (salicilatos, pirazolonas, derivados da pirazolona, derivados do ácido fenilpropionico, derivados do ácido antranílico, derivados do ácido fenilacético e inibidores seletivos da enzima cicloxigenase) têm sido estudados e utilizados como adjuvantes ao tratamento mecânico de limpeza realizado pelo dentista (CETIN et al., 2004, 2005; JONES et al., 1999; SAMATI; YUKSEL; TARIMCI, 2006; SEYMOUR; HEASMAN, 1992). Além disso, a utilização de alendronato de sódio para o tratamento das lesões periodontais com reabsorção óssea foi proposta, obtendo-se uma melhora significativa nos parâmetros clínicos, com um potente efeito inibitório na reabsorção óssea e a neoformação de osso (REDDY; KUMAR; VEENA, 2005).

No entanto, muitas vezes o objetivo desse tratamento não é alcançado por problemas anatômicos e/ou técnicos, como a formação de nichos entre as raízes dentais e a capacidade de alguns microrganismos adentrarem nos tecidos conjuntivos, dificultando e, impossibilitando o acesso durante os procedimentos mecânicos (FRANK, 1980; KINANE; RADVAR 1999; LISTGARTEN et al., 1978; LÖE et al., 1965; OKUDA et al., 1992). Quando a eliminação da bolsa não é alcançada por estes métodos, a cirurgia é utilizada para remover o tecido necrótico e reduzir a profundidade da bolsa (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

Essas limitações da terapêutica permitem que bolsas refratárias ao tratamento se reativem, fato que tem levado cientistas a procurarem solução alternativa como o tratamento medicamentoso com repetidas administrações sistêmica ou tópica de agentes antibacterianos (AINAMO et al., 1992; DEASY et al., 1989; FRIEDMAN; STEINBERG, 1990; GIORDANO et al., 1992; JONES et al., 1992; JORGENSEN; SLOTS, 2000; KINANE;

RADVARG, 1999; LOESCHE, 1976, 1979; RETHMAN; RETHMAN; SUZUKI, 1995; THOMSON et al., 1992; TURNBULL, 1989).

Vários autores têm descrito os feitos clínicos e microbiológicos de antimicrobianos importantes na doença periodontal (LOPEZ et al., 2002; NORKIEWICZ et al., 2001; PAVIA et al., 2003, 2004; RODRIGUES et al., 2004). A utilização de agentes antiplaca garante a saúde periodontal pela manutenção de um alto padrão de controle do biofilme bacteriano e de formação de cálculo (SEYMOUR; HEASMAN, 1992). Além disso, antibióticos específicos, administrados no local ou sistemicamente, são hábeis em reduzir a patogenicidade da microflora subgingival, melhorando a resposta clínica do tratamento periodontal (AKALIN et al., 2004; PAGE, 2004; SEYMOUR; HEASMAN, 1992).

Os principais agentes antimicrobianos estudados e utilizados compreendem: enzimas (mucínase, pâncreas desidratado, mutanase, dextranase e hipotiocianato de lactoperoxidase) (GENCO, 1981; SEYMOUR; HEASMAN, 1992); fenóis (timol), sais metálicos (zinco e cobre), saliflúor, aminoálcoois (octapinol e decapinol); triclosan, lauril sulfato de sódio (ELEY, 1999); sais quaternários de amônio (cloreto de benzetônio, cloreto de benzalcônio, cloreto de cetilpiridínio e brometo de domofeno), bisbiguanidas (clorexidina, hexetidina e alexidina), bispíridinas (octenidina) (ELEY, 1999; JOYSTON-BEECHAL; EMSLIE, 1987); eritromicina (JOYSTON-BEECHAL; EMSLIE, 1987); tetraciclina (tetraciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, doxiciclina, limeciclina e oxitetraciclina), metronidazol, penicilinas (fenoximetilpenicilina), macrolídeos (eritromicina e espiramicina) (AKALIN et al., 2004; JOYSTON-BEECHAL; EMSLIE, 1987; SEYMOUR; HEASMAN, 1992); licomicina, clindamicina (SEYMOUR; HEASMAN, 1992); extratos vegetais de sanguinária (ELEY, 1999; TURNBULL, 1989), de *Arnica Montana* (KOO et al., 2000), de *Centella asiática* e *Punica granatum* (SASTRAVAHA et al., 2003); catequina de chá verde (HIRASAWA et al., 2002) e extrato de própolis (BAAKILINI et al., 1996; GEBARA, 1999; MANARA et al., 1999; MURRAY et al., 1997; PARK et al., 1998b; SANTOS et al., 1999).

2.2 PRÓPOLIS

O termo própolis é derivado do grego, significando em defesa (*pro*) da cidade (*polis*) (GHISALBERTI, 1979). Trata-se de um forte adesivo, substância resinosa coletada, transformada e usada pelas abelhas para selar frestas em suas colméias, paredes internas e

proteger a entrada contra intrusos. As abelhas (*Apis mellifera* L.) coletam a resina em frestas no tronco das árvores, em brotos e nos exsudatos das plantas. A essa “matéria-prima”, as abelhas misturam a cera e adicionam enzimas salivares, principalmente a enzima 13-glicosidase, formando a própolis (GREENAWAY et al., 1990; MOREIRA, 1986). Sua cor varia de amarelo-esverdeado a marrom escuro, dependendo da origem e idade, com odor característico e sabor picante (MARCUCCI, 1995).

A própolis é difícil de ser removida da pele humana, uma vez que ela interage fortemente com os óleos e proteínas da pele. É dura e quebradiça quando fria, mas macia e maleável quando aquecida (GHISALBERTI, 1979). É processada normalmente *in natura* e o extrato obtido é utilizado como forma farmacêutica final ou intermediária (CUNHA et al., 2004; DE VARGAS et al., 2004; FRANCO; BUENO, 1999; FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000; MARQUELE et al., 2005).

2.2.1 Histórico

A utilização de própolis já era descrita pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. Era conhecida e utilizada pelos sacerdotes do Egito (1700 A.C.) como auxiliar na mumificação de cadáveres (propriedades anti-putrefativas). Os gregos (responsáveis pelo seu nome) e os romanos, tais como Aristóteles, Dioscórides, Plínio e Galeno, reconheciam suas propriedades medicinais (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Hipócrates, a adotou como cicatrizante. Aristóteles a cita em *História dos Animais* como “remédio para os males da pele, chagas e supurações”. No século II, Galeno também cita a resina nos seus tratados (GHISALBERTI, 1979; PEREIRA et al., 2002).

A própolis foi também reconhecida e utilizada por outros povos não relacionados com a velha civilização mundial. Nas Américas, os Incas a utilizavam no tratamento de infecções febris. São encontrados a partir do século XII relatos de uso nos livros de medicina da Geórgia e as farmacopéias de Londres do século dezessete listavam-na como uma droga oficial (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Empregada como anti-séptico e cicatrizante no tratamento de feridas e como anti-séptico bucal, a própolis teve seus usos perpetuados na Idade Média e entre os médicos árabes (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Na idade moderna, o uso da própolis chegou a seu auge, como desinfetante e cicatrizante, na guerra dos Bôeres na África do Sul e também no começo do século XIX no tratamento da doença de Chagas na

França (CARMO, 1999; PAMPLONA, 1997). Entre os séculos XVII e XX a própolis tornou-se muito popular na Europa por conta de sua atividade antibacteriana (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Na União Soviética, a própolis recebia o crédito de ser empregada no tratamento de tuberculose (WOISKY; SALATINO, 1998).

Ao longo dos tempos observou-se a versatilidade de atividade biológica da própolis. Sua utilização continua até hoje em medicamentos, alimentos funcionais e cosméticos (BURDOCK, 1998).

2.2.2 Origem botânica

A própolis é coletada na colméia pelos apicultores, que raspam as paredes com uma ferramenta, normalmente um formão. Esta coleta é feita entre o outono e o inverno, depois que o mel é extraído (BRUSCHI, 2002).

Os constituintes da própolis refletem a sua origem botânica (Quadro 1). Com o advento de análises químicas mais sofisticadas, pôde-se identificar espécies de vegetais que podem ser utilizadas como fonte de material para a produção de própolis pelas abelhas (BURDOCK, 1998; CHRISTOV et al., 2005; MARCUCCI, 1995; TEIXEIRA et al., 2005). Assim, o melhor indicador da origem botânica da própolis é a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal. A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, aliada à fenologia da planta hospedeira, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (CHRISTOV et al., 2005; PARK et al., 2002, 2004, 2005).

Na Europa, América do Sul, América do Norte e oeste da Ásia, a principal fonte de própolis é o exsudato de brotos de choupo (*Populus sp.*). Menos comumente, em outras partes do mundo, outros gêneros, como *Bétula sp.*, *Pinus sp.* e *Acacia sp.* são utilizados como fonte para as abelhas produzirem própolis (CHRISTOV et al., 2005; KÖNIG, 1985). Na Nova Zelândia, a própolis origina-se também de espécies do gênero *Populus* (BANKOVA; CHRITOV; TEJERA, 1999).

Gênero e espécie	Localização geográfica	Referência
<i>Populus nigra</i> , <i>Populus italica</i>	Bulgária	BANKOVA et al., 1994; MARCUCCI, 1995
<i>Populus nigra</i>	Albânia	BANKOVA et al., 1994
<i>Populus tremula</i>	Bulgária	MARCUCCI, 1995
<i>Populus suaveolens</i>	Mongólia	BANKOVA et al., 1994; MARCUCCI, 1995
<i>Populus fremontii</i>	EUA	MARCUCCI, 1995
<i>Plumeria acuminata</i> , <i>Populus acutifolia</i>	EUA (ilhas havaianas)	MARCUCCI, 1995
<i>Populus curamericana</i>	Reino Unido	MARCUCCI, 1995
<i>Betula sp.</i> , <i>Populus sp.</i> , <i>Pinus sp.</i> , <i>Prunus sp.</i> e <i>Acacia sp.</i> , <i>Aesculus hypocastanum</i>	Hungria	MARCUCCI, 1995
<i>Populus aigeiros</i> , <i>Populus trichocarpa</i> , <i>Populus tremuloides</i>	Canadá	CHRISTOV et al., 2005
<i>Betula sp.</i> , <i>Alnus sp.</i>	Polônia	MARCUCCI, 1995
<i>Betula verrucosa</i>	Parte da Europa e Rússia	BANKOVA et al, 1992
<i>Betula verrucosa</i> , <i>Populus. nigra</i> , <i>Populus tremula</i>	Ucrânia	BANKOVA et al, 1992
<i>Delchampia sp.</i>	Regiões equatoriais	MARCUCCI, 1995
<i>Clusia sp.</i>	Regiões equatoriais	BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI, 1995
<i>Clusia minor</i>	Venezuela	MARCUCCI, 1995
<i>Xanthorrhoea sp.</i>	Austrália	GHISALBERTI, 1979

Quadro 1. Origem botânica da própolis.

Obviamente têm sido encontradas novas fontes vegetais para própolis e as de regiões tropicais demonstraram ser um pouco diferentes das de zonas temperadas (BANKOVA et al., 1998).

Na América do Sul a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para a retirada de resina, o que dificulta a correlação da própolis com a fonte produtora (GREENAWAY et al., 1990; KÖNIG, 1985). Particularmente no Brasil, existem diversas espécies de plantas visitadas pelas abelhas para a retirada de resina. Ainda não se conseguiram identificar todas elas, mas o alecrim do campo ou vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*), pinheiros (*Pinus* sp. e *Araucaria heterophylla*), aroeira (*Schinus terebenthifolius*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) são alguns exemplos (ABELHAS, 2002; BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; MIDORIKAWA et al., 2001; PAMPLONA, 1997; TEIXEIRA et al., 2005). A região Sul do Brasil apresenta uma grande diversidade vegetal, para a retirada de resinas pelas abelhas, possibilitando a ocorrência de cinco grupos distintos de própolis de grande frequência. Dentre estes grupos foi possível identificar a origem vegetal do grupo 3, ficando comprovada que a origem botânica da própolis deste grupo, da Argentina e do Uruguai, é a espécie vegetal *P. alba*, segundo os perfis fitoquímicos comparativos (ISLA et al., 2005; PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000). Na região sudeste do Brasil foi reportado um grupo de própolis (grupo 12), a própolis verde, cuja principal origem botânica é a *Baccharis dracunculifolia* (PARK et al., 2004; SALATINO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005).

2.2.3 Composição química

A composição química da própolis é muito complexa e está diretamente relacionada com a flora do local onde é coletada, a qual pode variar de região para região em um mesmo território (MARCUCCI, 1995), assim como a época do ano em que a própolis de um determinado local é coletada (BANKOVA et al., 1998; FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000).

Mais de 300 constituintes já foram identificados na própolis (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; MARCUCCI, 1995). Os primeiros estudos sobre a sua composição química foram realizados no início do século passado por Hiitcheck e Borish em 1907. Eles verificaram que este material era constituído por resina (46%), cera de abelha (27%), princípios voláteis (7%) e impurezas (13%). Verificaram ainda que a própolis era solúvel no álcool e que se fundia a 64°C (MOREIRA, 1986). Além disso, Ghisalberti (1979) constatou na própolis a presença de uma fração insolúvel em água e em solventes orgânicos, provavelmente formada por material polimérico.

Os compostos fenólicos constituem mais de 50% do total de seu peso e estão relacionados com sua atividade biológica. A composição fenólica da maioria das amostras de própolis investigadas parece ser similar e isso pode ser explicado pela origem mais ou menos comum dos vegetais onde as abelhas coletam os exsudatos (BANKOVA et al., 1994). Por essa razão, a maioria das investigações sobre a composição química da própolis está relacionada com estes compostos (BANKOVA et al., 1992; 1994; MACIEJEWICZ et al., 2001; SALATINO et al., 2005).

Os constituintes fenólicos presentes na própolis podem ser distribuídos nas seguintes classes de compostos: chalconas e di-hidrochalconas, flavanonas, flavonas e flavonóis, di-hidroflavonóis e isoflavonas (MARCUCCI et al., 1994; PICCINELLI et al., 2005).

Markham et al. (1996) quantificaram os flavonóides de própolis de várias regiões do mundo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As principais flavonas e flavonóis encontrados nas própolis analisadas estão descritos no Quadro 2.

Na amostra de própolis brasileira observaram que os di-hidroflavonóides constituíam em torno de 50% do total de flavonóides. Os principais representantes desta classe são as flavanonas (Quadro 3), que são intermediários biossintéticos da maioria das classes de flavonóides (ZUANAZZI, 2000).

Astudillo et al. (2000) analisaram uma amostra de própolis chilena, da qual seis flavonóides foram isolados como os principais constituintes ativos: 5,7-dihidroxi flavanona (pinocembrina); 5-hidroxi-7-metoxi flavanona (pinostrobin); 5,7-dihidroxi flavonol (galangina); 5,7-dihidroxi flavona (crisina); 5-hidroxi-7-metoxi flavona (tectocrisina) e 3,5,7-trihidroxi flavona (galangina).

Aga et al. (1994) isolaram três diferentes compostos em uma amostra de própolis brasileira, coletada no Estado de São Paulo. Os compostos foram identificados como ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), ácido 3-prenil-4-dihidroxi-cinamoloxicinâmico e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano. O Artepillin C possui propriedades antioxidantes (NAKANISHI et al., 2003; SHIMIZU et al., 2004), sendo reportado como o composto mais abundante isolado na própolis brasileira (HAYASHI et al., 1999; PARK et al., 2004; SALATINO et al., 2005).

R = H Flavonas		R = OH Flavonóis	
Apigenina (5,7,4'-OH) Crisina (5,7-OH) Tectocrisina (5-OH, 7-OCH ₃) Apigenina 7,4'-dimetil éter Acacetina (7-OH, 4'-OCH ₃)	(GREENAWAY et al., 1990)	Canferol-3-metil éter Canferol-7-metil éter Canferol-7,4'-dimetil éter Galangina-3-metil éter Fisetina (7,3',4'-OH)	(GREENAWAY et al., 1990)
Pectolinarigenina (5,7-di-OH, 6,4'-di-OCH ₃)	(VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRÉ, 1979)	Betuletol (5,7-OH, 6,4'-OCH ₃) Quercetina (5, 7,3', 4'-OH) Quercetina-3,7-dimetil éter Ramnazina (5,4'-OH, 7,3'-OCH ₃)	(VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRÉ, 1979)
Pilloyina (5,3'-di-OH, 7,4'-di-OCH ₃)	(MACIEJEWICZ et al., 2001)	Isoramnetina (5,7,4'-OH, 3'-OCH ₃) Ermanina (5,7-OH, 4'-OCH ₃) Raminocitrina (5,4'-OH, 7-OCH ₃) Izalpinina (5-OH, 7-OCH ₃) Galangina (5,7-OH) Canferol (5,7,4'-OH) Canferida (5,7-OH, 4'-OCH ₃)	
		5-metoxi-3,7-hidroxi-flavona	
			(PAPAY et al., 1985)

Quadro 2. Principais flavonas e flavonóis presentes na própolis.

Nome	Substituintes				Fonte
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
Pinocembrina	OH	OH	H	H	VANHAELLEN; VANHAELLEN-FASTRÉ, 1979
Pinostrobrina	OH	OCH ₃	H	H	VANHAELLEN; VANHAELLEN-FASTRÉ, 1979
Sakuranetina	OH	OCH ₃	OH	H	VANHAELLEN; VANHAELLEN-FASTRÉ, 1979
Pinobanquisina	OH	OCH ₃	H	OH	PAPAY et al., 1985
Acetato de 3-Pinobanquisina	OH	OAc	OH	H	PAPAY et al., 1985
Butirato 3-Pinobanquisina	OH	OBu	OH	H	PAPAY et al., 1985
Hexanoato 3-Pinobanquisina	OH	OH ₆	OH	H	PAPAY et al., 1985
Pinobanksina 7-metil éter	OH	O-Me	OH	H	PAPAY et al., 1985
Pinobanksina 5-metil éter	O-Me	OH	O	OH	BANKOVA et al., 1992
Pentanoato de 3-Pinobanksina	OH	O- pentano	OH	H	PAPAY et al., 1985
Propanoato de 3-Pinobanquisina	OH	O- propano	OH	H	PAPAY et al., 1985
5-metoxi, 3,7-di-hidroxi-flavanona	OH	OCH ₃	H	OH	PAPAY et al., 1985
Naringenina	OH	OH	H	H	GREENAWAY et al., 1990
3,7-di-hidroxi, 5-metoxi-flavanona	OH	OCH ₃	H	OH	BANKOVA et al., 1992
2,5-di-hidroxi, 7-metoxi-flavanona (com uma OH em 3')	OH	OCH ₃	H	OH	BANKOVA et al., 1992

Quadro 3. Flavanonas isoladas e identificadas na própolis.

Alguns ácidos aromáticos e alifáticos (Quadros 4 e 5) foram encontrados em extratos etanólicos de própolis. As suas presenças podem ser atribuídas provavelmente à progressiva reação de outros ácidos presentes na própolis com o etanol durante o tempo de armazenamento dos extratos. É notável a tendência de formação de etil éster, principalmente a partir de ácidos graxos, como foi o caso na formação de ácidos aromáticos e flavonóides (MARKHAM et al., 1996).

Nome	R ₁	R ₂	R ₃
Ácido cinâmico	H	H	COOH
Ácido p-cumárico (também sob a forma de cumarato de benzila)	H	OH	COOH
Ácido caféico	OH	OH	COOH
Ácido ferúlico	OCH ₃	OH	COOH
Ácido isoferúlico	OH	OCH ₃	COOH
Álcool cinâmico	H	H	CH ₂ OH
Ácido 3,4-dimetoxicinâmico	OCH ₃	OCH ₃	COOH

Quadro 4. Derivados do álcool e do ácido cinâmico observados na própolis (BANKOVA et al., 1995; PAPAY et al., 1985; SAHINLER; KAFTANOGLU, 2005; VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRÉ, 1979).

Bankova et al. (1995) conseguiram isolar e identificar na própolis alguns ésteres (di-hidrocinamato de metila, di-hidrocinamato de etila, fenilacetato de etila), ácido hidroxicinâmico, ácido m-cumárico, ácido p-cumárico, hidroquinona e ácido metoxicinâmico. Segundo Tazawa et al. (1996), outras substâncias encontradas na própolis brasileira são os derivados dos ácidos cinâmico e p-cumárico, do canferol e dos flavonóides prenilados. Mishima et al. (2005a) isolaram e identificaram três derivados do ácido cafeoilquínico (ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico; ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico e ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico) e Matsui et al. (2004) isolaram e identificaram o ácido 3,4,5-tri-O-cafeoilquínico, todos presentes em extrato aquoso de própolis brasileira. Além disso, estudando amostras de própolis brasileira com origem botânica na *Citrus* sp., dos Santos Pereira et al. (2003) sugeriram que própolis com essa origem possuem uma maior concentração de derivados do ácido quínico, sendo que o ácido 4-ferruol quínico e o 5-ferruol quínico foram encontrados pela primeira vez em amostras de própolis.

Nome	R ₁	R ₂	R ₃
Ácido benzóico	H	H	H
Ácido 4-hidroxibenzóico	H	OH	H
Ácido 4-metoxibenzóico	H	OCH ₃	H
Ácido protocatéquico	OH	OH	H
Ácido gálico	OH	OH	OH

Quadro 5. Derivados do ácido benzóico encontrados na própolis (VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRÉ, 1979).

Novos compostos têm sido isolados em amostras de própolis brasileira (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) e chinesa (octacosanol) (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Além disso, na propolis venezuelana foram isoladas duas novas benzofenonas poli-isopreniladas (18-etiloxi-17-hidroxi-17,18-diidroscrobiculatona A e 18-etiloxi-17-hidroxi-17,18-diidroscrobiculatona B) (TRUSHEVA et al., 2004). Na própolis cubana foram isoladas novos derivados de benzofenona poli-prenilada (propolonas B-D, garcinielectona I e hyperibona B) (HERNÁNDEZ et al., 2005).

Encontrou-se também na própolis alguns derivados do benzaldeído, como a vanilina e a isovanilina (VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRÉ, 1979).

Bankova et al. (1994) observaram substanciais diferenças na composição de voláteis em própolis de diferentes locais, indicando que a composição destes na própolis varia de acordo com a origem dos exsudatos dos brotos de diferentes árvores. A composição química dos voláteis da própolis foi descrita em poucas publicações. Mais de 30 constituintes desses foram identificados, mas uma parte substancial permanece sem identificação. Estes consistem principalmente de terpenóides, predominando os álcoois sesquiterpenóides e hidrocarbonetos sesquiterpenóides, acompanhados por alguns monoterpenos, principalmente álcoois. Uma outra parte dos voláteis é composta por álcoois, principalmente aromáticos, fenóis, aldeídos, cetonas, ácidos (do ácido acético ao ácido esteárico) e ésteres que compõem o maior grupo junto com os terpenóides. Uma série de alcanos foi também encontrada, acompanhada por

benzenos alquilados e por naftaleno. Dois ésteres vinílicos também foram encontrados (BANKOVA et al., 1994).

A presença dos terpenos β -bisabolol e α -acetoxibetulenol foi observada (FRANCO, 2001). Bankova et al. (1995) relataram a presença dos terpenóides α -terpineol, farnesol, β -cariofileno e δ -candineno. Uma investigação sobre a composição química de própolis da Lituânia também demonstrou a presença de terpenóides, principalmente mono- e sesquiterpenos, tais como o azuleno, α -bisabolol, citral e valerenol (MAJIENÉ et al., 2004).

Maciejewics et al. (1982) encontraram na própolis alguns fitosteróis: calinasterol, fucosterol, β -dihidrofucosterol e acetato de estigmasterol. Foi constatada ainda a presença de vitaminas, elementos minerais (cálcio, magnésio, potássio, sódio, ferro e zinco), aminoácidos e polissacarídeos (KULEVANOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1994).

As Ilhas Canárias possuem diferenças climáticas com a Europa e com a América do Sul tropical e não possuem espécies do gênero *Populus*, o que implica composição química diferente para a própolis. Apesar disso, Bankova et al. (1999) observaram uma significativa similaridade em suas composições, existindo apenas diferenças quantitativas. Observaram que as amostras investigadas continham carboidratos e compostos fenólicos. Dentre os carboidratos encontrados destacaram-se as pentoses, hexoses e dissacarídeos, sendo a manose o principal composto identificado. Glicose, frutose e sacarose foram também encontradas em quantidades significativas. Alguns poliálcoois, como o xilitol e o mio-inositol, também foram identificados. Os compostos fenólicos apareceram em concentração muito maior em todas as amostras investigadas. Diferentemente das regiões temperadas, os compostos fenólicos comuns na própolis estavam ausentes. Por outro lado, dois compostos foram identificados como episesamin e metil xantoxilol, que são lignanas do tipo furofurano (2,6-diaril, 3,7-dioxabicyclo[3,3,0]octanos).

As abelhas podem incorporar mais cera à própolis durante períodos em que as resinas são escassas ou de difícil coleta (BURDOCK, 1998). Negri et al. (2000) analisaram amostras de ceras do ninho e da própolis de *Apis mellifera*, observando-se a predominância de ésteres, seguidos de hidrocarbonetos. Não foram observadas diferenças que permitam distinção, o que sugere uma origem comum para ambas as fontes de cera. Por outro lado, Moreira (1986) analisou quatro amostras de própolis brasileira da região de Minas Gerais e observou que, embora o teor protéico das amostras de própolis sofra variações, a concentração relativa dos diversos aminoácidos se mantém aproximadamente constante. Além disso, benzofuranos

também foram isolados a partir de amostra de própolis brasileira (BANSKOTA; TEZUKA; ADNYANA, 2001).

2.2.4 Atividade biológica

Extratos de própolis têm sido utilizados no tratamento de infecções, em problemas de pele, como antivirais e antiúlceras, como fortalecedores do sistema imunológico, como cicatrizantes em escaras de decúbito, como antimicrobianos, adstringentes e antiinflamatórios (AZEVEDO et al., 1986; BANKOVA et al., 1999; BURDOCK, 1998; HU et al., 2005; KOSONOCKA, 1991; MOREIRA, 1986; PARK et al., 2004; SFORCIN et al., 2000).

As atividades biológicas da própolis têm sido estudadas extensivamente na Europa (principalmente nos países do leste)(BURDOCK, 1998; KOC et al., 2005; NOSTRO et al., 2005), no Brasil (INOKUCHI et al., 2006; MISHIMA et al., 2005b,c; PARK et al., 2005), Argentina (MORENO et al., 2000) e no Japão (MATSUI et al., 2004; YOSHIZUMI; NISHIOKA; TSUJI, 2005).

Existe um grande número de constituintes na própolis e em seus extratos que são comuns em vegetais, alguns dos quais são bem conhecidos pelas suas atividades biológicas. Destas substâncias, nenhuma contribui mais para os efeitos observados que os flavonóides e seus derivados. Eles ocorrem naturalmente nas plantas e possuem uma grande variedade de efeitos bioquímicos, como atividade antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, capacidade de inibir enzimas dentre outras atividades biológicas benéficas para a saúde humana (AHN et al., 2004; ASO, et al., 2004; AZAD, 2005; BARANOWSKA; RARÓG, 2001; BEYER; MELZIG, 2005; BLONSKA et al., 2004; BURDOCK, 1998; CHEN et al., 2004; DURAN et al., 2006; FUALIANG et al., 2005; HARBONE; WILLIAMS, 2000; KARAKAYA; EL, 1999; KATALINIC et al., 2004; LIU et al., 2005; MANI et al., 2005; MARQUELE et al. 2005; MISHIMA et al., 2005b,c; OKSUZ et al., 2005; ORSOLIC; BASIC, 2005a,b; ORSOLIC et al., 2003, 2004, 2005a,b; ORSOLIC; KOSALEC; BASIC, 2005; OZKUL; SILICI; EROGLU, 2005; RUSSO et al., 2004; SFORCIN et al., 2005; SIMÕES et al., 2004; TAKAGI et al., 2005; TAN-NO et al., 2006; USIA et al., 2002).

O progresso das pesquisas farmacológicas com própolis tem comprovado cientificamente os seus efeitos hepatoprotetor, neuroprotetor e antiinflamatório, assim como as suas atividades analgésica, antitumoral, antioxidante, antihipertensiva, antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antiviral (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001;

BURDOCK, 1998; FERNANDES; FERNANDES JR.; NOVELLI, 2004; IMHOF et al., 2005; KUBOTA et al., 2004; ORSOLIC; SARANOVIC; BASIC, 2006; ORSOLIC et al., 2005b; PAULINO et al., 2003; SCIFO et al., 2006; SHIMAZAWA et al., 2005; SHUKLA; BHADARIA; JADON, 2004).

2.2.5 Toxicidade e efeitos alergênicos

A administração de uma substância farmacologicamente ativa pode desencadear a manifestação de efeitos adversos prejudiciais ao organismo (efeitos colaterais). Dependendo da substância e da sensibilidade individual de cada organismo que a recebe, o efeito colateral pode ser em maior ou menor grau de toxicidade (FRANCO, 2001).

Em investigações realizadas por Jenko (1952) e por Todorov et al. (1968), observou-se que extratos aquosos e alcoólicos de própolis não induziam irritação tecidual e não desenvolviam efeitos tóxicos (BURDOCK, 1998). De Castro e Higashi (1995) estudaram os efeitos antitripanossômicos da própolis em ratos utilizando uma dose oral de 200 a 1220 mg/kg de própolis. Não houve nenhuma diferença na mortalidade de ratos tratados com própolis comparados com os controles normais. Semelhantemente, Sforcin et al. (2002) analisaram o perfil bioquímico de ratos tratados com própolis para verificar se a própolis pode levar a efeitos colaterais. Foram avaliadas as concentrações de proteína total, glicose, uréia, creatinina, triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL, aminotransferases (AST e ALT) e desidrogenase láctica (LDH) em soro de ratos tratados com própolis. O efeito sazonal da atividade da própolis também foi analisado, levando em consideração as variáveis bioquímicas avaliadas. Não houve modificações importantes nas variáveis bioquímicas séricas e também não foi observada variação sazonal nas determinações, provavelmente devida a falta de efeitos colaterais biológicos. Mesmo assim, em contraste com os efeitos benéficos, a própolis também apresenta efeitos tóxicos e alergênicos significantes (BURDOCK, 1998; CALLEJO et al., 2001; GIUSTI et al., 2004; GULBAHAR et al., 2005; HASHIMOTO et al., 1988; HAUSEN, 2005; LI et al., 2005; MARCUCCI, 1995; NIEVA MORENO et al., 2005; SEIDENARI et al., 2005; TING; SILVER, 2004; WALGRAVE et al., 2005).

2.2.5.1 Efeitos alergênicos

No estudo de drogas com composição química complexa como a própolis, a determinação dos efeitos colaterais, no que se refere à identificação das substâncias responsáveis por estes efeitos, é uma investigação complexa (BURDOCK, 1998). Mais de 250 casos de dermatite alérgica de contato devido a própolis têm sido descritos, sendo que pouco ocorridos em apicultores (GULBAHAR et al., 2005). Em 1968 foi relatada a importância da própolis como causa de dermatite ocupacional em apicultores na Inglaterra, onde cerca de 0,05% dos apicultores eram afetados. A fração volátil da própolis e certos derivados do ácido cinâmico seriam provavelmente os alérgenos (BURDOCK, 1998).

Estudos realizados com 605 pacientes demonstraram reação alérgica em 25 casos (4,2%), sendo que destes, 13 pacientes também reagiram ao bálsamo do Peru. Apesar de todos os cuidados, apenas 16 contatos com própolis documentados puderam ser confirmados entre os 25 pacientes (BURDOCK, 1988).

Hausen et al. (1987) observaram reações de dermatite de contato causada pela utilização de produtos à base de própolis e resina do choupó. Os autores descreveram aproximadamente 200 casos de dermatite alérgica de contato à própolis, sendo o ácido 1,1-dimetilalil caféico identificado como o principal responsável pela alergia. Essa substância existente em diversas amostras de própolis provocou sensibilização em porcos, ficando relatado que este composto é o primeiro sensibilizador da própolis. Posteriormente, Hashimoto et al. (1988) detectaram que a ação sensibilizante da própolis é causada pelo éster fenílico do ácido caféico e pelo cafeato de prenila. Essa capacidade de algumas própolis em produzirem dermatite de contato, sendo esse efeito atribuído à presença de ácido cinâmico e de ésteres do ácido caféico, foi confirmada (HAUSEN, 2005; MORENO et al., 2000; WALGRAVE et al., 2005).

Mais de 500 compostos foram identificados na própolis européia e suas propriedades alergênicas também foram atribuídas ao conteúdo de ésteres do ácido caféico e de agliconas flavonoídicas (HAUSEN; WOLLENWEBER, 1988). Como um grande número de atividades biológicas da própolis é devido aos ésteres do ácido caféico e cinâmico presentes na mesma, o efeito mutagênico desses ésteres foi investigado por Rao et al. (1992) citado por Burdock (1998). Nenhum dos compostos investigados apresentou mutagenicidade. Nieva Moreno et al. (2005) estudaram amostras de própolis da Argentina e verificaram que nenhuma das mesmas apresentou mutagenicidade. Posteriormente, Ledón et al. (2002) estudaram as

propriedades sensibilizantes de um extrato de própolis vermelha, observando que o eugenol, anetol, metil-isoeugenol e elemicina eram os responsáveis pelos efeitos alérgicos.

Dessa forma, como resultado da utilização da própolis, reações alérgicas podem ocorrer em várias partes do corpo (mãos, braços, face, pescoço, região perioral, pés, região dos olhos, orelhas, vulva e pênis) e em pessoas de várias ocupações (apicultores, artistas, donas de casa, médicos, engenheiros, farmacêuticos, entre outras). Os casos clínicos mais comuns de alergia à própolis são a dermatite, a estomatite e a desidrose palmo-plantar (BURDOCK, 1998).

Callejo et al. (2001) descreveram um caso de hipersensibilidade imediata à própolis. Wohrl et al. (2003) realizaram um teste alérgico em 2776 pacientes com uma série de 34 alérgenos de contato, inclusive a própolis. Verificou-se que a mesma produziu reações alérgicas em 1,3% dos testados (36), sendo que a taxa de sensibilização foi maior em crianças menores de dez anos (62%), diminuindo regularmente com o aumento da idade, sendo de 34,9% nos pacientes testados com idade superior a 70 anos.

Nem sempre é possível estabelecer a relação entre a alergia e a real causa de sua manifestação clínica. Assim, mais estudos com relação às reais causas de alergia à própolis são necessários, já que ainda não se conhecem todos os seus componentes, conseqüentemente suas áreas de ação também são desconhecidas (MANARA et al., 1999). O que se sabe é que pessoas alérgicas a outras substâncias e/ou drogas estão mais propensas a ter alergia à própolis, devendo se ter cuidado na utilização de própolis em pacientes asmáticos e em pacientes com eczema e *rash* cutâneo (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Além disso, o resultado de um estudo realizado em 1255 crianças sugeriu que a própolis não deve ser utilizada em produtos tópicos infantis devida a sua alta taxa de sensibilização na idade pediátrica (GIUSTI et al., 2004).

2.2.5.2 Efeitos tóxicos

O aparecimento de efeitos colaterais atribuídos ao uso de medicamentos à base de própolis passou a ser observado a partir do momento que seu consumo apresentou considerável aumento (BURDOCK, 1998). A própolis consiste principalmente de exsudatos de diferentes plantas, mas ocasionalmente as abelhas podem coletar substâncias perigosas como, por exemplo, asfalto, ferro, zinco, cobre, magnésio e chumbo (MATSUNO, 1994; DÍAZ et al., 1997). Assim, o ambiente circunvizinho é o principal fator que determina a

presença destes materiais. Foi observado que modificações nas propriedades farmacológicas da própolis podem ocorrer durante a extração e manipulação pelos apicultores e, ainda, pelo processo final de manufatura utilizado na indústria (MENEZES et al., 1997). Aliado a isso, os solventes utilizados na preparação dos extratos podem influenciar na toxicidade. O etanol produz um efeito irritante no tecido da mucosa oral (CESCHEL et al., 2002).

Burdock (1998) relata não ter encontrado estudos de toxicidade em função da falta de padronização da própolis, mas descreve os trabalhos de Arvouet-Grand et al. (1993) e Hrytsenko et al. (1977), onde se estabelece que a dose oral DL_{50} do extrato é de 7340 mg/kg e de 2050 mg/kg, respectivamente. Esta disparidade é mais caracterizada pela DL_{100} de 2750 mg/kg, estabelecida pelo último trabalho. A própolis é considerada uma droga segura em baixas doses, mas efeitos adversos são comuns nas doses maiores de 15 g/dia (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Ghisalberti (1979) relata que na própolis da Rússia os extratos etéreos não apresentaram toxicidade aguda em camundongos na dose de 350 mg/kg e que a dose DL_{50} só ocorre após 19 horas para ambos os extratos alcoólico e etéreo, na dose de 700 mg/kg. Relata, ainda, que a dose subcutânea tolerada em gatos foi de 100 mg/kg do extrato etéreo. Resultados semelhantes são observados por Dobrowolski et al. (1991), que administraram 700 mg/kg de extrato alcoólico de própolis em camundongos machos e fêmeas. O extrato foi bem tolerado pelos animais por mais de 48 horas. Park et al. (1996) encontraram resultados semelhantes com administração oral de 2000 mg/kg de um extrato etanólico de própolis coreana em camundongos. Burdock (1998) avalia que extratos e drogas chegam à dose de 40.000 mg/kg (em caso de ratos) para extratos de drogas contendo flavonóides, que são as substâncias majoritárias da própolis, o que seria previsível já que estas são substâncias que apresentam baixa toxicidade. Cita o exemplo da pinocembrina um dos marcadores da maioria das própolis estudadas, que apresenta dose tóxica na ordem de 1000 mg/kg.

Foram preparadas suspensões a partir dos extratos etanólicos de própolis brasileira e chinesa. Estas foram testadas e após duas semanas da administração de dose de 2230 a 4000 mg/mL em camundongo não foram detectadas mortes, aumento de peso anormal e não foram encontradas anormalidades na necropsia (BURDOCK, 1998).

Além disso, foram executados uma série de experimentos usando um extrato alcoólico de própolis administrado na água de beber em ratos e camundongos (BURDOCK, 1998). Animais controle receberam água e álcool. Nos dois primeiros experimentos, ratos Wistar receberam dose de 1875 mg/kg/dia durante 30 dias ou 2470 mg/kg/dia durante 60 dias. Em comparação com cada respectivo controle não ocorreram alterações exacerbadas na aparência

clínica, no comportamento, na urina, no peso corporal ou, ainda, na mortalidade. Não foram observadas alterações histológicas no estudo de 30 dias. Somente uma pequena necrose hepática em um animal no grupo controle do álcool foi observada no estudo de 60 dias. Não ocorreram relatos remanescentes no tratamento de 60 dias. No primeiro de três experimentos com camundongos, trataram os animais na água de beber com consumo previsto de 4600 mg/kg/dia durante 90 dias. Amostras de sangue foram coletadas dos animais para a avaliação da glicemia, uréia e colesterol. Como nos estudos dos ratos, não apareceram diferenças clínicas ou alterações na urina ou no peso corporal ou casos de mortalidade. Houve acréscimo na média dos valores obtidos para uréia para o grupo com extrato e controle do álcool, na faixa de 1,5 e 3,3 vezes com relação aos valores de controle (água). Dois outros experimentos foram conduzidos em camundongos administrando-se 6 mg/mL de própolis, com um consumo de água correspondente 1400 mg/kg/dia durante 14 e 90 dias, respectivamente. Em doses baixas não houve diferenças nos valores de uréia entre nenhum grupo. Não ocorreram modificações histomorfológicas. Os autores atribuem o aumento de uréia a altas doses do álcool e não à própolis. A dose de 1400 mg/kg/dia é considerada dose de nível não efetivo.

Segundo Burdock (1998), se a dose de nível não efetivo em ratos de 1400 mg/kg/dia for aplicada em seres humanos, um fator de segurança de 1000 deve ser empregado para compensar uma falta de estudos de toxicidade crônica. Dessa maneira, uma dose segura em humanos deve ser de 1,4 mg/kg/dia ou aproximadamente 70 mg/dia.

Ikeno et al. (1991) avaliaram os efeitos do extrato alcoólico de própolis sobre a carcinogênese em ratos, na dose de 1mg/mL na água de beber durante 63 dias. Nenhum animal morreu ou resultados de toxicidade de própolis foram relatados e os pesos foram comparados com dos animais controle, não apresentando diferenças entre os animais controles e os tratados com própolis com relação à glicose e à atividade da amilase no soro, pâncreas, glândula parótida ou fígado. Complementando, Reis et al. (2000) realizaram um estudo da toxicidade de um extrato etanólico de própolis em fase de tratamento subcrônico. Não houve diferença significativa nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos analisados entre o grupo tratado com o extrato e o grupo controle, sugerindo que na dose eficaz (650 mg/kg) não ocorre a presença de efeitos tóxicos que possam comprometer a utilização do extrato.

A opinião atual é a de que a utilização de preparações padronizadas de própolis é segura e menos tóxica que muitos medicamentos sintéticos (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

2.3 PRÓPOLIS E PERIODONTIA

Existem muitos estudos relacionando a utilização da própolis em várias áreas da Odontologia (Cariologia, Cirurgia Oral, Endodontia e Periodontia) (AL-SHAHER et al., 2004; LEITÃO et al., 2004; MANARA et al., 1999; MARTIN; PILEGGI, 2004; SABIR et al., 2005; SANTOS et al., 1999; SILVA; ALMEIDA; SOUSA, 2004). No entanto, progressos recentes têm sido obtidos principalmente no estudo e desenvolvimento de preparações para a prevenção e o tratamento de doenças periodontais e para a manutenção de um periodonto saudável. A capacidade de cura da própolis em periodontites, como também o impedimento da formação de biofilme e do desenvolvimento de gengivites, foi relatada (MARCUCCI, 1995; UZEL et al., 2005).

Extratos hidroalcoólicos de própolis de várias regiões do Brasil (MG, SP, MS, PR e RS) e compostos isolados apresentaram a capacidade de inibir a atividade da glicosiltransferase, do crescimento de *Streptococcus mutans* e da formação e aderência de biofilme (HAYACIBARA et al., 2005; KOO et al., 2000; 2002; PARK et al., 1998b). Além disso, Duarte et al. (2006) observaram que o extrato hidroalcoólico de uma amostra de própolis livre de flavonóides apresentou efeito biológico frente ao *Streptococcus mutans* e foi capaz de inibir a atividade da glicosiltransferase, sugerindo que as propriedades desse extrato estariam relacionadas ao seu alto conteúdo de ácidos graxos.

Dessa maneira, a utilização da própolis como adjuvante no tratamento periodontal foi sugerida por Gebara (1999). Estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados para avaliar a ação antimicrobiana da própolis sobre microorganismos periodontopatogênicos e organismos oportunistas. Os resultados do estudo *in vitro* demonstraram a ação da própolis sobre todos os organismos testados. Os estudos *in vivo*, revelaram que a própolis aplicada através de procedimentos de irrigação da bolsa periodontal, mostrou-se efetiva na diminuição do total de bactérias viáveis, dos níveis de *Porphyromonas gingivalis* e dos sítios positivos para leveduras, não levando à seleção de organismos oportunistas. Ocorreu também uma diminuição da profundidade clínica de sondagem após seis meses dos procedimentos de irrigação.

Na sequência, foi investigada a ação de um extrato etanólico de própolis como adjuvante no tratamento periodontal em vinte pacientes adultos com periodontite. Estes receberam instruções de higiene oral, sendo escolhidos em cada um três dentes não adjacente com profundidade de bolsa de cinco milímetros. Um dos dentes foi irrigado com uma solução

aquosa de extrato de própolis, um outro dente recebeu irrigação com um placebo (etanol) e o terceiro dente não recebeu nenhum tratamento adicional. Foram coletados dados microbiológicos e clínicos no início e depois de 4, 6 e 24 semanas de tratamento. A utilização de própolis diminuiu o teor total de bactérias viáveis e a proporção de sítios com *P. gingivalis*, em quatro semanas e se manteve pelas 24 semanas. A proporção de sítios com presença detectável de fungos diminuiu com o tratamento com extrato de própolis na quarta e sexta semana. O uso de própolis não selecionou organismos oportunistas tais como *Estafilococos* coagulase positiva e *Pseudomonas* sp. Concluiu-se que o extrato de própolis foi efetivo, *in vivo*, no tratamento periodontal (GEBARA, 2001; 2003).

Os efeitos antimicrobianos de diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis frente a *Actinomicetans actinomycetecomitans*, *Fusobacterium* sp. e ao grupo *Bacterioides fragilis* foram avaliados por SANTOS et al. (1999). Os resultados demonstraram que os extratos possuíam propriedades inibitórias *in vitro* frente aos microorganismos testados.

O valor clínico da própolis no tratamento de doenças periodontais também foi demonstrado por SANTOS et al. (2002a). Eles estudaram o perfil de susceptibilidade de 17 cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens*, isoladas de pacientes com periodontites, e de três cepas de referência frente a seis antimicrobianos, prescritos na odontologia no Brasil e a própolis. Os agentes antimicrobianos testados foram tetraciclina, penicilina, clindamicina, eritromicina, metronidazol, meropenem e seis extratos hidroalcoólicos de própolis brasileira. As cepas de referência *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram utilizadas na determinação da concentração bactericida mínima e para o ensaio de tempo de morte para os extratos de própolis. Todas as cepas foram susceptíveis à penicilina, eritromicina, meropenem, metronidazol e 95% delas foram susceptíveis à tetraciclina. Trinta e seis por cento das cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens* testadas foram resistentes à clindamicina. Para a própolis, todas as cepas foram susceptíveis e os valores de concentração inibitória mínima foram de 64 a 256 µg/mL. Para as cepas de referência, a concentração bactericida mínima foi de 256 µg/mL e a morte foi observada dentro de 3 horas de incubação para *P. gingivalis* e dentro de 6 horas para *P. intermedia*. Também foi avaliada a atividade do extrato etanólico e de frações da própolis frente a outras bactérias causadoras de doenças periodontais (*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Eubacterium lentum* e *Peptostreptococcus anaerobius*) (SANTOS et al., 2002b). Verificou-se que todas as bactérias ensaiadas foram susceptíveis ao extrato de própolis e às frações. Contudo, nenhuma das frações foi mais ativa que o extrato, sugerindo que a atividade antibacteriana é devida principalmente ao efeito sinérgico de vários compostos presentes no

mesmo. Também foi observado por Ferreira (1999) que o extrato etanólico de própolis 10% possui atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas de *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Clostridium perfringens* e *Actinomyces israelii*.

Outros estudos investigaram a atividade da própolis frente a patógenos orais. Koo et al. (2000) estudaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *C. albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *Prevotella denticola*. Observaram que o extrato de própolis inibiu todos os microorganismos testados, demonstrando uma zona inibitória maior para *Actinomyces* sp. e, ainda, inibiu a aderência celular e a formação de glucano insolúvel em água.

A investigação de extratos de própolis de diferentes origens demonstrou atividade antimicrobiana frente a várias espécies de *Cândida*. AZEVEDO et al. (1999) determinaram a diluição máxima inibitória (DMI) do extrato etanólico de própolis 10% e do digluconato de clorexidina 0,12% frente a cepas de *Candida* sp isoladas da cavidade oral de seres humanos com e sem lesões. A maioria das cepas foi sensível aos dois anti-sépticos, sendo o DMI para o extrato de própolis 1:20 e de 1:160 para a clorexidina. Kujumgiev et al. (1999), trabalhando com amostras de própolis de diferentes regiões do mundo, avaliou a atividade de extratos alcoólicos 10% (p/V) frente à *C. albicans*. Todos os extratos exibiram atividade frente ao microorganismo. Trabalhando com extratos etanólicos de própolis brasileira. Sforcin et al. (2001) também observaram que *C. albicans* e *C. tropicalis* foram sensíveis a baixas concentrações dos mesmos, sendo que a primeira espécie apresentou uma sensibilidade maior. Ota et al. (2001), estudaram a atividade de extratos etanólicos de própolis brasileira frente a 75 cepas de *Candida*, sendo vinte cepas de *C. albicans*, vinte de *C. tropicalis*, vinte de *C. krusei* e quinze de *C. guilliermondii*. Os fungos demonstraram sensibilidade aos extratos testados com a seguinte ordem de sensibilidade: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*. As atividades antimicrobianas frente à *C. albicans* de extratos etanólicos de própolis brasileira e da Turquia também foram confirmadas por Sawaya et al. (2002) e Kartal et al. (2003), respectivamente. Também foi demonstrada a atividade de extratos etanólicos e glicólicos de própolis da Turquia e Sigma[®] frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* em baixas concentrações, as quais não foram citotóxicas a fibroblastos gengivais. Resultados semelhantes também foram obtidos com estes extratos para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Campylobacter rectus* e *F. nucleatum* (SONMEZ et al., 2005).

Outras investigações demonstraram a atividade antimicrobiana da própolis frente a várias espécies de bactérias, normalmente na forma de extrato etanólico: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Arthroderma benhamiae*, *Enterococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, dentre outras (AGA et al., 1994; BOSIO et al., 2000; FERNANDES-JÚNIOR et al., 2001, 2006; KARTAL et al., 2003; KOSALEC et al., 2005; KROL et al., 1993; LU; CHEN; CHOU, 2005; MENEZES et al., 1997; MIORIN et al., 2003; MORENO et al., 2000; ORSI et al., 2005; TOSI et al., 1996).

2.3.1. Preparações farmacêuticas com própolis para periodontia

A frequência e a severidade da doença periodontal aumenta com a idade e com a higiene oral inadequada. Estudos clínicos mostraram que os microrganismos começam a colonizar rapidamente superfícies dentárias limpas, se a pessoa fizer abstenção da limpeza mecânica, ao final de poucos dias, os sinais microscópicos e clínicos de gengivite estarão assim, patentes. Essas alterações inflamatórias são solucionadas ou revertidas quando medidas apropriadas de limpeza dentária são retomadas. Além disso, a inflamação pode ser evitada pelo uso diário de agentes antimicrobianos que evitem colonização de bactérias na superfície dentária (FERREIRA, 1995). Nesse sentido, existem vários estudos de desenvolvimento e avaliação de produtos odontológicos com própolis para a utilização pelo próprio paciente na higiene bucal diária.

Baakilini et al. (1996) desenvolveram e avaliaram as propriedades e estabilidade de dentifrícios contendo própolis com diferentes níveis de abrasividade. Os resultados obtidos demonstraram um caminho promissor na produção de dentifrícios com própolis, levando em consideração a correta formulação do produto. Panzeri et al. (1999) desenvolveram um dentifrício na forma de gel com 3% de extrato de própolis e realizaram testes físico-químicos, clínicos (duplo cego) e microbiológicos. As avaliações físico-químicas revelaram condições ideais para o emprego do produto com própolis como agente terapêutico. Os testes microbiológicos demonstraram uma eficiente ação antibacteriana contra cocos gram-positivos, onde o *Enterococcus faecalis* e os bastonetes Gram-negativos foram mais resistentes que os outros microrganismos testados. Pelos testes clínicos observou-se que o dentifrício com própolis foi mais efetivo que o dentifrício sem o agente terapêutico no controle do índice gengival, sendo uma alternativa viável como agente preventivo ou

terapêutico da doença periodontal. Resultados similares foram obtidos em estudos com um creme dental com própolis cubana (ABREU et al., 1998, 2000). Além disso, um estudo foi realizado para avaliar clinicamente uma pasta dental de silicato contendo extrato de própolis da Bulgária (BOTUSHANOV; GRIGOROV; ALEKSANDROV, 2001). Os resultados demonstraram que a pasta dental com própolis foi eficiente na remoção e prevenção da formação do biofilme, com efeito antiinflamatório.

Uma das formas mais comuns de utilização da própolis para a higiene bucal é na forma de gargarejo e bochechos. Assim sendo, vários estudos têm sido realizados no sentido de se desenvolver e avaliar a ação de enxaguatórios bucais com própolis. Uma solução hidroalcoólica de própolis 0,84% foi testada *in vivo*, na forma de bochechos, três vezes ao dia após a higiene bucal, por vinte pacientes (DUARTE; KFOURI, 1999). Verificou-se que não houve alteração no índice de placa e de gengivite na concentração utilizada, após vinte dias. Os autores argumentaram a necessidade de se testar preparações mais concentradas de própolis. Por outro lado, Murray et al. (1997) e Koo et al. (2000) observaram que enxaguatórios bucais contendo própolis foram capazes de inibir a formação de biofilme dental, porém com uma intensidade menor que a clorexidina, e demonstrando também eficiência na redução na formação de biofilme subgengival, sob condições de alta cumulação de biofilme.

Pastilhas de própolis foram preparadas com extrato hidroalcoólico 35% e suas propriedades antimicrobianas avaliadas (WOISKY; GIESBRECHT; SALATINO, 1994). Observou-se a ação inibitória sobre bactérias Gram-positivas, enquanto as Gram-negativas demonstraram-se em geral resistentes.

Somados às pastilhas, os géis e os enxaguatórios bucais são as formas farmacêuticas convencionais para a liberação de própolis através da mucosa da cavidade oral. Além disso, utilização de técnicas como a microencapsulação pode transformar o extrato hidroalcoólico de própolis em uma forma farmacêutica sólida, eliminando solventes indesejáveis, promovendo o controle da liberação e permitindo a utilização do extrato de própolis em sistemas terapêuticos (BRUSCHI et al., 2003a) dentro da bolsa periodontal.

2.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO INTRABOLSA PERIODONTAL

Dentro da cavidade oral, a liberação de fármacos é classificada em três categorias: (i) liberação sublingual, que é a liberação sistêmica de fármacos através das membranas da

mucosa que recobre o assoalho da boca; (ii) liberação bucal, que é a administração através das membranas mucosas que recobrem as bochechas (mucosa bucal) e (iii) liberação local, que é a liberação de fármacos dentro da cavidade oral (SHOJAEI, 1998). Além disso, existe a liberação de fármaco intrabolsa periodontal, a qual é uma categoria especial de liberação local onde a liberação do fármaco acontece em um sítio específico, dentro da bolsa periodontal (MEDLICOTT et al., 1994), sendo geralmente utilizada no tratamento de doenças periodontais (JONES et al., 1996, 1997, 2000; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996).

A utilização sistêmica de antibióticos pode ser de grande valor para o tratamento de certos tipos de periodontite severa, periodontite refratária, infecções periodontais agudas com manifestações sistêmicas e para indicações médicas tais como profilaxia de endocardite (JORGENSEN; SLOTS, 2000). A administração sistêmica de antibióticos demonstrou ser útil no tratamento da doença periodontal, alcançando concentrações terapêuticas no sítio da infecção por curtos períodos de tempo após uma dose simples (MEDLICOTT et al., 1994). No entanto, ela não pode ser utilizada por um longo período de tempo. Muitos efeitos colaterais indesejáveis podem surgir, tais como náusea, vômito, diarreia, gastrite, úlceras, outros transtornos digestivos, alergias e desenvolvimento de resistência pelos microrganismos (ADDY, 1986; ADDY; LANGEROUDI, 1984; BROOK; VAN NOORT, 1984; FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; FRIEDMAN; STEINBERG, 1990; GREENSTEIN, 1995; JOYSTON-BECHAL; EMSLIE, 1987; TINOCO et al. 1998), diminuindo a razão risco/benefício para um ponto no qual este tipo de tratamento não pode ser aceitável (CIANCIO, 1996; JONES et al., 2000; STEINBERG; FRIEDMAN, 1988). Assim, a administração local de fármaco na doença periodontal é uma alternativa, minimizando a distribuição do fármaco e, por conseguinte, aumentando a concentração deste no local a ser tratado e diminuindo os efeitos adversos indesejáveis (PERIOLI et al., 2004; STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

Muitos agentes antibacterianos são aplicados diretamente na boca para o tratamento da doença periodontal. Enxaguatórios bucais são amplamente utilizados para essa finalidade (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988). Clorexidina 0,2%, na forma de enxaguatório, demonstrou ser muito efetiva no controle do biofilme supragengival e na gengivite (FLOTRA et al., 1972; STEINBERG; FRIEDMAN, 1988). Por outro lado, esses enxaguatórios apresentaram um efeito limitado em periodontites com formação de bolsa (FLOTRA et al., 1973).

Na tentativa de se obter uma penetração adequada do fármaco até o fundo das bolsas, utilizou-se a irrigação direta (WEINSTLING; TYNELIUS-BRATTHALL, 1984). Aplicou-se uma solução de clorexidina 0,2%, utilizando-se seringa, dentro das bolsas periodontais de

pacientes com doença severa. Um grupo recebeu irrigação por dois dias consecutivos, enquanto outro grupo recebeu irrigação com água. Observou-se uma diminuição no número de bactérias patogênicas no grupo irrigado com clorexidina. Entretanto, após cinco dias de administração, não houve diferenças significativas entre os dois grupos. Esses resultados demonstraram o efeito de curta duração da irrigação direta. Por outro lado, a irrigação contínua de clorexidina nas bolsas periodontais profundas mostrou-se ser mais efetiva que a aplicação de curta duração. As bolsas foram irrigadas com solução de clorexidina 0,2% por 28 dias, resultando em uma significativa redução na inflamação (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

Bochechos, irrigações e jatos pulsáteis não penetram além de 1 a 2 mm abaixo da margem gengival (BADERSTEN et al., 1981; FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; ITO et al., 1980; PITCHER; NEWMAN; STRAHAN, 1980; YEUNG; NEWMAN; ADDY, 1983). A duração da administração de soluções de agentes antibacterianos diretamente no interior da bolsa periodontal, utilizando dispositivos de irrigação adequados (GREENSTEIN, 1987), é geralmente curta quando os agentes são administrados em solução, e administrações freqüentes são requeridas para a manutenção das concentrações na bolsa periodontal (JONES et al., 2000; MEDLICOTT et al., 1994). Dessa maneira, a obediência ao tratamento por parte do paciente é um fator muito importante para assegurar a eficácia clínica do mesmo.

Devido todos esses problemas, atenção tem sido dada no desenvolvimento de verdadeiros sistemas de liberação de fármaco intrabolsa (SLIB) (FIORELLINI; PAQUETTE, 1992; JONES et al., 1996; KINANE, 2000; RANADIVE; BHAT, 1998). A bolsa periodontal é um reservatório natural que permite a inserção de um dispositivo de liberação, sendo que os benefícios que podem ser adquiridos baseiam-se na liberação do agente terapêutico no local a ser tratado e a manutenção dos níveis adequados de fármaco por um período estabelecido de tempo (JONES et al., 2000; MEDLICOTT et al., 1994; STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

Goodson et al. (1979) foram os primeiros a desenvolver um SLIB, sugerindo que a utilização de um supositório de liberação controlada de um fármaco colocado na bolsa poderia ser altamente efetiva para a administração de agentes antibacterianos na terapia periodontal. Desde então, um número crescente de sistemas biodegradáveis ou não têm sido desenvolvidos com o objetivo de alcançar uma concentração prolongada de agentes antimicrobianos no interior da bolsa periodontal.

2.4.1 Vantagens e desvantagens

Um dispositivo SLIB oferece muitas vantagens (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996; STEINBERG; FRIEDMAN, 1988):

- possibilita o controle e monitoramento dos níveis de fármaco desejados no sítio de aplicação;
- é um meio útil de liberar na cavidade oral um fármaco que não é absorvido no sistema gastrointestinal (por exemplo, clorexidina);
- possibilita a obtenção de altas concentrações de fármaco no local a ser tratado, quando comparadas com os níveis plasmáticos após a administração peroral;
- pode mascarar o sabor e odor desagradável de determinados fármacos e evitar o aparecimento de manchas nos dentes.

Por outro lado, deve ser considerada a dificuldade (impossibilidade) de interrupção rápida da ação farmacológica, em caso de irritação ou intolerância. Além disso, existem outras desvantagens (ANSEL et al., 2000; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996):

- a reprodutibilidade da ação depende da taxa do fluxo crevicular gengival e das condições anatomopatológicas da bolsa periodontal;
- a cinética de liberação depende da integridade da forma farmacêutica;
- o tamanho da preparação às vezes é muito grande;
- os custos mais elevados que os das formas farmacêuticas convencionais.

2.4.2 Características

Várias características devem ser levadas em consideração no desenvolvimento de um dispositivo SLIB.

A bolsa periodontal é naturalmente irrigada pelo fluido crevicular gengival. Em pessoas com doença periodontal a taxa média de fluxo do fluido crevicular em sítios individuais está aumentada. Geralmente, um fluxo alto resultará em uma difusão mais rápida do fármaco do dispositivo de liberação, enquanto que um fluxo mais baixo retarda essa depleção. Assim, a taxa de liberação deve ser mais alta no estágio inicial da liberação, para que seja atingido o nível terapêutico o mais rápido possível, mantendo-se durante todo o período de tratamento (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

Um outro parâmetro a ser considerado é a absorção do fármaco. A baixa capacidade de penetração através dos tecidos da mucosa possibilita ao fármaco alcançar altas concentrações locais e prolonga os níveis elevados no interior da bolsa (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

O tamanho e a profundidade da bolsa são importantes na formulação do dispositivo. Desde que a profundidade média de uma bolsa é de 5 a 12 mm (MEDLICOTT et al., 1994), o dispositivo não pode ser grande. Assim, é necessário que a dose do agente ativo contida no dispositivo seja altamente efetiva, e que este seja altamente específico, evitando, por exemplo, recidivas e o aparecimento de cepas resistentes (STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

Além disso, o dispositivo (JONES et al., 2000; MEDLICOTT et al., 1994; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996; STEINBERG; FRIEDMAN, 1988):

- deve ser de fácil aplicação por parte do profissional (dentista);
- não deve ser volumoso e nem causar desconforto ou irritação;
- deve possuir características físicas que facilite a inserção rápida dentro da bolsa, causando o mínimo de dor ao paciente;
- não pode ser exposto além da margem gengival;
- não deve causar nenhuma interferência na higiene oral diária normal do paciente, a qual inclui escova e fio dental;
- não pode gerar nenhum problema no padrão de dieta normal do paciente;
- deve ser prontamente aceito pelo paciente.

2.4.3 Classificação

Um dispositivo SLIB pode ser classificado em biodegradável e não-biodegradável, dependendo do material envolvido na sua concepção (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996).

Dispositivos que não são biodegradáveis possuem a vantagem de permitir o controle do tempo de exposição do ambiente da bolsa ao fármaco. Entretanto, a principal limitação desse tipo de dispositivo é a necessidade de remoção do mesmo após o período de tratamento e vários problemas têm sido associados a esse procedimento (JONES et al., 1996; MEDLICOTT et al., 1994). Normalmente é necessária competência técnica para assegurar a retirada completa do dispositivo vazio, devido à possibilidade do aparecimento de efeitos indesejáveis, tais como inflamação do tecido local, resultantes do reconhecimento pelo sistema imune de um corpo estranho (fragmentos). Além disso, a remoção do dispositivo é acompanhada por um rápido declínio na concentração antibacteriana (TONETTI; CUGINI;

GOODSON, 1990), o qual está freqüentemente associado com recolonização da bolsa periodontal. Por outro lado, os dispositivos biodegradáveis possuem a grande vantagem do paciente necessitar de apenas uma visita ao dentista para a inserção do dispositivo, que não precisa ser retirado, havendo uma diminuição das visitas clínicas e assegurando uma melhor adesão do paciente ao tratamento (BROMBERG et al., 2001; STEINBERG; FRIEDMAN, 1988).

A partir das últimas três décadas do século passado até os dias de hoje, vários sistemas reservatórios ou matriciais foram investigados (MEDLICOTT et al., 1994). Sistemas do tipo reservatório são constituídos por um núcleo contendo o fármaco no estado sólido ou líquido, revestido por uma membrana ou parede permeável. Já em um sistema de liberação matricial o fármaco é distribuído através do polímero ou mistura de polímeros, de natureza química e propriedades variáveis, sendo que a liberação ocorre através da difusão e/ou dissolução ou erosão da matriz (ANSEL, 2000). Os dispositivos nos quais a liberação ocorre apenas por difusão, são preparados utilizando-se polímero ou mistura de polímeros insolúveis em água e não-biodegradáveis (ADDY et al., 1982; FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; GOODSON et al., 1983). Por outro lado, os dispositivos matriciais onde a liberação do fármaco ocorre por difusão e erosão ou dissolução da matriz são compostos por polímeros hidrossolúveis ou biodegradáveis (MEDLICOTT et al., 1994).

Quanto à forma, além dos tubos ocos de acetato de celulose, também chamados de fibras, os sistemas SLIB podem ser classificados em filmes, dispositivos injetáveis e híbridos (MEDLICOTT et al., 1994; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996).

2.4.3.1 Fibras

A utilização de fibras ou dispositivos semelhantes a uma linha, para a liberação prolongada de fármacos no interior da bolsa periodontal, foi introduzida por Goodson et al. (1979) com a utilização dos tubos de diálise para a liberação de tetraciclina. Apesar do sistema demonstrar efeitos clínicos importantes (LINDHE et al., 1979), concluiu-se que ele não prolongava os níveis terapêuticos do fármaco pelo tempo suficiente para ser útil clinicamente (GOODSON et al., 1985). Estudos foram realizados utilizando o mesmo sistema para a liberação de gluconato de clorexidina (COVENTRY; NEWMAN, 1982) e metronidazol (WAN YUSOF et al., 1984) com conclusões similares.

Fibras de silicone também foram desenvolvidas para a liberação prolongada intrabolsa de metronidazol, demonstrando uma liberação do fármaco por mais de dez dias (FERES FILHO et al., 1990).

Vários outros estudos foram realizados (COVENTRY; NEWMAN, 1982; GOODSON et al., 1979; 1985; LINDHE et al., 1979; WAN YUSOF et al., 1984), os quais demonstraram a eficiência das fibras em reduzir a profundidade das bolsas periodontais e o sangramento, com um significativo aumento do nível de adesão do epitélio (NEWMAN et al., 1984; TONETTI et al., 1990). Estes levaram ao desenvolvimento de um sistema de liberação disponível comercialmente (Actisite[®], Alza Corporation), baseado em uma fibra monolítica de acetato de etilenovinila para a liberação de tetraciclina (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996). A fibra deve ser inserida ao redor da circunferência do dente, aprofundando-a na bolsa periodontal (fundo), através de várias voltas para preencher completamente a bolsa. Trata-se de um processo demorado (7 a 10 minutos por dente), necessitando de artifícios, como a cola de cianoacrilato, para reter o dispositivo dentro da bolsa pelo período do tratamento.

Por não serem biodegradáveis, as fibras possuem a desvantagem da necessidade de, pelo menos, duas visitas ao dentista, uma para inserção e outra para a remoção do dispositivo (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996; MINABE et al., 2000). No entanto, nos últimos anos a utilização de fibras tem sido alvo de estudos. Ahuja et al. (2003) prepararam fibras de acetato de etilenovinila carregadas com amoxicilina trihidratada utilizando a técnica de *melt spinning*. Essas demonstraram ser efetivas no controle de liberação de amoxicilina, sendo uma alternativa simples para a administração sistêmica. Fibras carregadas com tetraciclina foram avaliadas clinicamente, demonstrando o melhor desempenho da resposta clínica à raspagem e aplainamento radicular em pacientes com periodontite agressiva (AIMETTI et al., 2004; FRIESEN et al., 2002; SAKELLARI et al., 2003).

2.4.3.2 Filmes

A forma farmacêutica mais utilizada para os sistemas de liberação intrabolsa é a de filme, que possui propriedades físicas vantajosas para a utilização intrabolsa (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996):

- a dimensão e formato podem ser facilmente controlados para corresponderem às dimensões da bolsa a ser tratada;
- pode ser inserido rapidamente na bolsa com o mínimo desconforto ao paciente;
- pode ser inserido na base da bolsa, ficando totalmente submerso;

- se a espessura do filme não exceder 400 μm , e se possuir adesividade suficiente, ele permanecerá submerso, não interferindo nos hábitos alimentares e de higiene oral do paciente.

2.4.3.2.1 Filmes não-biodegradáveis

Um estudo comparativo entre filme de polietilmetacrilato (polímero não-biodegradável) e tubos de diálise foi realizado usando como agentes ativos clorexidina, metronidazol e tetraciclina (ADDY et al., 1982). As investigações foram conduzidas tanto *in vitro* como *in vivo*. Os filmes foram obtidos por moldagem sob alta pressão e cortados em tamanhos adequados. Várias quantidades de agentes ativos foram acrescentadas ao filme de polietilmetacrilato, enquanto que os tubos de diálise foram preenchidos apenas com clorexidina. Nos ensaios *in vitro*, cada filme de acrílico e cada tubo de diálise foram colocados, separadamente, em tubos de ensaio, ficando imersos em 1 mL de água destilada, sendo incubados a 37°C durante 24 horas. Após esse período, o dispositivo era transferido para um novo tubo com o mesmo volume de água destilada (1mL), o qual era novamente incubado, enquanto o líquido era analisado pela espectrofotometria de luz ultravioleta para averiguação da quantidade de agente ativo liberado. Esse protocolo foi repetido diariamente durante 14 dias. No estudo *in vivo*, os dispositivos foram inseridos em bolsas periodontais selecionadas de 4 voluntários portadores de periodontite avançada, retirados a cada 5 dias e colocados em placas de agar-sangue semeado com amostras do biofilme subgengival coletado dos próprios pacientes no início do tratamento, para verificação do halo de inibição. Concluíram que os tubos de diálise liberavam muito rapidamente o fármaco e que as tiras de acrílico, com 30, 40 e 50% de fármaco, são mais indicadas para esse tipo de tratamento produzindo halos de inibição e liberação por 14 dias.

Investigações clínicas e microbiológicas de filmes contendo 30% (p/p) de fármaco demonstraram que os filmes com metronidazol eram mais efetivos (ADDY et al., 1988; ADDY; LANGEROUDI, 1984; YEUNG; NEWMAN; ADDY, 1983). Essas evidências foram confirmadas por Newman et al. (1984).

Posteriormente, Friedman e Golomb (1982) testaram filmes de etilcelulose quanto à capacidade de liberação lenta de clorexidina. Os filmes de etilcelulose foram obtidos por evaporação do solvente, sem e com polietilenoglicol, utilizando-se clorofórmio ou etanol, acrescentados lentamente ao polímero e agitando até sua completa dissolução, quando então era acrescentada a clorexidina. Para se avaliar a liberação do fármaco, os filmes foram

cortados em pequenos círculos, presos a uma película de parafina e colocados em um reservatório com um volume pré-determinado de água, aquecida a 37°C. Periodicamente a solução era substituída e examinada por espectrofotometria de luz ultravioleta, avaliando a quantidade de clorexidina liberada. Em 205 dias, os dispositivos contendo 5, 10 e 20% de clorexidina liberaram 20, 30 e 60% da carga, respectivamente. No entanto, nas membranas contendo aditivos, a maior parte de fármaco liberado (95%) ocorreu nos primeiros 10 dias. Portanto, a adição de polietilenoglicol, etanol ou clorofórmio à etilcelulose provocou aumento na porosidade da matriz e na liberação de clorexidina. Concluíram que o dispositivo poderia ser útil no controle do biofilme, forrando bases de próteses e aparelhos ortodônticos removíveis. Outra utilidade seria liberação do medicamento dentro de bolsas periodontais.

Filmes contendo clorexidina (FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; SOSKOLNE et al., 1993; STABHOLZ et al., 1986; 1991), metronidazol (GOLOMB et al., 1984), minociclina (ELKAYAM et al., 1988) e tetraciclina (STABHOLZ et al., 1998) foram desenvolvidos e testados. A liberação do agente terapêutico a partir desses filmes foi dependente do solvente utilizado, da presença de plastificante, da natureza e concentração de fármaco e das dimensões físicas do filme.

2.4.3.2.2 Filmes biodegradáveis

Vários dispositivos degradáveis na forma de filme têm sido avaliados experimentalmente (SOSKOLONE; FIREDMAN, 1996). Dispositivos reabsorvíveis de hidroxietilpropilcelulose para a liberação de tetraciclina e clorexidina (NOGUCHI et al., 1984) e de ofloxacin (HIGASHI et al., 1990; KIMURA et al., 1991) foram testados clinicamente, obtendo-se bons resultados.

Noguchi et al. (1984) foram os primeiros a desenvolver um sistema SLIB biodegradável. Utilizando-se filmes de hidroxipropilcelulose, eles conseguiram uma liberação rápida *in vitro* dos fármacos (2 horas), com um máximo de dissolução do filme em três horas. *In vivo*, foi observada uma retenção de tetraciclina nas bolsas por um período de 24 horas.

Modificando os sistemas, através da incorporação de partículas levemente solúveis de copolímero do ácido metacrílico no filme de hidroxipropilcelulose, a liberação do fármaco ofloxacin foi prolongada, com uma liberação *in vitro* de 70% do mesmo em oito horas. *In vivo*, níveis acima de 2 µg/mL de ofloxacin foram mantidos por sete dias depois do tratamento com o dispositivo. Duas aplicações semanais desse dispositivo resultaram em reduções significativas no número de espiroquetas e organismos com motilidade na bolsa periodontal.

Não foram observados resultados similares com o placebo. Um novo tratamento dessas mesmas bolsas com os filmes, após procedimento clínico, demonstrou uma maior redução na flora microbiana, mas as alterações não foram significativamente diferentes do controle.

Deasy et al. (1989), usando filmes biodegradáveis à base de ácido polidroxibutírico contendo tetraciclina ou metronidazol para o tratamento das doenças periodontais, realizaram estudos *in vitro* e *in vivo*. No ensaio *in vitro*, observaram que aumentando a concentração do fármaco no dispositivo, ocorre aumento proporcional ao volume liberado, sendo que a tetraciclina foi liberada mais lentamente que o metronidazol. Após os primeiros 5 dias, os filmes tornaram-se bastante frágeis. *In vivo*, o índice de placa, a inflamação e a profundidade de sondagem diminuíram em todos os grupos tratados, entretanto houve tendência à recidiva após aproximadamente dois meses do término do tratamento. Nas bolsas tratadas com metronidazol, o número de espiroquetas se manteve baixo por mais tempo que o grupo tratado com aplainamento radicular. Concluíram que o tratamento com dispositivos de liberação lenta, usando tetraciclina ou metronidazol, se mostrou efetivo como coadjuvante no tratamento das periodontites e que, no futuro, poderão ser utilizados rotineiramente pelos dentistas. A partir desse momento, vários polímeros biodegradáveis começaram a ser testados como filmes para a liberação prolongada de fármaco na bolsa periodontal (Quadro 6)

Material	Fármaco (s)	Referência
Poli(ε-caprolactona)	Clorexidina	GOODSON et al., 1983; MEDLICOTT et al., 1996
Hidrolisado de gelatina de origem bovina (proteína Byco) reticulada com formaldeído (Periochip®)	Clorexidina	STEINBERG et al., 1990; SOSKOLONE et al., 1998
Atelocolágeno	Tetraciclina	MINABE et al., 1989a,b,c
Poli(ε-caprolactona)	Clorexidina	MEDLICOTT et al., 1992
Teflon	Clorexidina	KOZLOVSKY et al., 1992
Colágeno	Metronidazol	HITZIG et al., 1994
Teflon	Cloreto de Cetilpiridínio	KOZLOVSKY et al., 1994
Poli(ε-caprolactona) e segmentos éteramida	Metronidazol	QUAGLIA et al., 2002
Gelatina	Meloxicam	CETIN et al., 2005
Poli(L-lactídio-co-glicolídio)	Amoxicilina e Metronidazol	AHUJA; ALI; RAHMAN, 2006

Quadro 6. Filmes biodegradáveis estudados para a utilização com dispositivos intrabolsa na doença periodontal.

2.4.3.3 Dispositivos injetáveis

A possibilidade de injeção de um sistema SLIB é muito vantajosa (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996). Trata-se de um procedimento relativamente simples com pouco ou nenhum desconforto associado com a inserção da forma farmacêutica (NEEDLEMAN, 1991). A natureza fluida inicial das formulações, a qual é necessária para a sua utilização com uma seringa, permite que a formulação tenha acesso a toda região no interior da bolsa. Para ser retida na bolsa, a formulação deve sofrer um aumento de viscosidade e/ou possuir bioadesão, evitando que a mesma seja lavada pelo fluxo do fluido crevicular gengival e pela saliva (JONES et al., 2000; MEDLICOTT et al., 1994).

2.4.3.3.1 Pomadas

As primeiras investigações realizadas na tentativa de desenvolvimento de um sistema SLIB utilizavam pomadas lipofílicas, principalmente de vaselina, contendo tetraciclina (ECKLES et al., 1990) ou minociclina (NAKAGAWA et al., 1991; VAN STEENBERGHE, et al., 1993). Os resultados constataram uma diminuição significativa na proporção do número de microrganismos periodontopatogênicos, da profundidade das bolsas e uma vantajosa associação do dispositivo aos procedimentos clínicos de limpeza e aplainamento radicular.

No entanto, as pomadas não demonstraram possuir propriedades de liberação prolongada de fármaco (SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996). Roskos et al. (1995) desenvolveram um gel hidrofóbico passível de bioabsorção (poli orto-éster), enriquecido com 0,5% de hidróxido de magnésio para retardar a liberação do fármaco, incorporando tetraciclina como agente terapêutico. O início da liberação *in vitro* ocorreu após 24 horas e a adição de quantidades de hidróxido de magnésio prolongou o tempo de liberação, melhorando a performance do produto para uso clínico, tendo sido considerado um dispositivo promissor.

2.4.3.3.2 Géis hidrofílicos

O mesmo problema de liberação rápida do fármaco foi citado para os dispositivos na forma de géis hidrofílicos (NEEDLEMAN, 1991). Apesar disso, o número de investigações utilizando esse tipo de dispositivo cresceram rapidamente (Quadro 7).

Material (is)	Fármaco (s) incorporado (s)	Características	Referência (s)
Ácido poli(D,L-lático-co-glicólico)	Tetraciclina	Gel bioerodível; manteve os níveis terapêuticos da tetraciclina na bolsa por um período de 8 dias	MAZE et al., 1996
Poloxamer 407 com polivinilpirrolidona, metilcelulose ou hidroxipropilmetilcelulose	Melanotan-I [®]	Gel termo-sensível; a adição de hidroxipropilmetilcelulose diminuiu a taxa de liberação do fármaco; não houve necessidade de cirurgia para ser colocado ou retirado	BHARDWAJ; BLANCHARD, 1996
Poloxamer	Tetraciclina	Gel termo-sensível, biocompatível e com liberação da tetraciclina em níveis terapêuticos	ESPÓSITO et al., 1996
Hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e policarbofil	Tetraciclina	Gel mucoadesivo, de liberação prolongada e seringueabilidade adequada.	JONES et al., 1996
Hidroxietilcelulose e Carbopol [®]	Metronidazol	Gel mucoadesivo, de liberação prolongada e seringueabilidade adequada.	JONES et al., 1997
Álcool polivinílico	Metronidazol	Sistema solúvel em meio aquoso e de liberação prolongada, de acordo com o grau de cristalização do polímero.	MALLAPRAGADA ; PEPPAS; COLOMBO, 1997
Copolímero bioerodível	Tetraciclina	Gel bioabsorvível com liberação média de 100ug/mL de fármaco nos primeiros 6 dias.	NEEDLEMAN; MARTIN; SMALES, 1998
Gelatina, ácido poliglutâmico e uréia	-	Características de viscosidade adequadas.	OTANI; TABATA; IKADA, 1998
Poloxamer, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose ou dextrana	Lidocaína ou ibuprofeno	Poloxamer associado principalmente a hidroxipropilmetilcelulose proporcionou liberação mais regular e prolongado dos fármacos.	PAAVOLA; YLIRUUSI; ROSENBERG, 1998
Hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e policarbofil	Flurbiprofeno	Benefícios clínicos evidentes.	JONES et al., 1999

continua

continuação

Material (is)	Fármaco (s) incorporado (s)	Características	Referência (s)
Poloxamer 188 e 407	Prilocaína e lidocaína	Boa estabilidade, fácil preparação, aumento da taxa de liberação de fármaco e melhora no manuseio devida a transparência das formulações	SCHERLUND et al., 2000
Hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e policarbofil	Tetraciclina	Boa mucoadesão e características reológicas adequadas.	JONES et al., 2000; JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001
Ácido poli(D,L-lático-co-glicólico), etilcelulose, carboximetilcelulose, Carbopol 971 [®] , nitrato de prata e amido de milho	Benzilpenicilina, tetraciclina, sulfadiazina de prata	<i>Wafers</i> preparados por compressão, capazes de liberação de ordem-zero dos fármacos por mais de 4 semanas	BROMBERG et al., 2001
Colágeno	Clorexidina	Gel com 1% de fármaco demonstrou resultados promissores juntamente com limpeza e aplainamento radicular.	VINHOLIS et al., 2001
Hidroxipropilmetilcelulose, Carbopol 940 [®] , Carbopol 971 [®] , policarbofil, hidroxipropilmetilcelulose K4M e K15M	Metronidazol	Hidroxietilcelulose e Carbopol 940 [®] (2:2) renderam a melhor performance mucoadesiva e com liberação do fármaco em concentrações ideais por 12 h.	PERIOLI et al., 2004
Polietilenoglicol (copolímero lactídeo-glicolídeo livre de amina)	Doxiciclina	Liberou níveis eficazes do fármaco por uma semana	KIM et al., 2002
Poli (orto éster)	Tetraciclina	Retenção do medicamento nas bolsas; concentrações de tetraciclina maiores que a inibitória mínima para a maioria dos patógenos periodontais, foram mantidas por onze dias	SCHWACH-ABDELLAOUI et al., 2002
Poloxamer 407	Tetraciclina	Sistema retido na bolsa por seis semanas com níveis efetivos do fármaco	KELLY et al., 2004

continua

conclusão

Material (is)	Fármaco (s) incorporado (s)	Características	Referência (s)
Anidrido polimetilvinileter-co-maleico (PMVE-MA) e Polivinilpirrolidona (PVP)	Tetraciclina	A liberação do fármaco foi prolongada e controlada pela difusão e intumescimento da mistura polimérica.	JONES; LAWLOR; WOOLFSON, 2004
Carbopol 934P [®]	Alendronato de sódio	Liberação por difusão não-Fickiana (primeira ordem). Os resultados <i>in vivo</i> revelaram uma significativa melhora nos parâmetros clínicos.	REDDY; KUMAR; VEENA, 2005

Quadro 7. Géis hidrofílicos estudados para a utilização como dispositivos SLIB na doença periodontal.

2.4.3.3 Precursor de fase cristalina líquida

Os cristais líquidos, também chamados de mesofases cristalinas líquidas liotrópicas, têm merecido destaque na liberação de fármacos (HYDE, 2001).

Norling et al. (1992) desenvolveram um sistema de liberação prolongada contendo metronidazol. Trata-se de um sistema líquido composto por uma mistura de monoleato de glicerina e benzoato de metronidazol isenta de água, na qual um triglicerídeo, óleo de sésamo (gergelin), foi adicionado para diminuir o ponto de fusão, melhorando as características de fluxo do sistema na seringa. Quando o sistema é aplicado no interior da bolsa periodontal, adere à mucosa e, ao entrar em contato com água (fluido crevicular ou saliva), se transforma em um cristal líquido (consistência semi-sólida).

Foi um sistema muito estudado, estando disponível no mercado mundial sob o nome de Elyzol[®] (Dumex, Copenhagen, Dinamarca) (DUMEX, 2003). A concentração de benzoato de metronidazol na formulação é de 40 % (p/p), correspondendo a 25% de metronidazol. A solubilidade do fármaco e sua concentração influenciam o perfil de liberação. A matriz é degradada por neutrófilos e lipases bacterianas presentes no fluido crevicular gengival (NORLING et al., 1992). Concentrações de 103 a 1297 µg/mL de metronidazol foram observadas em bolsas inflamadas tratadas com este dispositivo, com doses efetivas sendo mantidas por 24 a 36 horas (STOLTZE, 1992). Níveis sistêmicos de metronidazol entre 0,2 e 1,3 µg/mL foram observados depois da administração de 29 a 103 mg da preparação

(STOLTZE; STELLFELD, 1992), concluindo-se que o sistema aplicado localmente atingiu altas concentrações nas bolsas periodontais e foi significativamente menos tóxico quando comparado à via sistêmica. A terapia recomendada é de duas aplicações separadas em cada bolsa, com intervalo de uma semana (KLINGE et al., 1992). Os resultados dos estudos clínicos compararam essa abordagem terapêutica isoladamente e com a raspagem e aplainamento radicular, indicando que esse dispositivo com metronidazol resultou na redução da profundidade da bolsa e do sangramento na sondagem, o que não é significantemente diferente dos resultados obtidos apenas com a limpeza e aplainamento radicular (AINAMO et al., 1992; PEDRAZZOLI; KILIAN; KARRING, 1992)

Esposito et al. (1996) prepararam duas formulações contendo tetraciclina visando o tratamento de periodontite, para serem administradas diretamente dentro da bolsa periodontal. Foram escolhidas duas formulações semi-sólidas, uma baseada em poloxamer 407 e outra com monoglicerídeos (Elyzol[®]). A análise demonstrou liberação da tetraciclina em níveis terapêuticos. O estudo indicou que os produtos testados são aplicáveis na bolsa periodontal, demonstrando eficiência no tratamento das periodontites.

Noyan et al. (1997) compararam os efeitos do metronidazol administrado por via sistêmica (Flagyl[®]) e localmente (Elyzol[®]). Os pacientes foram tratados com o quimioterápico associado ou não ao desbridamento mecânico. O período de tratamento durou 10 dias e os pacientes foram monitorados durante 42 dias quanto aos parâmetros clínicos e microbiológicos. Todas as modalidades de tratamento apresentaram melhora clínica e redução do número de bactérias anaeróbias. Entretanto, o grupo tratado com desbridamento e dispositivo de liberação prolongada mostrou-se mais prático e com menos efeitos colaterais, portanto, mais efetivo. Concluíram que atualmente, na terapia periodontal, deve-se considerar a possibilidade e a necessidade do uso associado do desbridamento mecânico seguido de antibioticoterapia local e que o metronidazol liberado do Elyzol[®] mostrou-se uma terapia efetiva no tratamento das bolsas periodontais profundas.

Stelzel e Fiores-de-Jacoby (1997) observaram o comportamento clínico e a reinfestação microbiológica em pacientes tratados com raspagem subgingival isolada ou associada à aplicação de metronidazol tópico liberado lentamente na bolsa periodontal (Elyzol[®]). Os resultados demonstraram que houve melhora clínica e que os microrganismos anaeróbios foram significativamente diminuídos, principalmente no grupo tratado com antibiótico, promovendo saúde após o tratamento com ganho de inserção e diminuição da profundidade de sondagem que se manteve relativamente estável durante os 24 meses de acompanhamento. Observaram que no tratamento com antibiótico a melhora foi mais rápida.

Contudo, as duas modalidades de tratamento, quando bem realizadas, podem oferecer bons resultados e que em longo prazo, não houve diferenças significativas entre os dois grupos tratados. Outros autores também concluíram que a utilização de tetraciclina ou metronidazol aplicados através do precursor de fase cristalina líquida, quando associados à raspagem e alisamento radicular, pode ser de grande valia na terapia periodontal (AWARTANI; ZULQARNAIN, 1998; LIE; BRUUN; BÖE, 1998).

2.4.3.3.4 Híbridos

Esses sistemas combinam as propriedades de mais que uma classe de dispositivos (NEEDLEMAN, 1991). Dessa maneira, há o potencial de se poderem selecionar as características de diferentes grupos, combinando-os dentro de apenas um dispositivo.

Partículas poliméricas de copolímeros do ácido láctico e ácido glicólico, de aproximadamente 0,2 mm de diâmetro, foram preparadas para a liberação intrabolsa de tetraciclina e de minociclina (MEDLICOTT et al., 1994; VANDEKERCKHOVE; QUIRYNEN; STEENBERGHE, 1998). As microcápsulas contendo tetraciclina foram suspensas em um gel termo-sensível de poloxamer 407, o qual gelifica à temperatura corporal retraindo as microcápsulas na bolsa periodontal durante todo o período de tratamento. Em animais, foi observado que a concentração de tetraciclina no fluido crevicular gengival foi mantida de 3 a 4 dias. Em contraste, microcápsulas de minociclina no estado seco foram administradas em bolsas periodontais de cães beagles, demonstrando que uma concentração efetiva de minociclina foi mantida por quatorze dias (LAWTER et al., 1990¹ apud MEDLICOTT et al., 1994).

Copolímeros do ácido láctico e ácido glicólico também foram utilizados na preparação de microesferas contendo flurbiprofeno para o tratamento de periodontite, obtendo-se constantes de liberação do fármaco de primeira ordem (SAMATI; YUKSEL; TARIMCI, 2006). Além disso, microesferas destes copolímeros foram revestidas com alginato, através da técnica de dupla emulsificação e evaporação do solvente, para liberação intrabolsa periodontal de tetraciclina (LIU et al., 2004). A liberação de tetraciclina foi prolongada por 9-12 dias com 50% ou mais da liberação acumulada de tetraciclina comparada com as microesferas não revestidas.

¹LAWTER, J. R. et al. Sustained drug delivery to the periodontal pocket. In: INT. SYMP. CONTROL. REL. BIOACT. MATER., *Anais...* 1990. p. 230-231.

2.4.4 Sistemas bioadesivos na liberação de fármaco intrabolsa periodontal

Os SLIB podem ser bioadesivos, os quais interagem com a mucina que reveste o epitélio e a superfície dos dentes pelos princípios da mucoadesão, assegurando a retenção da formulação dentro da bolsa (JONES et al., 2000).

Um sistema adesivo promove íntimo contato entre a forma farmacêutica e o tecido de absorção, o qual resulta em alta concentração em uma área localizada e também, um alto fluxo de fármaco (AHUJA; KHAR; ALI, 1997; GUO; COOKLOCK, 1996; PEPPAS; HUANG, 2004).

Os atributos desejáveis para um sistema adesivo oral para a liberação prolongada são a alta capacidade de carregar fármaco, boa mucoadesão, não ser irritante, ser confortável, sem sabor ou de sabor agradável e liberar o fármaco por um tempo prolongado (MARTIN et al., 2003).

Nos anos recentes, foram sugeridas formas farmacêuticas mucoadesivas para liberação oral, tais como comprimidos, *patches* e sistemas semi-sólidos. Dentre elas, alguns sistemas SLIB foram investigados.

Patches bioadesivos envolvem os sistemas mais simples como os filmes erodíveis e não erodíveis e os mais sofisticados, que são projetados para proporcionar liberação unidirecional ou bidirecional de fármaco (DEGRANDE et al., 1996; FOWLER; BREAUULT; BRYANT, 2001; GUO; CREMER, 1999; PEH; WONG, 1999). No entanto, os *patches* mais sofisticados não são adequados para a liberação de agentes ativos no interior da bolsa periodontal. A utilização de polímeros não-biodegradáveis, a necessidade de remoção ao final da terapia, a baixa flexibilidade e elasticidade, reações imunológicas potenciais, sensibilização de tecido e dificuldade de aplicação na bolsa limitam o emprego dos mesmos (JONES et al., 1996; WONG; YUEN; PEH, 1999b). Assim os filmes mucoadesivos poliméricos têm sido mais estudados (FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; JONES; MEDLICOTT, 1995; MATSUDA et al., 1999; MINABE et al., 1989a,b,c; PEH; WONG, 1999; STEINBERG et al., 1990).

Os sistemas semi-sólidos bioadesivos baseados em hidrogéis também são formas farmacêuticas altamente atrativas para a liberação intrabolsa, com a possibilidade de prolongar o tempo de residência do dispositivo e melhorar a biodisponibilidade (CHIDAMBARAM; SRIVATSAVA, 1995; JONES et al., 1996, 2000). Há uma variedade de materiais que têm sido utilizados no desenvolvimento desses sistemas, tais como hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e policarbofil (JONES et al., 1996; 1999; 2000); carboximetilcelulose, metilcelulose, hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e Carbopol®

(VARSHOSAZ; DEHGHAN, 2002); quitosana (IKINCI et al., 2002; KELLY et al., 2004; MARTIN et al., 2003). Lipossomas preparados com fosfatidilcolina de ovo, colesterol e estearoilamina foram revestidos com lectina (Concavalina-A) (VYAS; SIHORKAR; DUBEY, 2001). Esses lipossomas mucoadesivos demonstraram habilidade em manter a afinidade a açúcares e especificidade do ligante associado, podendo ser alvejado para a superfície do glicocálice do biofilme bacteriano.

A principal propriedade da bioadesão é a força de adesão da forma farmacêutica ao tecido biológico (PEPPAS; HUANG, 2004; SMART, 2005; WONG et al., 1999a). Assim, vários métodos tem sido reportados na literatura para avaliar a mucoadesão na cavidade oral (BOUCKAERT; LEFEBVRE; REMON, 1993; MORTAZAVI; SMART, 1995). Estes testes são necessários para avaliar um grande número de compostos mucoadesivos e estudar seus mecanismos, além de assegurar a compatibilidade, estabilidade física e força bioadesiva, durante o desenvolvimento dos sistemas. Assim, um polímero ideal para um sistema de liberação intrabolsa periodontal deve possuir as seguintes características:

- 1) O polímero e seus produtos de degradação não devem ser tóxicos e não absorvíveis através do tecido da bolsa.
- 2) Não deve ser irritante ou causar inflamação.
- 3) Deve preferencialmente formar uma ligação não covalente com as superfícies epiteliais de mucina.
- 4) Deve aderir rapidamente no tecido úmido e possuir alguma especificidade local.
- 5) Deve permitir a fácil incorporação do fármaco e não oferecer impedimento à sua liberação.
- 6) Deve permitir o conforto e a flexibilidade da forma farmacêutica.
- 7) Deve ser estável durante o seu tempo de estocagem ou da forma farmacêutica.
- 8) O custo do polímero não deve ser alto, permitindo a produção de dispositivos viáveis economicamente.

Além disso, muitos polímeros mucoadesivos são capazes de inibir enzimas proetolíticas e/ou modular a permeabilidade tecidual (LEHR, 1996), podendo ser úteis no desenvolvimento de novos dispositivos SLIB.

2.4.5 Avaliação da efetividade do tratamento da doença periodontal com SLIB

Existem vários protocolos que têm sido empregados na avaliação da efetividade da terapia periodontal com sistemas SLIB. Geralmente, os efeitos dos tratamentos são avaliados

pela medida da melhora clínica e das alterações da microflora subgengival (MEDLICOTT et al., 1994). A melhora clínica é medida através de uma série de índices e medidas físicas e avalia o grau de inflamação e de acumulação de placa, tais como o índice de placa, índice gengival, grau de hemorragia à sondagem, profundidade da bolsa, medida do nível de adesão do epitélio juncional, medida da taxa de fluido crevicular (SEYMOUR, HEASMAN, 1992). Outra avaliação importante é a microbiológica, que envolve a determinação das alterações na microflora subgengival. As bactérias coletadas são identificadas ou classificadas de acordo com sua morfologia, coloração Gram, motilidade e requerimentos de oxigênio. As proporções são calculadas para cada espécie ou grupo e alterações de populações patogênicas para não-patogênicas são observadas durante o tratamento (MEDLICOTT et al., 1994).

Assim o fluido crevicular gengival possui uma grande importância na avaliação clínica da doença periodontal e da efetividade dos sistemas SLIB. Goodson (1989) calculou a taxa de renovação do fluido gengival em 40 vezes por hora e sugeriu que esta contribui para a rápida diminuição da quantidade de agente antibacteriano e pequena duração de ação do mesmo observada com o tratamento por irrigação. A análise da concentração de fármaco no fluido crevicular gengival é o melhor método para se determinar a efetividade de um sistema de liberação. O maior problema tem sido o desenvolvimento de ensaios sensíveis para agentes antibacterianos em volumes pequenos (0,5 µL) de fluido crevicular gengival (MEDLICOTT et al., 1994). Assim, vários autores têm desenvolvido ensaios microbiológicos (FREEMAN et al., 1992; GOODSON et al., 1983; GORDON et al., 1980; HIGASHI et al., 1991) e de cromatografia líquida de alta eficiência (BRITT; POHLOD, 1986; HIGASHI et al., 1989; HOLBOROW et al., 1988; STOLTZE, 1992) para a avaliação da atividade e a quantificação de alguns agentes terapêuticos liberados no fluido crevicular gengival a partir de sistemas SLIB.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal que fossem semi-sólidos bioadesivos termo-sensíveis, compostos por poloxamer 407 e Carbopol 934P[®], ou precursores de fase cristalina líquida, compostos por álcool cetílico etoxilado 20-OE e propoxilado 5-OP e miristato de isopropila, para serem utilizados no tratamento de doenças periodontais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da matéria-prima própolis (droga) e de seus extratos etanólicos;
- Preparação e avaliação de micropartículas de gelatina contendo própolis;
- Seleção do extrato, das micropartículas de gelatina contendo própolis e de suas respectivas concentrações a serem utilizados no desenvolvimento dos sistemas SLIB;
- Desenvolvimento de sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível com micropartículas contendo própolis preparadas *in situ*, análise morfológica e granulométrica das mesmas, assim como a determinação da temperatura de gelificação, da densidade relativa, do comportamento reológico, das propriedades mecânicas e mucoadesivas, da seringueabilidade e do teor de própolis dos sistemas obtidos;
- Desenvolvimento de sistema precursor de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis, assim como avaliação por microscopia óptica, determinação das características de sedimentação, determinação da densidade relativa, do comportamento reológico, das propriedades mecânicas, da seringueabilidade e do teor de própolis dos sistemas obtidos;
- Estudo do perfil de liberação *in vitro* da própolis a partir dos sistemas desenvolvidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes, solventes, soluções e matérias-primas

- Acetato de etila grau analítico (Ecibra[®])
- Acetona grau analítico (Merck[®])
- Acetonitrila grau CLAE (Mallinckrodt[®])
- Ácido clorídrico grau analítico (Merck[®])
- Álcool cetílico etoxilado 20-OE e propoxilado 5-OP (Procetyl AWS - Croda[®])
- Álcool etílico grau farmacêutico (96°GL)
- Carbopol 934P[®] (BF Goodrich[®])
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck[®])
- Cloreto de magnésio hexahidratado (Synth[®])
- Cloreto de potássio (Vetec[®])
- Cloreto de sódio (Carlo Erba[®])
- Cloreto de trifeniltetrazólio (Sigma[®])
- Crisina (substância referência, padrão grau analítico) (Sigma[®])
- Etanol absoluto grau analítico (Merck[®])
- Fosfato de potássio dibásico (Nuclear[®])
- Fosfato de potássio monobásico (Synth[®])
- Gelatina natural em pó tipo A (Royal[®])
- Gentamicina (Sigma[®])
- Gluconato de clorexidina (Periogard[®] - Colgate-Palmolive)
- Hidroxietilcelulose 4400 (Union Carbide[®])
- Manitol grau analítico (Nuclear[®])
- Meio de cultura agar *Brain-Heart Infusion* (BHI) (Merck[®])
- Meio de cultura caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck[®])
- Meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Merck[®])
- Metanol grau analítico (Merck[®])
- Metanol grau CLAE (Mallinckrodt[®])
- Metilparabeno (Galena[®])

- Miconazol (Sigma[®])
- Miristato de isopropila (Henrifarma[®])
- Mucina crua tipo II (Sigma[®])
- Penicilina (Sigma[®])
- Poloxamer 407 (Lutrol[®] F 127, BASF[®])
- Resazurin (Sigma[®])
- Solução de hexametilenotetramina 0,5% (p/p)
- Solução de sorbitol 70%
- Solução etanólica de cloreto de alumínio 2% (p/V)
- Solução metanólica de ácido acético 5% (V/V)
- Sulfato de sódio anidro grau analítico (Merck[®] e QM[®])
- Trietanolamina grau farmacêutico (Galena[®])

4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Agitador mecânico (Reidolph[®])
- Agitador magnético (Fisatom[®])
- Agitador magnético com aquecimento (Tecnal[®])
- Aparelho analisador de textura (TA-XTplus - Stable Micro Systems[®])
- Aparelho de dissolução (Sotax[®] AT-7)
- Aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Shimadzu[®]), com duas bombas de injeção de solvente (modelo LC-10AD), controle automático de fluxo, detector espectrofotométrico com fotodiodo (SPD-M10A Shimadzu[®] Diode Array Detector), com controlador de temperatura da coluna, sistema de integração e sistema de injeção (Rheodyne[®]) com *loop* de 100 µL
- Aparelho de liberação *in vitro* mimetizador de bolsa periodontal com quatro células de liberação, controlador automático de fluxo e de temperatura
- Balança analítica (Ohaus[®])
- Balança de determinação de umidade com unidade de infravermelho (Ohaus[®])
- Balança semi-analítica (Gehaka[®])
- Banho com ultra-som (XL2020 - Sonicator[®])
- Banho-maria (Fisatom[®])

- Centrífuga (C312 - Jouan[®])
- Coluna para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência RP – 18 (Varian[®] - Chromsep[®] 5 µm), com dimensões de 250 x 4,6 mm e pré-coluna embutida.
- Condutivímetro (CD-21 – Digimed[®])
- Condutivímetro modelo Conductivity Meter 441 (Corning[®])
- Espectrofotômetro de UV-VIS (DU 640 – Beckman Coulter[®])
- Espectrofotômetro de VIS (Femto[®])
- Estufa de secagem e esterilização (315 SE - Fanem[®])
- Evaporador rotatório (R114 - Büchi[®])
- Filme de PVC (Parafilm[®])
- Forno Mufla (Quimis[®])
- Frascos de MacCartney
- Jarra de anaerobiose com sistemas Gás-Pack
- Manta aquecedora termostatzada (Fisatom[®])
- Medidor de pH (DM 20 - Digimed[®])
- Membrana de acetato de celulose
- Micro-placa para ensaios microbiológicos
- Micro-seringa de 100 µL (Hamilton[®])
- Microscópio eletrônico de varredura (JSM T330A - JEOL[®])
- Microscópio óptico (DMRXA - Leica[®])
- Picnômetro (Pyrex[®])
- Placas de Petri (25,0 x 125,0 mm)
- Purificador de água (Milli-Q Plus - Millipore[®])
- Reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlado AR 2000 (T.A. Instruments[®])
- Seringas de plástico de 1,0 mL (Becton Dickson[®])
- Torre de secagem por aspersão (Mini-Spray Dryer B191 - Büchi[®])
- Turboextrator (liquidificador industrial, Visa[®])
- Unidade filtrante Millex[®] LCR, com membrana PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos (0,45 µm)

4.1.3 Outros

- Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 28366, *Enterococcus faecalis* ATCC 4082, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Lactobacillus casei* ATCC 11578, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta e avaliação da própolis

Duas amostras de própolis foram coletadas em colméias de abelhas *Apis mellifera* L., localizadas na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM), na cidade de Maringá, PR. Uma das amostras foi coletada no primeiro semestre de 1997 (FEI 97) e a outra no segundo semestre de 2002 (FEI 2002). Estas foram submetidas à refrigeração por 24 horas. Após este tempo, foram trituradas em liquidificador industrial, acondicionadas em saco plástico e armazenadas em freezer (- 18 °C).

4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação

A perda por dessecação foi determinada por método gravimétrico, empregando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho. Amostras de aproximadamente 3 g da droga triturada foram exatamente pesadas, em bandejas de alumínio taradas, e dessecadas, à temperatura de 110 °C, até peso constante (FRANCO, 2001; BRUSCHI et al., 2002). O resultado foi calculado em relação a 100 g de droga e representam a média de seis determinações.

4.2.1.2 Determinação do teor de cinzas

Calcinou-se previamente o cadinho de porcelana em mufla a 450 °C por 30 minutos. O mesmo foi resfriado em dessecador e seu peso (tara) foi determinado em balança analítica. Neste foram adicionados cerca de 3,0 g de própolis triturada, pesados em balança analítica, os quais foram incinerados e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por duas horas. Deixou-se em dessecador para arrefecimento e pesagem posterior. Repetiu-se a técnica até peso constante (FARMACOPÉIA, 1988). O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinzas na droga (% p/p) e representa a média de três determinações.

4.2.1.3 Determinação do teor de ceras

Para a determinação do teor de ceras, aproximadamente 1 g de própolis triturada, pesado em balança analítica, foi colocado em frasco de vidro, acrescido de 10 mL de éter de petróleo e submetido à agitação. Em seguida o frasco com o material foi submetido a aquecimento até ebulição do éter de petróleo por 5 minutos. Foram acrescentados mais 10 mL de éter de petróleo e submeteu-se a aquecimento (ebulição) por mais 5 minutos. Repetiu-se o processo mais uma vez. A fração etérea foi desprezada e a amostra de própolis remanescente foi seca, sendo posteriormente submetida à nova pesagem após arrefecimento da temperatura (FRANCO, 2001). O resultado foi expresso em porcentagem (% p/p) e representa a média de três determinações.

4.2.1.4 Determinação do teor de extrativos em água

Cerca de 1,0 g da droga triturada foi pesado em balança analítica e submetido a decocção com 100,0 g de água, durante 10 minutos. Após resfriamento, o volume foi completado a 100,0 mL. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro, desprezando-se os primeiros 20 mL. Do restante do filtrado, pesaram-se exatamente cerca de 20 g, em pesa-filtro tarado e evaporado até secar em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi dessecado em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de

110 °C até peso constante (DEUTSCHES, 1994). O resultado foi obtido em massa percentual segundo a equação abaixo:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m} \quad (1)$$

onde: TE = teor de extrativos (% p/p); g = massa de resíduo seco (g); m = massa da amostra (g); FD = fator de diluição (5).

O resultado representa a média de três determinações.

4.2.1.5 Determinação do teor de extrativos em etanol 96 °GL

Em pesa-filtro previamente tarado, foram pesados em balança analítica cerca de 20 g de extrato etanólico de própolis a 1% (p/p), preparado sob refluxo. A amostra foi evaporada até secar em banho-maria, sob agitação ocasional. O resíduo foi dessecado em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 110 °C até peso constante (FRANCO, 2001). O resultado foi obtido em massa percentual segundo a equação abaixo:

$$TE = \frac{g.100}{m} \quad (2)$$

onde: TE = teor de extrativos (% p/p); g = massa de resíduo seco (g); m = massa da droga.

O resultado representa a média de três determinações.

4.2.1.6 Determinação do teor de flavonóides totais

Cerca de 0,4 g da amostra de própolis triturada, pesados em balança analítica, foram colocados em balão de fundo redondo de 100 mL e acrescidos de 1,0 mL de uma solução de hexametilenotetramina 0,5% (p/p), 20 mL de acetona e de 2 mL de ácido clorídrico 6% (V/V). Foram aquecidos sob refluxo por trinta minutos. A mistura foi filtrada para balão volumétrico de 100,0 mL através de algodão. O resíduo da própolis e o algodão foram lavados com duas porções de 20 mL de acetona, aquecendo-se à fervura sob refluxo por 10 minutos em cada lavagem. Após resfriamento à temperatura ambiente, procedeu-se nova filtração

através de algodão para o balão volumétrico, completando-se o volume com acetona. Exatamente 10,0 mL da solução acetônica foram transferidos para funil de separação, tratados com 20 mL de água e, em seguida, extraídos com 15 mL de acetato de etila, repetindo-se a operação por três vezes, com porções de 10 mL de acetato de etila. As fases de acetato de etila foram reunidas em funil de separação e lavadas com duas porções de 50 mL de água. A seguir, a fração em acetato de etila foi filtrada para um balão volumétrico de 50,0 mL, através de algodão e sulfato de sódio anidro e completou-se o volume. Exatamente 10,0 mL dessa fração foram colocados em balão volumétrico de 25,0 mL, juntando-se 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio 2% (p/V) e completando-se com solução metanólica de ácido acético 5% (V/V). Ao mesmo tempo, 10,0 mL da fração de acetato de etila foram diluídos em balão volumétrico de 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético 5% (V/V), formando a solução compensação. Após trinta minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 425$ nm) (DEUTSCHES, 1994). Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado de cada determinação foi calculado de acordo a fórmula abaixo:

$$TF = \frac{A.FD}{\varepsilon.m.(1 - PD)} \quad (3)$$

onde: TF = Teor de flavonóides totais em quercetina expresso em gramas por 100 g de droga seca (% p/p); A = Absorvância da solução teste; FD = Fator de diluição (1250); ε = Absortividade específica da quercetina (500); m = massa de própolis testada (g); PD = Perda por dessecação da própolis (valor absoluto).

4.2.2 Preparação e avaliação dos extratos de própolis

Foram preparados extratos contendo 30% (p/p), da própolis FEI 97 e FEI 2002 trituradas, em etanol 96 °GL. Pesou-se 300,0 g de própolis os quais foram completados para 1000,0 g com o álcool, no copo do turbo extrator, permanecendo em repouso por 24 horas. Completou-se o peso com álcool e o material foi submetido a turbo extração durante 15 minutos, com dois intervalos de repouso de cinco minutos. O extrato foi submetido à refrigeração (8 °C) por 1 hora sendo, em seguida, filtrado sob vácuo e acondicionado em frasco de vidro âmbar com batoque interno de vedação e tampa de rosca (BRUSCHI, 2002).

4.2.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada utilizando-se aparelho medidor de pH calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 6,86 (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.2.2 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa dos extratos foi determinada através de picnômetro calibrado a 20 °C, em ambiente com temperatura controlada (20 °C). Em balança analítica, o picnômetro foi tarado previamente e foram determinados os pesos do picnômetro contendo água e contendo extrato. A densidade foi calculada através do quociente relativo à massa do extrato e à massa de água, após subtração da massa do picnômetro (FARMACOPÉIA, 1988). Foram realizadas três leituras para cada extrato.

4.2.2.3 Determinação do resíduo seco

Uma amostra de cerca de 10 g da solução extrativa foi pesada em balança analítica e evaporada em banho-maria, sob agitação ocasional. Após secura, o material foi colocado em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 110 °C até peso constante. O resultado obtido para o resíduo seco (RS) foi expresso em relação a 100,0 g de extrato e representa a média de três determinações.

4.2.2.4 Determinação do teor alcoólico

Uma alíquota de 25,0 mL da solução extrativa foi colocada em balão de fundo redondo, acrescida de 100,0 mL de água destilada e submetida à destilação simples. Aproximadamente 90 mL de destilado foram recolhidos em balão volumétrico de 100,0 mL e resfriados à temperatura ambiente. O volume foi completado com água destilada. A densidade do destilado foi determinada por areômetro e o teor de etanol, expresso em porcentagem (V/V), foi calculado (FARMACOPÉIA, 1959). Foram realizadas três determinações.

4.2.2.5 Determinação do teor de flavonóides totais

O teor de flavonóides totais dos extratos foi determinado segundo Franco (2001). Em funil de separação, foram adicionados 3,0 mL de extrato, 3,0 mL de água destilada e 3,0 mL de acetona. Esta mistura foi extraída três vezes com 15 mL de acetato de etila. As fases de acetato de etila foram reunidas e lavadas, em funil de separação, com duas porções de 50 mL de água. A seguir, a fração em acetato de etila foi filtrada para um balão volumétrico de 50,0 mL, através de algodão e sulfato de sódio anidro e completou-se o volume (SA). Retirou-se uma alíquota de 10,0 mL da SA, adicionou-se 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (p/V) e completou-se o volume em balão volumétrico de 25 mL com solução metanólica de ácido acético 5% (V/V). Ao mesmo tempo, outros 10,0 mL de SA foram diluídos em balão volumétrico de 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético 5% (V/V), formando a solução compensação. Após 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 425$ nm). Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado de cada determinação foi calculado de acordo com as fórmulas 4 e 5, a seguir:

$$TF = \frac{A.FD}{\varepsilon.m.(1 - PD)} \quad (4)$$

onde: TF = Teor de flavonóides totais em quercetina expresso em gramas por 100 g de droga seca (%; p/p); A = Absorvância da solução teste; FD = Fator de diluição (125); ε = Absortividade específica da quercetina (500); m = massa de própolis na amostra de extrato testada (g) e PD = Perda por dessecação da própolis (valor absoluto).

$$TF = \frac{A.FD}{\varepsilon.m} \quad (5)$$

onde: TF = Teor de flavonóides totais em quercetina expresso em gramas por 100 g de extrato; A = Absorvância da solução teste; FD = Fator de diluição (125); ε = Absortividade específica da quercetina (500); m = massa de extrato testada.

4.2.2.6 Validação do método de análise dos extratos de própolis por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva de calibração da crisina (padrão grau analítico). Preparou-se uma solução-mãe (SM) em metanol na concentração de 400 µg/mL. Em seguida, foram obtidas as diluições (0,24; 0,4; 0,8; 1,6 e 2,4 µg/ml) em metanol. Estas soluções foram filtradas em membrana de PTFE modificado (0,45 µm) e analisadas por CLAE. Utilizou-se uma coluna RP-18 (Varian® - Chromsep® 5 µm), com dimensões de 250 x 4,6 mm e pré-coluna embutida, e um equipamento de CLAE com duas bombas de injeção de solvente, controle automático de fluxo, detector espectrofotométrico com fotodiodo, sistema de integração e sistema de injeção com loop de 100 µL. O sistema de eluição utilizado foi gradiente, composto por (A) metanol e (B) água:acetonitrila (97,5:2,5), previamente filtrado e desgaseificado em banho de água com ultra-som (Tabela 1). As análises foram realizadas sob fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de 30 ± 0,1 °C e detecção em 310 nm (BRUSCHI et al., 2003b).

Tabela 1 - Sistema de eluição por gradiente utilizado na análise cromatográfica

Sistema	Tempo (min)	0	47	50	58	62
gradiente	metanol : acetonitrila-água (%)	50:50	80:20	100:0	100:0	47:53

Para cada concentração foram realizadas seis determinações. Os resultados foram utilizados para o cálculo da regressão linear e obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação (ICH, 1994).

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados baseando-se no desvio padrão (s) e na inclinação (S) da curva de calibração, de acordo com as seguintes fórmulas (ICH, 1994):

$$LD = \frac{3,3.s}{S} \quad (6)$$

$$LQ = \frac{10.s}{S} \quad (7)$$

A precisão do método foi determinada de acordo com ICH (1994). Na avaliação da repetibilidade, o desvio padrão (s) e o desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de seis determinações foram considerados.

A exatidão foi determinada pela recuperação, adicionando quantidades pré-determinadas do padrão crisina à amostra. O experimento de recuperação foi realizado em triplicata. O resultado foi determinado pela razão do valor encontrado na análise da amostra simulada pela quantidade real adicionada do padrão, multiplicado por 100 (ICH, 1994).

4.2.2.7 Análise dos extratos por CLAE

Os extratos etanólicos preparados com a própolis FEI 97 (EFEI 97) e com a própolis FEI 2002 (EFEI 2002) foram analisados por CLAE. Exatamente 1 mL do extrato etanólico de própolis 30% (p/p) foi extraído, em funil de separação, com aproximadamente 25 mL de acetato de etila, dividido em três frações. Estas foram reunidas e levadas a resíduo seco em banho-maria fervente. O resíduo foi retomado em metanol e completado volume em balão volumétrico de 10,0 mL para a obtenção da solução-mãe (SM). A SM foi filtrada em membrana de PTFE modificado (0,45 μ m). Para injeção no aparelho de CLAE, partiu-se de 50,0 μ L da SM, que foram diluídos, em balão volumétrico de 10,0 mL com metanol.

A amostra foi analisada de acordo com as condições descritas no item 4.2.2.6. Os três principais picos (marcadores) foram quantificados em massa (mg) de crisina por volume (mL) da solução extrativa e em massa de crisina (g) por 100g da droga (própolis) seca (BRUSCHI et al., 2003b).

4.2.3 Preparação e avaliação de micropartículas de gelatina contendo própolis

Foram preparadas micropartículas com os extratos EFEI 97 e EFEI 2002. O extrato etanólico de própolis 30% (p/p) foi disperso em solução de gelatina, sob agitação magnética por 30 min a 25 °C. A quantidade de gelatina utilizada foi determinada em função do valor do resíduo seco (RS) do extrato. Utilizou-se também manitol na proporção de 20% (p/p), em relação à massa teórica total de micropartículas a ser obtida. A dispersão obtida, mantida sob agitação constante, foi nebulizada em um Mini *Spray Dryer* Büchi® modelo B191. As condições experimentais de secagem estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições experimentais de secagem

Parâmetros	Condições
Temperatura de entrada (°C)	160
Temperatura de saída (°C)	108
Proporção Gelatina/RS (p/p)	6/1
Taxa de alimentação (mL/min)	1
Aspiração (% - m ³ /h)	80 - 32
Pressão do ar (bar)	3
Manitol (% , p/p)	20

As micropartículas de gelatina contendo própolis foram coletadas na base do ciclone (coletor) e acondicionadas em frascos âmbar, hermeticamente fechados e mantidos em dessecador provido de sílica.

4.2.3.1 Análise morfológica

A análise morfológica das micropartículas de gelatina contendo própolis foi realizada por microscopia eletrônica de varredura, utilizando um microscópio JEOL[®] modelo JSM T330A. As amostras foram distribuídas sobre uma fita dupla-face aderida a um suporte de metal, revestidas, sob atmosfera de argônio, com ouro coloidal e analisadas.

4.2.3.2 Análise granulométrica

A determinação da distribuição de tamanho das micropartículas foi realizada por captação de imagens, através de microscópio óptico DMRXA (Leica[®]), utilizando o programa Leica[®] Qwin Image Analysis Systems para quantificação.

As micropartículas foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e, para cada campo analisado, foi realizada a distribuição de tamanho das micropartículas, usando como parâmetro para medição o diâmetro segundo Feret (BARBER, 1993). Foram medidas, no mínimo, 1000 partículas e a distribuição de tamanho das mesmas foi determinada.

4.2.3.3 Determinação do teor de encapsulação

O teor de própolis nas micropartículas foi determinado pelo método espectrofotométrico e por CLAE.

O teor foi obtido por espectrofotometria através da determinação do teor de flavonóides totais presente nas micropartículas. Cerca de 3,0 g de micropartículas foram exatamente pesados e quantificados de acordo com o método descrito no item 4.2.2.5. O resultado foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$TF = \frac{A.FD}{\varepsilon.m.(1 - PD)} \quad (8)$$

onde: TF = Teor de flavonóides totais em quercetina expresso em gramas por 100 g de micropartículas secas (% p/p); A = Absorvância da solução teste; FD = Fator de diluição (125); ε = Absortividade específica da quercetina (500); m = massa de micropartículas testada (g); PD = Teor de umidade das micropartículas (valor absoluto).

Pelo método cromatográfico, o teor de encapsulação da própolis foi determinado pela quantificação de seus três principais marcadores (BRUSCHI et al., 2003a). Em balão volumétrico de 25,0 mL, adicionou-se uma amostra de 15 mg de micropartículas de gelatina contendo própolis, exatamente pesados e completou-se o volume com acetonitrila. Em seguida, a amostra foi sonicada por 5 minutos, filtrada através de membrana de PTFE modificada (0,45 μ m) e submetida à análise nas condições descritas no item 4.2.2.6. A determinação foi realizada em triplicata e os três principais picos (marcadores) foram quantificados em massa (g) de crisina em 100g de micropartículas secas (BRUSCHI et al., 2003b).

4.2.3.4 Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada dividindo o teor observado do marcador nas micropartículas de gelatina contendo própolis, pela quantidade teórica do mesmo, multiplicando o resultado por 100 (BRUSCHI, 2002).

4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos de própolis e das micropartículas de gelatina contendo própolis

4.2.4.1 Difusão em agar

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis (EFEI 97 e EFEI2002) e das micropartículas de gelatina contendo própolis (MPEFEI 97 e MPEFEI 2002) foi avaliada frente *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 28366, *Enterococcus faecalis* ATCC 4082, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Lactobacillus casei* ATCC 11578, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, pela técnica de difusão em agar (método do poço) utilizando o sistema de dupla camada de agar, preconizado por Grove e Randall (1955). As cepas de microrganismos foram suspensas em 2,5 mL de meio de cultura estéril *Brain-Heart Infusion* (BHI). A concentração padronizada de cada suspensão de microrganismo foi obtida utilizando-se espectrofotômetro, em comprimento de onda (λ) de 800 nm, atingindo a transmitância de 90, equivalente a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para as suspensões de cepas de *C. albicans*, a transmitância foi ajustada para 80, equivalente a 1,0 na escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL). Foram homogeneamente misturados 12,5 mL de agar BHI (50 °C) e 2,5 mL de suspensão da cepa a ser testada. Essa mistura foi adicionada sobre a camada previamente depositada de 25 mL de agar BHI (placa de Petri 25,0 x 125,0 mm), obtendo-se assim a camada *seed*. Após a solidificação, essa camada *seed* foi perfurada com um cilindro de aço inoxidável esterilizado (4,0mm de diâmetro interno) para formação dos poços, cuja localização ficou cerca de 25 mm da borda e eqüidistantes entre si a uma distância de 40 mm. A seguir, os poços foram preenchidos com os extratos de própolis, micropartículas contendo própolis, álcool etílico (controle negativo) ou solução de gluconato de clorexidina, penicilina, gentamicina ou miconazol (controle positivo). Para a difusão dos agentes através do agar, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por duas horas. A seguir, as mesmas foram incubadas em aerobiose ou microaerofilia (jarra de anaerobiose com sistema Gás-Pack), de acordo com as exigências dos microrganismos indicadores quanto à atmosfera, a 37°C durante 24 e/ou 48 horas. Decorrido o período de incubação, a atividade antimicrobiana foi avaliada pela mensuração do halo de

inibição ao redor do poço, em milímetros, com o auxílio de régua milimetrada. O halo foi medido incluindo o poço e no seu maior diâmetro. O critério de avaliação da susceptibilidade é baseado na presença ou ausência de uma zona de inibição de crescimento bacteriano (halo de inibição) e o tamanho real desse halo (MÖLLER, 1966; KOO et al., 2000). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos (EFEI 97 e EFEI 2002) e das micropartículas de gelatina contendo própolis (MPEFEI 97 e MPEFEI 2002) foi realizada frente à *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 28366, *Enterococcus faecalis* ATCC 4082, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Lactobacillus casei* ATCC 11578, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, por meio da técnica de titulação em microplaca (ANDREWS, 2001). Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, culturas de 24 horas dos microrganismos indicadores, desenvolvidos em agar *Brain Heart Infusion* (BHI) foram transferidas para tubos contendo 10 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB). As suspensões foram padronizadas utilizando-se espectrofotômetro ($\lambda = 800$ nm) para ajustar a transmitância em 90, equivalente a 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para as cepas de *C. albicans*, a transmitância de cada suspensão foi ajustada para 80, equivalente a 1,0 na escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios, foram depositados 100 μ L de TSB, suspensão microbiana e substância a ser testada, de forma a obter-se uma concentração final de 0,078 μ g/mL a 300 μ g/mL. Penicilina ou miconazol foi utilizado como controle positivo. Em um dos orifícios foi feito o controle da cultura, o qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano. Em outro orifício foi feito o controle de esterilidade do caldo TSB. A placa foi selada com filme de PVC e incubada a 37 °C durante 24 e/ou 48 horas. Posteriormente, foram adicionados 30 μ L de solução aquosa de resazurin 0,01% (p/V) em cada orifício com bactérias. A cor vermelha foi interpretada como crescimento positivo e a cor azul como ausência de crescimento. Em cada

orifício contendo fungos, 40 µL de solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio 0,5% (p/V) foram adicionados. Depois de 30 minutos de incubação, a presença de cor vermelha foi interpretada como crescimento positivo. Os resultados foram expressos como CIM, por exemplo a mínima concentração que impediu o crescimento visível de microrganismos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.5 Seleção do extrato de própolis e das micropartículas de gelatina contendo própolis a serem utilizados no desenvolvimento dos sistemas de liberação intrabolsa periodontal

A seleção do extrato e das micropartículas, a serem utilizados no desenvolvimento dos sistemas SLIB, foi baseada nas características físico-químicas e na atividade antimicrobiana apresentadas pelos mesmos. Além disso, as concentrações do extrato e das micropartículas foram calculadas com base nos resultados dos ensaios microbiológicos e em informações de literatura. Foram considerados ainda os teores dos marcadores (CLAE), de flavonóides totais (espectrofotometria) e a eficiência de encapsulação.

4.2.6 Desenvolvimento e caracterização de sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível

Foram preparadas formulações monopoliméricas contendo 10, 15 e 20% (p/p) de P407, utilizando o ‘método a frio’ (SCHMOLKA, 1972), dispersando a quantidade requerida de P407 em água destilada a 5 °C sob leve agitação. Além disso, foram preparadas formulações monopoliméricas contendo 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25% (p/p) de C934P. As dispersões aquosas de C934P foram preparadas pela dispersão da quantidade necessária do mesmo em água, com agitação mecânica contínua, e correção do pH (7,0) com trietanolamina.

Formulações poliméricas binárias também foram preparadas contendo 10, 15 ou 20% (p/p) de P407 com 0,10; 0,15; 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P, através de uma adaptação do ‘método a frio’ descrito por Schmolka (1972). Primeiramente, o C934P foi incorporado paulatinamente em água destilada, sob agitação mecânica constante até a hidratação e dispersão completa do polímero. Incorporou-se o P407 no gel de C934P, deixando a preparação em repouso na geladeira até a hidratação e dispersão completa deste outro polímero. Após 12 horas, a preparação foi submetida à agitação mecânica lenta por 10

minutos, para a completa homogeneização do gel. O pH de cada preparação foi ajustado para 7,0 com trietanolamina. Após o preparo, todas as formulações foram centrifugadas (3000 rpm), para a remoção de bolhas de ar, e armazenadas em geladeira por no mínimo 24 horas antes das análises.

4.2.6.1 Análise reológica de cisalhamento contínuo

Os reogramas de fluxo foram obtidos utilizando um reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlado AR 2000 (T. A. Instruments[®]), no modo de fluxo, nas temperaturas de 5 °C, 25 °C e 37 °C, com geometria de placas paralelas de 40 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 1,0 mm, ou geometria de duplos cilindros concêntricos de tamanho padrão (rotor com raio externo de 21,96 mm e interno de 20,38 mm; estator com raio interno de 20,00 mm; altura do cilindro de 59,50 mm e vão de 0,5 mm), de acordo com a consistência de cada formulação. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior ou dentro do estator do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação. As curvas ascendente e descendente de fluxo foram obtidas com um gradiente de cisalhamento partindo de 10 s⁻¹ a 10000 s⁻¹. O gradiente de cisalhamento foi aumentado durante um período de 150 s, mantido no limite superior por 10 s e, então, diminuído durante um período de 150 s. A seleção da faixa de gradientes de cisalhamento foi realizada de acordo com a consistência de cada formulação (JONES et al., 2001). Em cada caso, as propriedades de cisalhamento contínuo de, no mínimo, cinco replicatas foram determinadas. As curvas ascendentes de fluxo foram analisadas utilizando a equação de Oswald de Waele (Lei da Potência - *Power Law*) (MALKIN, 1994; MARTIN; BUSTAMANTE; CHUN, 1993):

$$\sigma = k\gamma^n \quad (9)$$

onde: σ = Tensão de cisalhamento; k = Índice de consistência; γ = Gradiente de cisalhamento; n = Índice de fluxo.

4.2.6.2 Análise reológica oscilatória

A análise oscilatória foi realizada nas temperaturas de 5 °C, 25 °C e 37 °C, utilizando um reômetro AR 2000 (T. A. Instruments®) no modo oscilatório, com geometria de placas paralelas de 40 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 1,0 mm, ou geometria de duplos cilindros concêntricos de tamanho padrão (rotor com raio externo de 21,96 mm e interno de 20,38 mm; estator com raio interno de 20,00 mm; altura do cilindro de 59,50 mm e vão de 0,5 mm), de acordo com a consistência de cada formulação (JONES et al., 1997a; 2001). Para cada amostra, a Região Viscoelástica Linear (RVL) foi investigada através de um aumento da tensão oscilatória (*torque sweep*) a uma frequência fixa. A RVL foi identificada como a região onde a tensão e a deformação foram diretamente proporcionais e o módulo de estocagem, ou elástico (G'), permaneceu constante. Uma deformação dentro da RVL foi selecionada para subseqüentes análises de varredura de frequência. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior ou dentro do estator do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação. Cinco replicatas, no mínimo, foram analisadas para cada amostra num intervalo de frequência de 0,01 a 10,0 Hz. O módulo elástico (G'), o módulo viscoso ou de perda (G''), a viscosidade dinâmica (η') e a tangente de perda ou viscosa ($\tan \delta$) foram então determinados utilizando o programa *Rheology Advantage* (T.A. Instruments®). Experimentalmente, o primeiro ponto de coleta de dado gerado pelo reômetro a 0,01 Hz está sujeito a artefatos do instrumento e, assim, foi tratado com cautela.

4.2.6.3 Cálculo do parâmetro de interação

A interação entre P407 e C934P nas formulações poliméricas binárias foi determinada através do cálculo do sinergismo reológico (ANDREWS; GORMAN; JONES, 2005; HASSAN; GALLO, 1990). O cálculo do parâmetro de interação para as misturas binárias foi determinado através dos valores do módulo G' na frequência oscilatória de 10,0 Hz:

$$\Delta G' = G'_{\text{mix(P407/C934P)}} - (G'_{\text{P407}} + G'_{\text{C934P}}) \quad (10)$$

4.2.6.4 Determinação da temperatura de gelificação

A temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) das formulações monopoliméricas contendo P407 e das poliméricas binárias foi determinada utilizando um reômetro de tensão e gradiente controlados AR 2000 (T. A. Instruments[®]), no modo oscilatório com rampa de temperatura. A geometria utilizada foi a de placas paralelas de 40 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 1,0 mm, ou geometria de duplos cilindros concêntricos de tamanho padrão (rotor com raio externo de 21,96 mm e interno de 20,38 mm; estator com raio interno de 20,00 mm; altura do cilindro de 59,50 mm e vão de 0,5 mm), de acordo com a consistência de cada formulação (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997a). Cada amostra foi cuidadosamente aplicada à placa inferior ou dentro do estator do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação. Após a determinação da RVL de cada formulação nas temperaturas de 5 °C e 60 °C, a análise de varredura de temperatura foi conduzida através da faixa de 5 °C a 60 °C, com incrementos de temperatura de 10 °C/min, seguindo a aplicação de uma tensão constante e frequência de 1,0 Hz. O módulo elástico (G'), o módulo viscoso ou de perda (G''), a viscosidade dinâmica (η') e a tangente de perda ou viscosa ($\tan \delta$) foram então determinados utilizando o programa *Rheology Advantage* (T.A. Instruments[®]). As análises foram realizadas em, no mínimo, cinco replicatas para cada formulação. A $T_{\text{sol/gel}}$ foi definida como o ponto onde o módulo elástico foi a metade do caminho entre os valores para o estado solução e para o estado gel (CHANG et al., 2002a,b; EDSMAN; CARLFORS; PETERSSON, 1998; RICCI et al., 2002) e foi calculado para as formulações que tiveram aumento significativo da viscosidade dinâmica com o aumento da temperatura (gelificação) (TOSH; MARANGONI, 2004). Cinco replicatas, no mínimo, foram analisadas para cada amostra.

4.2.6.5 Análise do perfil de textura

A análise do perfil de textura (APT) das formulações foi realizada utilizando um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems[®]), conforme Figura 4, no modo de análise de textura como descrito por Jones et al. (1997b) e Muldoon (2002).

Uma quantidade de 16 g de formulação foi colocada em frascos de vidro com tampa de rosca (frasco de McCartney), evitando a introdução de bolhas de ar. No modo APT, uma

prova analítica de polycarbonato (10 mm de diâmetro) foi comprimida duas vezes no interior da amostra, com velocidade de 2 mm/s, profundidade de 15 mm e tempo de 15 s entre o final da primeira e o início da segunda compressão. A análise foi realizada em, no mínimo, cinco replicatas e nas temperaturas de 25 e 37 °C. A partir do gráfico resultante da força versus distância e força versus tempo (Figura 4), a dureza (força necessária para atingir uma dada deformação), a compressibilidade (trabalho necessário para deformar o produto durante a primeira compressão da prova) e a adesividade (o trabalho necessário para superar as forças de atração entre a superfície da amostra e a superfície da prova) foram calculados (BOURNE, 1978; JONES et al, 2000; JONES; LAWLOR; WOOLFSON, 2002; MULDOON, 2002). As análises foram realizadas em, no mínimo, cinco replicatas para cada amostra.

Figura 4. Analisador de textura TA-XTplus e curva típica de análise do perfil de textura (APT): (C) dureza, (A1) compressibilidade e (A2) adesividade.

4.2.6.6 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A força mucoadesiva das formulações poliméricas binárias foi avaliada *in vitro* através da medida da força necessária para remover a formulação a partir de um disco de mucina, utilizando um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems®) no modo de tensão (JONES et al., 1999, 2000), como ilustrado na Figura 5 .

Inicialmente, o disco de mucina foi preparado pela compressão de mucina suína crua (250 mg), utilizando um anel de compressão com um diâmetro de 13 mm e força de

compressão de 10 toneladas, aplicada por 30s. O disco foi fixado horizontalmente na extremidade inferior da prova de APT. Antes do teste de mucoadesão, o disco de mucina foi hidratado pela submersão em uma solução aquosa de mucina 5% (p/p) por um tempo de 30 s. O excesso de líquido na superfície do disco foi removido através de um papel absorvente macio. Na temperatura de 37 °C, uma amostra da formulação, previamente acondicionada em frasco de vidro cilíndrico e raso, foi colocada sobre a prova analítica, a qual foi então abaixada até que o disco de mucina entrasse em contato com a superfície da amostra. Instantaneamente, uma força para baixo de 0,1 N foi aplicada por um tempo definido (30 s) para assegurar o contato íntimo entre a amostra e o disco de mucina. A prova foi então levantada com uma velocidade constante de 1,0 mm/s e a força necessária para remover o disco de mucina da superfície da formulação foi determinada como o valor resultante da curva força pelo tempo. Para todas as formulações, as medidas foram realizadas, no mínimo, em cinco replicatas.

Figura 5. Esquema do teste *in vitro* de mucoadesão (a) e gráfico típico do tempo *versus* força necessária para a remoção do disco de mucina a partir da formulação (b).

4.2.6.7 Determinação da seringueabilidade

O trabalho de seringueamento de cada formulação polimérica binária foi determinado utilizando um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems[®]), no modo de compressão (JONES et al., 1999, 2000; JONES; WOOLFSON; DJOKIC, 1996). Cada formulação foi cuidadosamente adicionada no interior de seringas plásticas de 1,0 mL até alcançar uma altura de 30 mm, evitando a introdução de bolhas de ar. A seringa foi presa verticalmente e a prova abaixada até que o contato inicial com o êmbolo da seringa fosse observado. Com uma velocidade constante de 2.0 mm.s^{-1} e ao longo de uma distância de 30 mm, a prova foi movimentada para baixo (Figura 6).

Figura 6. Desenho do equipamento utilizado na determinação do trabalho de seringueamento.

A resistência à expressão do conteúdo da seringa (trabalho realizado) foi determinada através do cálculo da área sob a curva força versus distância, do gráfico obtido durante a compressão do êmbolo. Todas as medidas foram realizadas a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e, no mínimo, em cinco replicatas.

4.2.6.8 Análise estatística

Os efeitos da concentração polimérica, do tipo de polímero e da temperatura no índice de consistência, no índice de fluxo, nas propriedades viscoelásticas (G' , G'' , η' e $\tan \delta$) em cinco frequências representativas (0,60; 2,55; 5,04; 7,53; 10,0 Hz) foram estatisticamente comparados utilizando Análise de Variância (ANOVA) de três vias. Similarmente, os efeitos das concentrações de P407 e C934P, assim como da temperatura nas propriedades mecânicas de textura foram estatisticamente avaliados através de ANOVA de três vias. Além disso, os efeitos do tipo e concentração de cada componente polimérico na força requerida para superar a ligação adesiva formulação-mucina e no trabalho de seringueamento foram estatisticamente avaliados através de ANOVA de duas vias. Em todos os casos de ANOVA, comparações *post hoc* das médias dos grupos individuais foram realizadas utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey. Teste t para dados emparelhados foi utilizado para determinar se a viscosidade dinâmica das formulações foi significativamente aumentada com o aumento da temperatura (gelificação). Finalmente, comparações estatísticas do módulo elástico obtido para as misturas binárias com o módulo elástico teórico (calculado) foram realizadas utilizando o Teste t para dados não emparelhados. Em todos os casos, um nível de $p < 0,05$ foi aceito para denotar significância (JONES, 2002) e foi utilizado o programa Statview (*Abacus Concepts*, EUA).

4.2.6.9 Preparação e caracterização de sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível com micropartículas contendo própolis

Foram preparadas formulações poliméricas binárias contendo 15% (p/p) de P407 com 0,10 ou 0,25% (p/p) de C934P (Tabela 3), através de uma adaptação do ‘método a frio’ (SCHMOLKA, 1972), como descrito anteriormente. Após o repouso em geladeira por, no mínimo, 24 horas, incorporou-se aos géis, por gotejamento (BRUSCHI et al., 2003a), exatamente 4% (p/p) de extrato etanólico de própolis (EFEI2002), sob agitação magnética por 30 min nas temperaturas de 15, 20 e 25 °C. Após completa homogeneização, as preparações foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e hermeticamente fechados. As preparações foram feitas em triplicatas.

Tabela 3 - Composição dos sistemas semi-sólidos bioadesivos termo-sensíveis (SBTS) contendo micropartículas de própolis

Sistemas	Concentração (% p/p)		
	Poloxamer 407	Carbopol 934P [®]	Extrato de própolis
SBTS-1	15	0,10	4
SBTS-2	15	0,25	4

4.2.6.9.1 Análise morfológica

A análise morfológica das micropartículas de extrato de própolis em cada sistema bioadesivo termo-sensível foi realizada por microscopia óptica por captação de imagens, através de microscópio óptico DMRXA (Leica[®]). Uma amostra foi colocada sobre a lâmina de vidro e as imagens foram capturadas.

4.2.6.9.2 Análise granulométrica

A determinação da distribuição de tamanho das micropartículas em cada sistema bioadesivo termo-sensível foi realizada por captação de imagens, através de microscópio óptico DMRXA (Leica[®]), utilizando o programa Leica[®] Qwin Image Analysis Systems para quantificação. As formulações foram colocadas sobre uma lâmina de vidro e, para cada campo analisado, foi realizada a distribuição de tamanho das micropartículas, usando como parâmetro para medição o diâmetro segundo Feret (BARBER, 1993). Foram medidas 3.500 partículas, no mínimo, e a distribuição de tamanho das mesmas foi determinada.

4.2.6.9.3 Avaliação preliminar da temperatura de gelificação

Os sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis foram submetidos à avaliação preliminar da temperatura de gelificação ($T_{sol/gel}$) de acordo com Choi

et al. (1999). Um béquer graduado de 20 mL, contendo uma barra magnética e 10,0 g de preparação líquida sob baixa temperatura, foi colocado em uma placa termostatzada. Um termômetro foi imerso na preparação a qual foi aquecida continuamente e com agitação constante. Quando a barra magnética parou de movimentar-se devido à gelificação, a temperatura foi determinada como $T_{sol/gel}$. O aquecimento máximo foi de 55 °C. Foram realizadas três determinações para cada preparação.

4.2.6.9.4 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis foi determinada através de picnômetro como descrito no item 4.2.2.2.

4.2.6.9.5 Análise reológica de cisalhamento contínuo

A reometria de cisalhamento contínuo dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis foi realizada como descrito anteriormente no item 4.2.6.1.

4.2.6.9.6 Análise reológica oscilatória

A reometria oscilatória dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis foi realizada de acordo com o descrito no item 4.2.6.2.

4.2.6.9.7 Determinação da temperatura de gelificação

A determinação da temperatura de gelificação ($T_{sol/gel}$) dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis foi realizada através de análises reológicas, como descrito anteriormente no item 4.2.6.4.

4.2.6.9.8 Análise do perfil de textura

A análise do perfil de textura (APT) dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis foi realizada como descrito anteriormente no item 4.2.6.5.

4.2.6.9.9 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A avaliação *in vitro* força mucoadesiva dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis foi realizada de acordo com o descrito no item 4.2.6.6.

4.2.6.9.10 Determinação da seringueabilidade

A determinação do trabalho de seringueamento de cada sistema bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis foi avaliada de acordo com o descrito no item 4.2.6.7.

4.2.6.9.11 Determinação do teor de própolis

O teor de própolis nos sistemas bioadesivos termo-sensíveis foi determinado pelo método espectrofotométrico e por CLAE. Aproximadamente 0,200 g de amostra, exatamente pesados, submetidos à extração com acetato de etila como descrito no item 4.2.2.5, obtendo-se a solução de análise.

Por espectrofotometria, o teor foi obtido pela determinação do teor de flavonóides totais. Retirou-se uma alíquota de 10,0 mL da solução de análise, adicionou-se 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (p/V) e completou-se o volume para 25 mL em balão volumétrico com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V). Ao mesmo tempo, 10,0 mL da fração de acetato de etila foram diluídos em balão volumétrico de 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V), formando a solução compensação. Após 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 425 \text{ nm}$). O resultado foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$TF = \frac{A.FD}{\varepsilon.m} \quad (11)$$

onde: TF = Teor de flavonóides totais em quercetina expresso em gramas por 100 g de preparação (%; p/p); A = Absorvância da solução teste; FD = Fator de diluição (125); ε = Absortividade específica da quercetina (500); m = massa de preparação testada (g).

Pelo método cromatográfico, o teor de própolis nas preparações foi determinado pela quantificação de seus três principais marcadores (BRUSCHI et al., 2003b). Toda a solução de análise obtida foi levada a resíduo seco em banho-maria. O resíduo foi retomado em metanol e completado volume em balão volumétrico de 10,0 mL para a obtenção da solução-mãe (SM), a qual foi submetida a análise cromatográfica como descrito no item 4.2.2.7. Os três principais picos (marcadores) foram quantificados em massa (g) de crisina em 100g de preparação.

4.2.6.9.12 Análise estatística

Os efeitos da concentração polimérica, da presença de micropartículas de própolis e da temperatura no índice de consistência, no índice de fluxo, nas propriedades viscoelásticas (G' , G'' , η' e $\tan \delta$) em cinco frequências representativas (0,60; 2,55; 5,04; 7,53; 10,0 Hz) foram estatisticamente comparados utilizando ANOVA de três vias. Similarmente, os efeitos das concentrações dos polímeros, da presença de micropartículas de própolis e da temperatura nas propriedades mecânicas de textura foram estatisticamente avaliados através de ANOVA de três vias. Além disso, os efeitos das concentrações de P407 e C934P, assim como da presença de micropartículas de própolis, na força requerida para superar a ligação adesiva formulação-mucina e no trabalho de seringueamento foram estatisticamente avaliados através de ANOVA de duas vias. Em todos os casos de ANOVA, comparações *post hoc* das médias dos grupos individuais foram realizadas utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey. Finalmente, Teste t para dados emparelhados foi utilizado para determinar se a viscosidade dinâmica das formulações foi significativamente aumentada com o aumento da temperatura (gelificação). Em todos os casos, um nível de $p < 0,05$ foi aceito para denotar significância (JONES, 2002) e foi utilizado o programa Statview (*Abacus Concepts*, EUA).

4.2.7 Desenvolvimento e caracterização de sistema precursor de fase cristalina líquida

No desenvolvimento do sistema precursor de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis (PFCL), foram preparadas fórmulas partindo-se do tensoativo, o álcool cetílico etoxilado 20-OE e propoxilado 5-OP (ACEP), miristato de isopropila (MI) e água destilada (Tabela 4).

Tabela 4 - Fórmulas de sistema precursor de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis

Fórmula	Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (% p/p)	Miristato de isopropila (% p/p)	Água destilada (% p/p)
PFCL-1	90	10	0
PFCL-2	90	5	5
PFCL-3	85	10	5
PFCL-4	85	5	10
PFCL-5	80	10	10
PFCL-6	80	15	5

Para cada uma, pesou-se o ACEP, MI e a água. A mistura foi submetida ao aquecimento, à temperatura de 50-60°C, e agitação magnética lenta, com o objetivo de assegurar completa homogeneização do sistema. Após resfriamento e completa homogeneização, incorporou-se 6,41% (p/p) de micropartículas de gelatina contendo própolis, sob agitação magnética constante até completa homogeneização. Cada formulação foi acondicionada em frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado.

4.2.7.1 Determinação das características de sedimentação

Para o estudo de sedimentação dos sistemas PFCL, o volume de sedimentação foi determinado em função do tempo de acordo com a seguinte fórmula (MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993):

$$F = V_s/V_t \quad (12)$$

onde: F é o volume de sedimentação; V_s é o volume do sedimento formado; V_t é o volume total testado da suspensão.

A preparação foi agitada e um volume de 5 mL foi decantado em um cilindro de 7,5 mL com um diâmetro de 1,0 cm. O volume de sedimentação foi determinado após 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 168 horas.

A capacidade de redispersão das preparações foi determinada através de agitação manual do cilindro com movimentos de 180°, após 168 horas. A formulação foi avaliada com base no número de movimentos requeridos para converter o sedimento em uma suspensão uniformemente dispersa (PATEL; KENNON; LEVINSON, 2001). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.7.2 Análise morfológica

As preparações foram avaliadas quanto à homogeneidade de dispersão e morfologia das micropartículas no sistema por captação de imagens, através de microscópio óptico DMRXA (Leica®). Uma amostra foi colocada sobre a lâmina de vidro e as imagens foram capturadas.

4.2.7.3 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa das formulações PFCL foi determinada através de picnômetro como descrito no item 4.2.2.2. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.7.4 Análise reológica de cisalhamento contínuo

Reogramas de fluxo das formulações PFCL, e da formulação-base correspondente, foram obtidos utilizando um reômetro de gradiente e tensão de cisalhamento controlado AR 2000, no modo de fluxo, nas temperaturas de 25 °C e 37 °C, com geometria de placas

paralelas de 40 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 1,0 mm, ou geometria de duplos cilindros concêntricos de tamanho padrão (rotor com raio externo de 21,96 mm e interno de 20,38 mm; estator com raio interno de 20,00 mm; altura do cilindro de 59,50 mm e vão de 0,5 mm), de acordo com a consistência de cada formulação. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior ou dentro do estator do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação. As curvas ascendente e descendente de fluxo foram obtidas com um gradiente de cisalhamento partindo de 10 s^{-1} a 2000 s^{-1} . O gradiente de cisalhamento foi aumentado durante um período de 150 s, mantido no limite superior por 10 s e, então, diminuído durante um período de 150 s. Em cada caso, as propriedades de cisalhamento contínuo de, no mínimo, cinco replicatas foram determinadas. As curvas ascendentes de fluxo foram analisadas utilizando a equação de Oswald-de-Waele (Lei da Potência – *Power Law*), como descrito anteriormente no item 4.2.6.1.

4.2.7.5 Análise reológica oscilatória

A reometria oscilatória foi realizada nas temperaturas de 25 °C e 37 °C., utilizando um reômetro AR 2000 no modo oscilatório, com geometria de placas paralelas de 40 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 1,0 mm, ou geometria de duplos cilindros concêntricos de tamanho padrão (rotor com raio externo de 21,96 mm e interno de 20,38 mm; estator com raio interno de 20,00 mm; altura do cilindro de 59,50 mm e vão de 0,5 mm), de acordo com a consistência de cada formulação. Para cada amostra, a Região Viscoelástica Linear (RVL) foi investigada através de um aumento da tensão oscilatória (*torque sweep*) a uma frequência fixa. A RVL foi identificada como a região onde a tensão e a deformação foram diretamente proporcionais e o módulo de estocagem, ou elástico (G'), permaneceu constante. Uma deformação dentro da RVL foi selecionada para subseqüentes análises de varredura de frequência. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior ou dentro do estator do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 5 minutos antes de cada determinação. Cinco replicatas, no mínimo, foram analisadas para cada amostra num intervalo de frequência de 0,01 a 10,0 Hz, como descrito anteriormente no item 4.2.6.2.

4.2.7.6 Análise do perfil de textura

A análise do perfil de textura (APT) das formulações foi realizada como descrito anteriormente no item 4.2.6.5. Todas as análises foram realizadas em, no mínimo, cinco replicatas e nas temperaturas de 25 e 37 °C.

4.2.7.7 Determinação da seringueabilidade

O trabalho de seringueamento de cada formulação PFCL foi determinado como descrito anteriormente no item 4.2.6.7. Todas as medidas foram realizadas a 25 °C e, no mínimo, em cinco replicatas.

4.2.7.8 Determinação do teor de própolis

O teor de própolis nas preparações PFCL contendo micropartículas foi determinado pelo método espectrofotométrico e por CLAE, de acordo com o item 4.2.7.11.

4.2.7.9 Análise estatística

Os efeitos da concentração de ACEP e de MI, da presença de micropartículas e da temperatura no índice consistência, no índice de fluxo, nas propriedades viscoelásticas (G' , G'' , $\tan \delta$, η') em cinco frequências representativas (0,60; 2,55; 5,04; 7,53 e 10,0 Hz) foram estatisticamente comparados utilizando ANOVA de três vias. Similarmente, os efeitos da concentração de ACEP e MI, da presença de micropartículas de própolis e da temperatura nas propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade e adesividade) foram estatisticamente avaliados utilizando ANOVA de três vias. Além disso, os efeitos da concentração de ACEP e MI e da presença de micropartículas de própolis no trabalho de seringueamento foram estatisticamente avaliados utilizando ANOVA de duas vias. Em todos os casos de ANOVA, comparações *post hoc* das médias dos grupos individuais foram realizadas utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey. Para todas as análises, um nível de

significância $p < 0.05$ foi aceito (JONES, 2002) e foi utilizado o programa Statview (*Abacus Concepts*, EUA).

4.2.8 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da própolis a partir das preparações

O perfil de liberação do extrato de própolis e das micropartículas de gelatina contendo própolis foi determinado em aparelho de dissolução (Sotax[®] AT-7) usando uma cesta modificada como suporte para a amostra (Figura 7) (BRUSCHI, 2002; BRUSCHI et al., 2004; LUCINDA, 1999). A cesta consiste de um frasco sem fundo com 27 mm de diâmetro interno. A parte superior está acoplada a haste de suporte que auxilia na agitação e conecta a cesta com a estação de dissolução. O fundo do frasco foi coberto com uma membrana de acetato de celulose.

Figura 7. Aparato utilizado como suporte e para agitação do meio de dissolução: (1) frasco sem fundo; (2) amostra; (3) membrana de acetato de celulose; (4) suporte.

Em um estudo preliminar, o extrato de própolis EFEI2002 foi avaliado utilizando-se 3,0 mL de uma dispersão aquosa do mesmo 4% (V/V). O meio de dissolução utilizado foi 150 mL de água destilada, que garantiu condição *sink* (BRUSCHI, 2002; BRUSCHI et al., 2004), à temperatura de $37 \pm 0,5$ °C e aplicada uma rotação de 100 rpm. O tempo de ensaio foi de 8 h, com tempos de amostragens (2,0 mL) em 30, 60, 120, 180, 240, 360 e 480 minutos, sem reposição de volume. Na determinação do perfil de liberação das micropartículas de gelatina contendo própolis (MPEFEI 2002), cerca de 300 mg, quantidade equivalente em extrato aos 3 mL da dispersão aquosa 4% (V/V), foram exatamente pesados, colocados no frasco com 10,0 mL de água destilada e submetidos às mesmas condições de determinação utilizadas para o extrato.

O estudo do perfil de liberação da própolis a partir dos sistemas PFCL-2, PFCL-3, SBTS-1 e SBTS-2 foi realizado em um aparelho de liberação simulador de bolsa periodontal, adaptado de Gabarra (2002) (Figura 8).

Figura 8. Dispositivo mimetizador de bolsa periodontal para estudo do perfil de liberação *in vitro* de fármacos a partir de sistemas semi-sólidos SLIB: (1) preenchimento com a amostra; (2) parte inferior da célula de liberação; (3) parte superior (posição invertida) da célula de liberação; (4) célula de liberação fechada; (5) microcomputador controlador do fluxo; (6) motor de passo que controla o deslocamento do êmbolo da seringa; (7) seringa com saliva artificial; (8) banho termostático; (9) frasco coletor; (10) suporte do frasco coletor.

O aparelho consiste de quatro células de fluxo em acrílico, de formato retangular, para estudo de semi-sólidos, com capacidade para um volume total de 1,0 mL e com controle de temperatura, através de banho termostático. O controle de fluxo do meio de liberação é realizado através de um programa de microcomputador que comanda o deslocamento do êmbolo de uma seringa, através de um motor de passo. O meio de dissolução com o material liberado é coletado em um frasco de 2,0 mL fixado em um suporte isolante térmico (isopor), conectado à saída da célula de liberação.

Exatamente 500 μ L de amostra foram colocados no interior da célula, a qual foi fechada e conectada ao aparelho. O sistema foi isolado com filme de PVC, protegido da luz e deixado em repouso por 10 minutos para atingir a temperatura de $37 \pm 0,5$ °C. Após esse

intervalo de tempo, foi programado um fluxo de saliva artificial (Quadro 8) de $0,9 \pm 0,05$ $\mu\text{L}/\text{min}$. O tempo total do ensaio foi de 7 dias, com tempos de amostragens (1,3 mL) em 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Também foi avaliado o perfil de liberação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com extrato de própolis não-microencapsulado.

Fosfato de potássio dibásico.....	4,010 g
Fosfato de potássio monobásico.....	1,813 g
Sorbitol 70%.....	213,500 g
Cloreto de potássio.....	3,125 g
Cloreto de sódio.....	4,325 g
Cloreto de magnésio hexahidratado.....	0,625 g
Cloreto de cálcio dihidratado.....	0,360 g
Metilparabeno.....	9,000 g
Hidroxietilcelulose 4400	1,250 g
Água destilada..... q.s.p.	5000,0 mL

Quadro 8. Fórmula da saliva artificial utilizada no estudo do perfil de liberação in vitro dos sistemas de liberação intrabolsa (NAKAMOTO, 1979).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a própolis liberada da formulação, em cada intervalo de tempo, foi quantificada em relação ao teor de flavonóides totais. Em funil de separação foram adicionados 1,0 mL de água destilada e 1,0 mL de acetona à alíquota coletada. Esta mistura foi extraída três vezes com 1,5 mL de acetato de etila. As fases de acetato de etila foram reunidas, a fração acetato foi filtrada para um balão volumétrico de 5,0 mL, através de algodão e sulfato de sódio anidro e completou-se o volume (FA). Retirou-se uma alíquota de 2,0 mL da FA, adicionou-se 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (p/V) e completou-se o volume para 10,0 mL em balão volumétrico com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V). Ao mesmo tempo, outros 2,0 mL de FA foram diluídos em balão volumétrico de 10,0 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V), formando a solução compensação. Após 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 425$ nm) e o resultado de cada determinação foi calculado de acordo com a fórmula a seguir:

$$TF = \frac{AFD}{\varepsilon \cdot 100} \quad (13)$$

onde: TF = Teor de flavonóides totais em quercetina (g) contido na amostra; A = Absorvância da solução teste; FD = Fator de diluição (25); ε = Absortividade específica da quercetina (500).

Os resultados foram analisados em termos do teor absoluto e acumulado de flavonóides totais liberados em cada intervalo de tempo, considerando o teor real de extrato de própolis presente na formulação.

Para investigar o mecanismo de liberação de própolis a partir dos sistemas, os dados obtidos foram analisados através da equação geral que descreve a liberação de fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais (KORSMEYER et al., 1983), utilizando transformações logarítmicas e análise dos mínimos quadrados (regressão linear) como descrito abaixo:

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = k \cdot t^n \quad (14)$$

$$\log \frac{Mt}{M_{\infty}} = \log k + n \log t \quad (15)$$

onde: M_t / M_{∞} é a fração de fármaco liberado, t é o tempo de liberação, K é a constante cinética de incorporação de características estruturais e geométricas do dispositivo de liberação e n é o expoente o qual pode indicar o mecanismo de liberação do fármaco (JONES et al., 2000).

Os efeitos da diferença de concentração P407/C934P no tempo requerido para a liberação de percentagens definidas da massa original de própolis (10, 30 e 50%) a partir dos sistemas SBTS foram avaliados estatisticamente usando ANOVA de uma via. Similarmente, os efeitos da proporção de ACEP/MI no tempo requerido para a liberação de percentagens definidas da massa original de própolis (10, 30 e 50%) a partir dos sistemas PFCL foram avaliados estatisticamente usando ANOVA de uma via. Finalmente, foi realizada comparação estatística dos tempos requeridos para liberar 10, 30 ou 50% do teor original de própolis em cada sistema utilizando o Teste-t para dados não-emparelhados. Nos dois casos, comparações post hoc das médias dos grupos individuais foram realizadas utilizando o teste da Diferença Honestamente Significante de Tukey. Em todos os casos, um nível de significância $p < 0.05$ foi aceito (JONES, 2002) e foi utilizado o programa Statview (Abacus Concepts, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação das própolis e de seus extratos

As amostras de própolis foram coletadas numa região de vegetação variada, predominado pinheiros (*Pinus* sp. e *Araucaria heterophylla*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.), além de espécies do cerrado como o alecrim do campo ou vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*). Assim, as mesmas apresentaram odor aromático e sabor picante, com aspecto de gomo-resina ligante e de coloração verde escuro, características marcantes nas própolis produzidas na região tropical do Brasil, como o norte do estado do Paraná, São Paulo e Minas Gerais (ABELHAS, 2002; KÖNIG, 1985; NEGRI et al., 2000; PAMPLONA, 1997; PARK et al., 2002).

Na avaliação da droga foram utilizados métodos analíticos físico-químicos, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas das amostras de própolis

Parâmetros	FEI 97			FEI 2002			n
	Média	s	CV%	Média	s	CV%	
Perda por dessecação (% p/p)	9,30	0,0764	0,82	7,97	0,1931	2,42	3
Teor de cinzas totais (% p/p)	3,29	0,1457	4,42	3,21	0,0586	1,83	3
Teor de ceras (% p/p)	22,91	0,1861	0,81	30,03	0,5479	1,82	3
Teor de extrativos em água (% p/p)	5,17	0,016	0,31	5,51	0,1339	2,43	3
Teor de extrativos em etanol (% p/p)	7,68	0,2789	3,63	9,05	0,3970	4,39	3
Teor de flavonóides totais (% p/p)	2,36	0,0003	0,01	3,20	0,0136	0,43	3

s = desvio padrão CV% = coeficiente de variação n = número de análises

A determinação da perda por dessecação, que avalia o grau de umidade da droga, embora seja conhecido que o aquecimento possa promover a liberação de substâncias voláteis presentes (BRUSCHI, 2002), demonstrou certa variação, porém, dentro do limite admitido de 15% (BRUSCHI et al., 2002). Além disso, amostras coletadas no inverno e das partes mais externas da colméia normalmente apresentaram maior perda por dessecação (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000). Os valores obtidos indicam que as amostras de própolis foram provavelmente coletadas dos locais mais internos das colméias (caixilho, por exemplo) e bem acondicionadas. Além disso, a diferença de ano e de época de coleta entre as amostras pode ter favorecido a presença de um maior teor de umidade na amostra FEI 97.

Os teores de cinzas totais obtidos para FEI 97 e FEI 2002 (3,29 e 3,21%, respectivamente) estão de acordo com o perfil específico encontrado por Franco et al. (2000) e por Bruschi et al. (2002) para outras amostras de mesma origem, evitando possíveis adulterações.

É necessário que a análise do teor de ceras da própolis seja feita para cada amostra como controle de qualidade obrigatório, em função da possibilidade da diminuição do teor de substâncias ativas (BRUSCHI, 2002). A faixa normalmente encontrada para o teor de ceras é de 10 a 35% (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000; VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRE, 1979). Dessa forma, o resultado da determinação do teor de ceras nas amostras analisadas (Tabela 5) foi baixo, contribuindo para um bom teor de substâncias ativas. A amostra FEI 2002 apresentou um maior teor de ceras que a amostra FEI 97, apresentando uma cor mais amarelada.

Os resultados da determinação do teor de extrativos para FEI 97 e FEI 2002 utilizando-se etanol 96 °GL foram aproximadamente 50% maiores que utilizando água, característica importante no controle de qualidade da própolis (BRUSCHI et al., 2002; CUNHA et al., 2004).

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância na própolis (BANKOVA; CHRISTOV; POPOV, 1994; BURDOCK, 1998; KOSALEC et al., 2005), sendo utilizados como marcadores na mesma (MARCUCCI et al., 1994). Na quantificação das drogas FEI 97 e FEI 2002, os resultados obtidos (2,36% e 3,20%, respectivamente) demonstraram teores de flavonóides adequados, estando dentro dos limites normalmente encontrados de 1 a 8,5% (BURDOCK, 1998; FRANCO, 2001; FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000; KOSALEC et al., 2004; VANHAELEN; VANHAELEN-FASTRE, 1979).

Os resultados encontrados na análise dos extratos de própolis EFEI 97 e EFEI 2002 estão apresentados na Tabela 6.

O pH dos extratos, que está diretamente relacionado com o pH do etanol, das substâncias fenólicas, dos derivados do álcool cinâmico, de substâncias nitrogenadas como os aminoácidos, entre outras substâncias extraídas da própolis (BRUSCHI et al., 2002; FRANCO; BUENO, 1999), foram compatíveis com o pH dos fluidos do corpo humano e, portanto, com a utilização clínica dos mesmos.

Os resultados obtidos para a determinação da densidade relativa e para o resíduo seco dos extratos estão de acordo com os valores normalmente obtidos (BRUSCHI et al., 2002). Além disso, os teores alcoólicos observados para EFEI 97 e EFEI 2002 (81,67 e 83,33%,

respectivamente) foram inferiores ao do líquido extrator utilizado, resultado da presença de umidade residual da droga e perda de solvente devida à evaporação durante o processo extrativo, mesmo com os cuidados tomados com temperatura e vedação dos recipientes.

Tabela 6 – Resultados das análises físico-químicas dos extratos de própolis

Parâmetros	EFEI 97	EFEI 2002		
	Resultado (média ± s)	CV (%)	Resultado (média ± s)	CV (%)
pH (n = 3)	5,28	-	5,10	-
Densidade relativa (n = 3)	0,8595 ± 0,0007	0,08	0,8623 ± 0,0003	0,04
Resíduo seco (% p/p) (n = 3)	17,57 ± 0,1562	0,89	18,32 ± 0,4134	2,26
Teor alcoólico (% V/V) (n = 3)	81,67 ± 2,8868	3,53	83,33 ± 2,8868	3,46
Teor de flavonóides totais (n=3)	1,83 ± 0,0170	0,93	2,53 ± 0,0350	1,38
(%, p/p) droga seca				
Teor de flavonóides totais (n=3)	0,50 ± 0,0046	0,93	0,70 ± 0,0096	1,38
(%, p/p) extrato				

s = desvio padrão CV% = coeficiente de variação n = número de aliquotas testadas

As análises dos extratos EFEI 97 e EFEI 2002 demonstraram, ainda, a semelhança em teor de flavonóides destes com de outros estudos utilizando a mesma técnica de extração (BRUSCHI et al., 2002; CARMO, 1999; FRANCO; BUENO, 1999; FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000;). O método de turboextração proporcionou um bom rendimento na extração de flavonóides, sendo de 77,54% para o extrato EFEI 97 e de 79,06% para o extrato EFEI 2002.

Na análise dos extratos por CLAE, o procedimento analítico foi validado de acordo com as normas descritas pela *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH, 1994). A validação de um método analítico pode ser definida como um processo formal, com o objetivo de se obter documentação e análise de dados, os quais permitem tanto descrever de forma detalhada o método, assim como identificar e controlar os fatores de variação (WOOD, 1999). Na análise de matrizes biológicas complexas, como o extrato de própolis, o tipo de método e seu respectivo uso determinam quais parâmetros devem ser avaliados (DE SOUZA et al., 2002).

O rigor na avaliação dos resultados e no estabelecimento dos limites de confiança depende da complexidade do método, precisão e sensibilidade dos instrumentos, composição e homogeneidade das amostras e exigências analíticas incidentes. De modo geral, quanto menor o número de etapas que constituem o método e quanto maiores a homogeneidade e uniformidade de composição do material analisado, menor será o erro inerente acumulado e, conseqüentemente, o rigor maior fica justificado (DE SOUZA, 1997; WOOD, 1999).

As características de validação as quais devem ser consideradas são a exatidão, a precisão (repetibilidade e precisão intermediária), a especificidade, o limite de detecção, o limite de quantificação, a linearidade e a variação (ICH, 1994). A linearidade do método de quantificação do extrato de própolis por CLAE foi determinada analisando-se a crisina, que apresentou tempo de retenção de 29 minutos (Figura 9).

Figura 9. Perfil cromatográfico da crisina (padrão), obtido por CLAE em 310 nm.

Investigou-se a crisina em cinco níveis de concentração linear (0,24 – 2,4 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 10).

Figura 10. Curva de calibração da crisina, obtida por CLAE em 310 nm ($n = 6$).

A equação linear representativa foi $Y = 160362,5802 X - 36330,6206$ ($r^2 = 0,9957$) e o desvio padrão relativo da inclinação foi de 0,38%.

O LD, dado como a menor concentração absoluta da substância na amostra a qual pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada de uma maneira exata sob as condições experimentais determinadas, foi de 0,1689 µg/mL. A menor quantidade de crisina na amostra a qual pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão (LQ), sob as condições experimentais estabelecidas, foi de 0,5117 µg/mL.

A seletividade do método foi avaliada através da análise dos cromatogramas dos extratos de própolis 30% (p/p) (Figura 11).

O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação percentual para as concentrações de crisina analisadas (Tabela 7) demonstraram reprodutibilidade.

Figura 11. Cromatogramas obtidos para os extratos de própolis (a) EFEI 97 e (b) EFEI 2002.

A amostra preparada contendo uma quantidade conhecida de crisina determinou a exatidão do método através dos ensaios de recuperação. A recuperação da crisina adicionada foi de $101,68 \pm 1,11\%$. Este resultado é referente à média de três determinações e está de acordo com os valores de referência de 80 – 120% (ICH, 1994).

Tabela 7 – Desvio padrão relativo (coeficiente de variação percentual) das concentrações de crisina analisadas

Crisina ($\mu\text{g/mL}$)	0,24	0,4	0,8	1,6	2,4
CV%	3,12%	1,31%	3,86%	1,24%	4,83%

Os cromatogramas obtidos para os extratos de própolis 30% (p/p) (Figura 11) apresentaram uma boa resolução dos picos, indicando que o método utilizado (BRUSCHI et al., 2003b) pode ser aplicado na quantificação e controle dos mesmos.

Os resultados obtidos na quantificação dos extratos de própolis estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da quantificação do extrato de própolis por CLAE

Extratos	Marcador	Teor de flavonóides em crisina (g) por volume (mL) do extrato			Teor de flavonóides em crisina (g) por 100 g de droga seca		
		Média	<i>s</i>	CV (%)	Média	<i>s</i>	CV%
EFEI 97	M1	0,0023	0,0000354	1,53	0,9877	0,0152	1,53
	M2	0,0023	0,0000355	1,52	0,9951	0,0152	1,52
	M3	0,0176	0,000183	1,04	7,5416	0,0783	1,04
EFEI 2002	M1	0,0023	0,000102	4,40	0,9745	0,0428	4,40
	M2	0,0022	0,000087	3,95	0,9259	0,03666	3,95
	M3	0,0175	0,000934	5,34	7,3543	0,3929	5,34

A repetibilidade das análises por CLAE dos extratos foi demonstrada com o desvio padrão relativo variando de 1,04 – 5,34%. Estes resultados podem ser considerados satisfatórios uma vez que a maioria das substâncias de origem vegetal apresenta uma faixa de 3 – 6% (ANDLAUER et al., 1999).

5.2 Preparação e avaliação de micropartículas de gelatina contendo própolis

As micropartículas produzidas utilizando-se os extratos EFEI 97 (MPEFEI 97) e EFEI 2002 (MPEFEI 2002) apresentaram teor de umidade de $7,32 \pm 0,18\%$ e $5,81 \pm 0,23\%$, respectivamente.

A análise morfológica das mesmas foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura. As micropartículas MPEFEI 97 e MPEFEI 2002 mostraram-se esféricas e com uma superfície lisa e uniforme (Figura 12). Observou-se um baixo número de micropartículas com depressões na superfície e pouca aglomeração. Estes resultados estão de acordo com os observados por Bruschi et al. (2003a).

Figura 12. Micrografias de micropartículas de gelatina contendo própolis obtidas por *spray-drying* com extrato: (a) EFEI 97 e (b) EFEI 2002.

Neste trabalho, a análise de distribuição de tamanho de partículas foi realizada, determinando-se o tamanho das partículas por microscopia óptica, usando-se, como parâmetro, a medida do diâmetro segundo Feret (valor médio da distância entre linhas paralelas tangentes ao perfil da partícula e perpendicular à escala ocular) (BARBER, 1993).

A Tabela 9 e a Figura 13 apresentam a distribuição de tamanho das micropartículas MPEFEI 97.

Tabela 9 – Distribuição de tamanho das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis EFEI 97 (MPEFEI 97)

Classe (μm)	Ponto Médio (μm)	Frequência	Frequência Relativa (%)
$0,0 < X \leq 1,0$	0,5	36	3,10
$1,0 < X \leq 2,0$	1,5	531	45,74
$2,0 < X \leq 3,0$	2,5	373	32,13
$3,0 < X \leq 4,0$	3,5	143	12,32
$4,0 < X \leq 5,0$	4,5	53	4,57

continua

conclusão

Classe (μm)	Ponto Médio (μm)	Frequência	Frequência Relativa (%)
$5,0 < X \leq 6,0$	5,5	14	1,21
$6,0 < X \leq 7,0$	6,5	8	0,69
$7,0 < X \leq 8,0$	7,5	3	0,26
Total		1161	100

O diâmetro médio das micropartículas foi de $2,27 \pm 1,02 \mu\text{m}$, apresentando uma pequena variação de tamanho, indo de pouco menos que $1 \mu\text{m}$ a $7,36 \mu\text{m}$, sendo que quase 46% das partículas apresentam tamanho entre 1 e $2 \mu\text{m}$.

Figura 13. Distribuição de tamanho das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis FEI 97 (MPEFEI 97): (■) histograma dos intervalos de classe e (—●—) representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas.

A Tabela 10 e a Figura 14 apresentam a distribuição de tamanho das micropartículas MPEFEI 2002.

Tabela 10 – Distribuição de tamanho das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis EFEI 2002 (MPEFEI 2002)

Classe (μm)	Ponto Médio (μm)	Frequência	Frequência Relativa (%)
$0,0 < X \leq 1,0$	0,5	8	0,72
$1,0 < X \leq 2,0$	1,5	314	28,26
$2,0 < X \leq 3,0$	2,5	575	51,76
$3,0 < X \leq 4,0$	3,5	164	14,76
$4,0 < X \leq 5,0$	4,5	35	3,15
$5,0 < X \leq 6,0$	5,5	11	0,99
$6,0 < X \leq 7,0$	6,5	2	0,18
$7,0 < X \leq 8,0$	7,5	1	0,09
$8,0 < X \leq 9,0$	8,5	1	0,09
Total		1111	100

Observou-se uma distribuição de tamanho ligeiramente maior que aquela obtida para as MPEFEI 97 (Tabela 9), indo de 0,15 μm a 8 μm . O diâmetro médio das partículas foi de $2,48 \pm 0,81 \mu\text{m}$, e cerca de 50% das partículas apresentaram tamanho entre 2 e 3 μm .

Estes resultados estão de acordo com a microscopia eletrônica de varredura (Figura 14) e com os resultados obtidos por Bruschi et al. (2003a), confirmando que as partículas obtidas possuem tamanho da ordem de micrômetros.

Figura 14. Distribuição de tamanho das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis FEI 2002 (MPEFEI 2002): (■) histograma dos intervalos de classe e (—●—) representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas.

Os teores de encapsulação das micropartículas MPEFEI 97 e MPEFEI 2002 estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Teor de encapsulação do extrato de própolis nas micropartículas de gelatina

Preparações	Teor de encapsulação (média ± s)			
	Método cromatográfico (CLAE)*			Método espectrofotométrico**
	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	
MPEFEI 97	0,0472 ± 0,0009	0,1184 ± 0,0070	0,9057 ± 0,0121	0,2393 ± 0,0058
MPEFEI 2002	0,0544 ± 0,0010	0,0982 ± 0,0013	0,5294 ± 0,0159	0,3760 ± 0,0162

*massa de crisina (g) por 100g de micropartículas secas **massa de quercetina (g) por 100 g de micropartículas secas

A eficiência de encapsulação para as micropartículas esta apresentada na Tabela 12.

Tabela 12 – Eficiência de encapsulação do extrato de própolis nas micropartículas de gelatina

Preparação	Eficiência de encapsulação (%)			
	Método cromatográfico (CLAE)			Método espectrofotométrico
	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	
MPEFEI 97	27,03	67,23	67,85	73,90
MPEFEI 2002	32,46	61,67	41,87	86,44

5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos de própolis e das micropartículas de gelatina contendo própolis

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e das micropartículas foi realizada através de duas técnicas distintas: (i) difusão em agar (DA) e (ii) concentração inibitória mínima (CIM).

As cepas testadas são de microrganismos provenientes de infecções em várias partes do organismo humano (*Candida albicans* ATCC 10231, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e de infecções orais (*Candida albicans* ATCC 28366, *Enterococcus faecalis* ATCC 4082, *Lactobacillus casei* ATCC 11578, *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478). Os resultados obtidos pela técnica de DA estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Diâmetro médio (mm) dos halos de inibição de crescimento microbiano (média $\pm$ s) produzidos pelos extratos de própolis, pelas micropartículas de gelatina contendo própolis e pelos controles positivo e negativo (álcool etílico), através da técnica de difusão em agar (n = 3)

Microrganismos	Extratos		Micropartículas		Controle positivo	Etanol
	FEI 97	FEI 2002	FEI 97	FEI 2002		
<i>C. albicans</i> ATCC10231	12,33 $\pm$ 0,58	11,67 $\pm$ 0,58	0	0	28,67 $\pm$ 0,58 (MC)	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 10541	11,68 $\pm$ 0,58	11,33 $\pm$ 0,58	0	0	16,68 $\pm$ 0,58 (PN)	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10,00 $\pm$ 1,00	9,00 $\pm$ 1,00	0	0	17,00 $\pm$ 2,65 (GN)	0
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	14,68 $\pm$ 1,53	13,33 $\pm$ 1,53	0	0	49,68 $\pm$ 1,53 (PN)	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11,00 $\pm$ 0,00	10,67 $\pm$ 0,58	0	0	18,68 $\pm$ 0,58 (GN)	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16,33 $\pm$ 0,58	16,00 $\pm$ 1,00	0	0	33,68 $\pm$ 0,58 (PN)	0
<i>E. faecalis</i> ATCC 4082	13,67 $\pm$ 1,53	13,00 $\pm$ 0,00	0	0	14,33 $\pm$ 0,58 (CL)	0
<i>E. salivarius</i> ATCC 25975	16,33 $\pm$ 0,58	12,00 $\pm$ 1,00	0	0	19,00 $\pm$ 1,00 (CL)	0
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	16,33 $\pm$ 1,16	16,68 $\pm$ 1,16	0	0	17,68 $\pm$ 0,58 (CL)	0
<i>S. mitis</i> ATCC 49456	17,68 $\pm$ 1,16	18,00 $\pm$ 2,00	0	0	16,67 $\pm$ 1,52 (CL)	0
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	16,33 $\pm$ 1,53	15,00 $\pm$ 1,00	0	0	24,67 $\pm$ 1,53 (CL)	0
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	19,33 $\pm$ 1,53	19,00 $\pm$ 1,00	0	0	21,00 $\pm$ 0,00 (CL)	0
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	9,00 $\pm$ 0,00	9,00 $\pm$ 1,00	0	0	16,00 $\pm$ 0,00 (CL)	0
<i>L. casei</i> ATCC 11578	11,33 $\pm$ 1,16	11,00 $\pm$ 2,00	0	0	22,33 $\pm$ 2,52 (CL)	0

PN = penicilina GN = gentamicina MC = miconazol CL = clorexidina

Os resultados obtidos através da determinação da CIM estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14 - Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos de própolis e das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis frente aos microrganismos testados

Microrganismos	Extratos		Micropartículas		Controle positivo
	FEI 97	FEI 2002	FEI 97	FEI 2002	
<i>C. albicans</i> ATCC10231	80	80	100	100	$\geq 5,90$ (MC)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	90	90	200	200	$\geq 5,90$ (GN)
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	200	200	200	200	0,0461 (PN)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	90	90	200	90	5,90 (GN)
<i>E. faecalis</i> ATCC 10541	200	200	200	200	$\geq 5,90$ (PN)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	200	200	200	200	0,1844 (PN)
<i>E. faecalis</i> ATCC 4082	200	200	200	200	2,95 (PN)
<i>E. salivarius</i> ATCC 25975	200	200	90	90	0,3688 (PN)
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	80	100	50	50	0,1844 (PN)
<i>S. mitis</i> ATCC 49456	20	20	50	50	0,0461 (PN)
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	200	200	200	200	0,0922 (PN)
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	200	200	200	200	0,0922 (PN)
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	200	200	90	80	5,90 (MC)
<i>L. casei</i> ATCC 11578	200	300	200	200	5,90 (MC)

PN = penicilina GN = gentamicina MC = miconazol

5.4 Desenvolvimento e caracterização de sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível

Considerando que o sistema composto por P407 e C934P deve ser líquido a baixa temperatura, gelificar na bolsa periodontal (34 - 37 °C) e possuir pH entre 6,8 a 7,2 (EOUANI et al., 2001; JONES et al., 1997; TAMBURIC et al., 1995), foram preparadas formulações poliméricas binárias com proporções diferentes de P407 e C934P, assim como formulações monopoliméricas contendo esses polímeros.

5.4.1 Análise reológica de cisalhamento contínuo

Na reometria de cisalhamento contínuo, as formulações monopoliméricas de P407 apresentaram diferentes comportamentos de fluxo (Figura 15). A formulação contendo 10% (p/p) apresentou fluxo do tipo Newtoniano em todas as temperaturas, assim como aquela contendo 15% (p/p) nas temperaturas de 5 e 25 °C. Em contraste, a formulação contendo 15% (p/p) exibiu fluxo pseudoplástico e pequena área de tixotropia a 37 °C. Além disso, a formulação contendo 20% (p/p) de P407 apresentou comportamento de fluxo pseudoplástico, com pequena área de tixotropia a 5 e 37 °C e reopexia a 25 °C. As formulações monopoliméricas preparadas com C934P exibiram comportamento de fluxo do tipo pseudoplástico com vários graus de valor de rendimento (valor de cedência) e tixotropia, os quais foram mais marcantes com o aumento da concentração polimérica e da temperatura (Figura 16).

As formulações contendo mistura binária de P407 e C934P exibiram comportamento de fluxo do tipo pseudoplástico com vários graus de valor de rendimento e área de histerese (Figuras 17, 18 e 19). Tixotropia e valor de rendimento foram mais marcantes nas formulações com as maiores concentrações de P407 e C934P. Além disso, com o aumento da temperatura, a maioria das formulações poliméricas binárias apresentou pequena área de reopexia, principalmente nas temperaturas de 25 e 37 °C.

Figura 15. Reogramas de fluxo das formulações monopoliméricas contendo 10% (Δ), 15% ($\circ$) ou 20% ($\square$) de poloxamer 407. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 16. Reogramas de fluxo das formulações monopoliméricas contendo 0,10% (Δ); 0,15% (○); 0,20% (□) ou 0,25% (◇) de Carbopol 934P[®]. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 17. Reogramas de fluxo das formulações poliméricas binárias contendo 10% de poloxamer 407 e 0,10% (Δ); 0,15% ($\circ$); 0,20% ($\square$) ou 0,25% ($\diamond$) de Carbopol 934P[®]. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 18. Reogramas de fluxo das formulações poliméricas binárias contendo 15% de poloxamer 407 e 0,10% (Δ); 0,15% ($\circ$); 0,20% ($\square$) ou 0,25% ($\diamond$) de Carbopol 934P[®]. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 19. Reogramas de fluxo das formulações poliméricas binárias contendo 20% de poloxamer 407 e 0,10% (Δ); 0,15% ($\circ$); 0,20% ($\square$) ou 0,25% ($\diamond$) de Carbopol 934P[®]. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Para possibilitar comparações estatísticas dos efeitos de cada componente polimérico nas propriedades de fluxo das formulações, a curva de ida de cada reograma foi matematicamente definida através do modelo da Lei da Potência (MALKIN, 1994; MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993), do qual os índices k e n de cada formulação foram obtidos e estão apresentados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Tabela 15 - Valores obtidos para o índice de consistência (k) das formulações compostas de poloxamer 407 (P407), Carbopol 934P® (C934P) e suas misturas binárias

P407/C934P (%, p/p)		k (Pa.s)*		
Temperatura	5 °C	25 °C	37 °C	
10/0	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	
15/0	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,14 ± 0,03	
20/0	0,04 ± 0,00	8,04 ± 1,17	183,48 ± 3,45	
0/0,10	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,00	0,07 ± 0,00	
0/0,15	0,56 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,32 ± 0,06	
0/0,20	2,23 ± 0,02	1,80 ± 0,03	1,50 ± 0,07	
0/0,25	9,98 ± 0,11	10,30 ± 0,26	10,64 ± 0,15	
10/0,10	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,084 ± 0,00	
10/0,15	0,31 ± 0,00	0,28 ± 0,00	0,30 ± 0,02	
10/0,20	1,11 ± 0,04	0,98 ± 0,05	1,14 ± 0,11	
10/0,25	3,23 ± 0,11	3,31 ± 0,07	3,50 ± 0,05	
15/0,10	0,14 ± 0,01	0,49 ± 0,05	16,04 ± 1,08	
15/0,15	0,36 ± 0,00	1,54 ± 0,06	42,45 ± 3,73	
15/0,20	1,13 ± 0,03	3,16 ± 0,10	35,93 ± 3,32	
15/0,25	2,67 ± 0,07	6,54 ± 0,12	30,39 ± 2,93	
20/0,10	0,18 ± 0,00	86,50 ± 4,16	219,84 ± 5,50	
20/0,15	0,39 ± 0,00	101,45 ± 2,15	267,76 ± 8,13	
20/0,20	0,99 ± 0,06	139,48 ± 2,92	362,88 ± 0,66	
20/0,25	1,95 ± 0,05	196,44 ± 7,23	437,02 ± 42,62	

* Os valores representam a média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

Tabela 16 – Valores obtidos para o índice de comportamento de fluxo (η) das formulações compostas de poloxamer 407 (P407), Carbopol 934P[®] (C934P) e suas misturas binárias

P407/C934P (%, p/p)		η (adimensional)		
Temperatura		5 °C	25 °C	37 °C
10/0		0,97 ± 0,00	1,00 ± 0,01	0,99 ± 0,00
15/0		0,97 ± 0,01	0,98 ± 0,00	0,87 ± 0,02
20/0		0,97 ± 0,00	0,40 ± 0,02	0,12 ± 0,00
0/0,10		0,71 ± 0,01	0,71 ± 0,00	0,72 ± 0,00
0/0,15		0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,00	0,63 ± 0,00
0/0,20		0,53 ± 0,00	0,52 ± 0,00	0,52 ± 0,00
0/0,25		0,42 ± 0,00	0,39 ± 0,00	0,37 ± 0,00
10/0,10		0,86 ± 0,00	0,87 ± 0,00	0,87 ± 0,00
10/0,15		0,77 ± 0,00	0,78 ± 0,00	0,78 ± 0,00
10/0,20		0,67 ± 0,00	0,68 ± 0,01	0,67 ± 0,01
10/0,25		0,59 ± 0,00	0,60 ± 0,00	0,59 ± 0,00
15/0,10		0,88 ± 0,01	0,84 ± 0,02	0,42 ± 0,01
15/0,15		0,80 ± 0,00	0,75 ± 0,00	0,33 ± 0,02
15/0,20		0,72 ± 0,00	0,69 ± 0,01	0,38 ± 0,02
15/0,25		0,64 ± 0,01	0,62 ± 0,00	0,42 ± 0,02
20/0,10		0,89 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,20 ± 0,00
20/0,15		0,83 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,22 ± 0,00
20/0,20		0,78 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,18 ± 0,00
20/0,25		0,71 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,18 ± 0,00

* Os valores representam a média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

Com o aumento da concentração polimérica e da temperatura, o índice k dos formulações monopoliméricas de P407 aumentou significativamente. Por outro lado, houve uma diminuição significativa no índice n .

Para as formulações monopoliméricas de C934P, houve um aumento significativo no índice k com o aumento da concentração polimérica e uma significativa diminuição do mesmo com o aumento da temperatura.

Além disso, o índice n diminuiu significativamente com o aumento da concentração polimérica e não houve diferença significativa no índice n com o aumento da temperatura.

O comportamento de cisalhamento contínuo apresentado pelas formulações poliméricas binárias foi influenciado pela temperatura e o conteúdo de P407 e de C934P. Houve um aumento significativo do índice k com o aumento das concentrações de cada componente polimérico e da temperatura. Em contraste, o índice n foi diminuído significativamente.

5.4.2 Análise reológica oscilatória

Os efeitos da concentração polimérica e da temperatura nas propriedades oscilatórias (G' , G'' , η' e $\tan \delta$) de todas as formulações monopoliméricas em cinco frequências oscilatórias representativas estão apresentados nas Figuras 20 a 23, respectivamente.

As formulações contendo apenas P407 apresentaram módulos elástico e viscoso dependentes da temperatura, da concentração polimérica e da frequência oscilatória. Assim, aumentando a temperatura e a frequência aumentou significativamente os módulos elástico e viscoso, entretanto a $\tan \delta$ diminuiu significativamente. Por exemplo, aumentando a frequência oscilatória de 0,6 para 10,0 Hz, aumentou o módulo G' da formulação composta de P407 15% (p/p) de 0,001 para 0,06 Pa a 5 °C; de 3,78 para 13,45 Pa a 25 °C e de 19,61 para 37,85 Pa a 37 °C. Além disso, a viscosidade η' foi significativamente aumentada com o aumento da temperatura e significativamente diminuída com o aumento da frequência.

(a)

(b)

Figura 20. Módulo elástico G' (a) e módulo viscoso G'' (b) em função da frequência para as formulações monopoliméricas contendo poloxamer 407 (P407) nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 21. Viscosidade dinâmica η' (a) e tangente de perda $\tan \delta$ (b) em função da frequência para as formulações monopolímericas contendo poloxamer 407 (P407) nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

O comportamento reológico das formulações monopolímericas de P407 também mudou em função da concentração polimérica. O aumento da concentração de P407 de 10 para 20% (p/p) e de 15 para 20% (p/p) aumentou significativamente a viscosidade η' e os módulos G' e G'' . Na temperatura de 5 °C, o módulo G'' excedeu o módulo G' em todas as concentrações de P407 e também para a formulação contendo 10% (p/p) a 25 °C. Para as outras temperaturas e concentrações de P407, a $\tan \delta$ foi menor que um através de toda a faixa de frequência.

As propriedades viscoelásticas das formulações monopolímericas contendo C934P também foram dependentes da temperatura, da concentração polimérica e da frequência oscilatória. Dessa forma, o aumento da temperatura diminuiu significativamente a viscosidade η' . Além disso, aumentando a frequência significativamente aumentou a $\tan \delta$, os módulos G' e G'' , enquanto a viscosidade η' diminuiu significativamente. Por exemplo, aumentando a frequência oscilatória de 0,6 para 10,0 Hz, aumentou o módulo G' da formulação composta de C934P 0,20% (p/p) de 39,17 para 52,06 Pa a 5 °C; de 35,82 para 45,56 Pa a 25 °C e de 32,80 para 40,10 Pa a 37 °C. Além disso, o aumento da concentração de C934P aumentou significativamente a viscosidade η' , os módulos G' e G'' , enquanto a $\tan \delta$ foi significativamente diminuída com a concentração aumentando de 0,10 para 0,15% (p/p). O módulo G'' excedeu o elástico apenas na concentração de 0,10% (p/p) de C934P, sendo maior que um através de toda a faixa de frequência.

Assim, as formulações monopolímericas contendo P407 20% (p/p) ou C934P 0,25% (p/p) e P407 10% (p/p) ou C934P 0,10% (p/p) apresentaram os valores maiores e menores de módulo G' , módulo G'' e viscosidade η' , respectivamente.

Figura 22. Módulo elástico G' (a) e módulo viscoso G'' (b) em função da frequência para as formulações monopoliméricas contendo Carbopol 934P[®] (C934P) nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 23. Viscosidade dinâmica η' (a) e tangente de perda $\tan \delta$ (b) em função da frequência para as formulações monopoliméricas contendo Carbopol 934P[®] (C934P) nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

As propriedades viscoelásticas de todas as formulações poliméricas binárias, nas três temperaturas, estão apresentadas nas Figuras 24 a 29.

Figura 24. Módulo elástico G' (a) e módulo viscoso G'' (b) em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 10% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P[®] nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 25. Viscosidade dinâmica η' (a) e tangente de perda $\tan \delta$ (b) em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 10% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P[®] nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 26. Módulo elástico G' (a) e módulo viscoso G'' (b) em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 15% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P[®] nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 27. Viscosidade dinâmica η' (a) e tangente de perda $\tan \delta$ (b) em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 15% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P[®] nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 28. Módulo elástico G' (a) e módulo viscoso G'' (b) em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 20% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P[®] nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Figura 29. Viscosidade dinâmica η' (a) e tangente de perda $\tan \delta$ (b) em função da frequência para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 20% (p/p) com as diferentes concentrações de Carbopol 934P[®] nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Todos os sistemas poliméricos binários apresentaram propriedades que foram temperatura e frequência oscilatória dependentes. Aumentando a frequência significativamente

diminuiu a viscosidade η' e aumentou o módulo G' . O módulo G'' desses sistemas contendo 10% (p/p) de P407 foi significativamente aumentado com o aumento da frequência oscilatória, exceto para as formulações contendo 10% (p/p) de P407 e 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P a 37 °C, onde o módulo G'' foi significativamente diminuído com o aumento da frequência. Nas formulações binárias contendo 15% (p/p) de P407, o módulo G'' também significativamente aumentou com o aumento da frequência, mas as formulações contendo 0,10 e 0,15% (p/p) de C934P apresentaram diminuição significativa do módulo G'' com o aumento da frequência a 37 °C. Além disso, as formulações binárias contendo 20% (p/p) de P407 apresentaram módulo G'' significativamente aumentado com o aumento da frequência a 5 °C, porém significativamente diminuído a 25 e 37 °C.

Aumentado a temperatura significativamente aumentou a viscosidade η' e o módulo G' dos sistemas poliméricos binários, exceto para aqueles contendo 10% (p/p) de P407 com 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P, nos quais o módulo G' foi significativamente diminuído. Além disso, com o aumento da temperatura o módulo G'' aumentou significativamente, exceto para as formulações contendo 20% (p/p) de P407 onde o módulo G'' foi diminuído significativamente a 25 e 37 °C. A $\tan \delta$ para as formulações binárias também foi significativamente diminuída com o aumento da temperatura.

Os efeitos da concentração de P407 e de C934P nas formulações poliméricas binárias também foram significantes. O aumento da concentração de P407 aumentou significativamente a viscosidade η' e os módulos G' e G'' . Similarmente, o aumento da concentração de C934P aumentou significativamente o módulo G' , exceto para o aumento de 0,10 para 0,15% (p/p), o módulo G'' e a viscosidade η' . Em contraste, com 15 ou 20% (p/p) de P407 a viscosidade η' das formulações não aumentou significativamente com o aumento de C934P de 0,20 para 0,25% (p/p). A $\tan \delta$ foi significativamente diminuída com o aumento das concentrações de P407 e C934P.

De forma importante, nas formulações poliméricas binárias contendo 15 e 20% (p/p) de P407 o módulo G' excedeu o módulo G'' , nas temperaturas de 25 e 37 °C e através de toda a faixa de frequência investigada. Em contraste, nas formulações contendo 10% (p/p) de P407 e 0,10; 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P, a $\tan \delta$ foi menor que um nas temperaturas de 37 °C; 5 e 25 °C; 5, 25 e 37 °C, respectivamente.

5.4.3 Cálculo do parâmetro de interação

Os valores calculado e observado do módulo G' , na frequência oscilatória representativa de 10,0 Hz, e o parâmetro de interação calculado para cada mistura binária estão apresentados na Tabela 17.

De forma característica, para ambos os módulos G' , calculado e observado, aumentando a concentração de P407 ou de C934P houve aumento significativo do módulo G' a 10,0 Hz, entretanto tendências similares não foram aparentes para os parâmetros de interação. Além disso, o aumento da temperatura aumentou significativamente o parâmetro de interação das formulações poliméricas binárias contendo 15 ou 20% (p/p) de P407 a 10,0 Hz, enquanto diminuiu significativamente o valor do parâmetro de interação das misturas binárias contendo 10% (p/p) de P407.

Tabela 17 – Valores observado e calculado para o módulo elástico (G') das formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 (P407) e Carbopol 934P® (C934P)

P407/C934P (%, p/p)	Temperatura (°C)	$G'_{\text{observado}}$ (Pa)*	$G'_{\text{calculado}}$ (Pa)*	Parâmetro de interação (Pa)
10/0,10	5	0,42 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,35 ± 0,00
10/0,10	25	0,90 ± 0,04	1,01 ± 0,03	-0,12 ± 0,00
10/0,10	37	7,19 ± 0,41	15,77 ± 0,02	-8,58 ± 0,41
10/0,15	5	1,10 ± 0,00	4,96 ± 0,06	-3,86 ± 0,06
10/0,15	25	2,07 ± 0,04	4,05 ± 0,09	-1,98 ± 0,11
10/0,15	37	4,07 ± 0,01	18,63 ± 0,02	-14,56 ± 0,02
10/0,20	5	9,29 ± 0,41	52,11 ± 0,54	-42,82 ± 0,63
10/0,20	25	8,01 ± 0,37	45,86 ± 2,06	-37,85 ± 2,09
10/0,20	37	7,76 ± 0,31	55,83 ± 1,84	-48,07 ± 1,71
10/0,25	5	41,18 ± 3,06	63,14 ± 5,05	-21,96 ± 3,28
10/0,25	25	37,39 ± 1,40	59,54 ± 5,08	-22,15 ± 3,78
10/0,25	37	37,67 ± 1,50	87,37 ± 5,54	-49,70 ± 4,07
15/0,10	5	0,54 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,46 ± 0,00
15/0,10	25	456,35 ± 31,96	14,16 ± 0,58	442,29 ± 32,23
15/0,10	37	3772,00 ± 94,15	37,88 ± 0,50	3734,12 ± 94,53
15/0,15	5	2,57 ± 0,11	4,97 ± 0,05	-2,40 ± 0,08
15/0,15	25	348,02 ± 19,52	17,20 ± 0,64	330,82 ± 19,38

continua

conclusão

P407/C934P (%, p/p)	Temperatura (°C)	$G'_{\text{observado}} \text{ (Pa)}^*$	$G'_{\text{calculado}} \text{ (Pa)}^*$	Parâmetro de interação (Pa)
15/0,15	37	4083,60 ± 216,10	40,75 ± 0,49	4042,85 ± 216,47
15/0,20	5	9,25 ± 0,48	52,12 ± 0,54	-42,87 ± 0,53
15/0,20	25	339,96 ± 15,74	59,01 ± 2,03	280,95 ± 15,54
15/0,20	37	3477,60 ± 134,97	77,95 ± 1,85	3399,65 ± 136,48
15/0,25	5	29,16 ± 1,25	63,15 ± 5,05	-33,99 ± 4,04
15/0,25	25	425,53 ± 38,15	72,70 ± 5,55	352,83 ± 33,05
15/0,25	37	3296,00 ± 201,64	109,48 ± 5,65	3186,52 ± 197,11
20/0,10	5	0,71 ± 0,06	0,15 ± 0,01	0,56 ± 0,05
20/0,10	25	9408,4 ± 176,20	10191,12 ± 345,88	-782,72 ± 20,91
20/0,10	37	14412,00 ± 521,70	13696,04 ± 333,44	715,96 ± 23,09
20/0,15	5	3,26 ± 0,26	5,05 ± 0,06	-1,79 ± 0,21
20/0,15	25	9428,80 ± 504,28	10194,16 ± 345,95	-765,36 ± 28,21
20/0,15	37	16058,00 ± 1194,93	13698,90 ± 333,43	2359,10 ± 90,68
20/0,20	5	8,84 ± 0,11	52,20 ± 0,54	-43,36 ± 0,61
20/0,20	25	8883,00 ± 444,42	10235,96 ± 345,45	-1352,96 ± 164,02
20/0,20	37	15532,00 ± 442,35	13736,10 ± 333,23	1795,90 ± 148,58
20/0,25	5	18,62 ± 0,49	63,23 ± 5,05	-44,61 ± 4,63
20/0,25	25	9378,40 ± 290,56	10249,65 ± 349,01	-871,25 ± 19,77
20/0,25	37	13974,00 ± 431,72	13767,64 ± 336,26	206,36 ± 15,93

*Valor (média ± s) determinado na frequência oscilatória de 10,0 Hz em, no mínimo, cinco replicatas.

Os valores do parâmetro de interação das formulações contendo 10% (p/p) de P407 foram menores ou próximos de zero, assim como das formulações contendo 15% (p/p) de P407, na temperatura de 5 °C, e 20% (p/p), nas temperaturas de 5 e 25 °C. A formulação contendo 20% (p/p) de P407 com 0,25% (p/p) de C934P não exibiu interação nas três temperaturas testadas, apesar do valor positivo do parâmetro de interação a 37 °C, onde os módulos observado e calculado não foram estatisticamente diferentes.

Considerando a concentração polimérica e a temperatura, as misturas binárias contendo 15% (p/p) de P407 apresentaram os maiores valores para o parâmetro de interação. Assim, os maiores valores de interação foram observados nas formulações contendo 15%

(p/p) de P407 com 0,10% (p/p) de C934P ($442,29 \pm 32,23$ Pa) e 15% (p/p) de P407 com 0,15% (p/p) de C934P ($4042,85 \pm 216,47$ Pa) nas temperaturas de 25 e 37 °C, respectivamente. Em contraste, o menor parâmetro de interação foi apresentado pela formulação contendo 15% (p/p) de P407 com 0,20% (p/p) de C934P ($280,95 \pm 15,54$ Pa) e 20% (p/p) de P407 com 0,10% (p/p) de C934P ($715,96 \pm 23,09$ Pa) nas temperaturas de 25 e 37 °C, respectivamente.

5.4.4 Determinação da temperatura de gelificação

A propriedade termo-sensível das formulações binárias foi avaliada pela temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) e os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) obtida para as formulações monopoliméricas de P407 e para as formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 (P407) e Carbopol 934P[®] (C934P)

P407/C934P (%, p/p)	$T_{\text{sol/gel}}$ (°C) [*]				
	0	0,10	0,15	0,20	0,25
10	-	-	-	-	-
15	$31,53 \pm 1,11$	$34,74 \pm 0,38$	$32,50 \pm 0,50$	$32,22 \pm 0,86$	$31,91 \pm 0,84$
20	$25,44 \pm 0,12$	$23,44 \pm 0,40$	$23,30 \pm 0,05$	$22,42 \pm 0,06$	$21,84 \pm 0,37$

^{*} Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

As formulações contendo 10% (p/p) de P407 não aumentaram significativamente a viscosidade η' com o aumento da temperatura. Em contraste, as formulações contendo 15 ou 20% (p/p) de P407 aumentaram significativamente a viscosidade η' com o aumento da temperatura, apresentando $T_{\text{sol/gel}}$. O valor do módulo G' dessas formulações foi baixo no estado de solução, mas aumentou significativamente no estado gel (Figura 30).

Para todas as formulações, no final da transição sol/gel, o módulo G' apresenta-se independente ao longo de uma faixa variável de temperatura e, depois, diminui. A temperatura de transição das formulações poliméricas binárias diminuiu com o aumento da concentração de P407 e de C934P.

Figura 30. Módulo elástico G' em função da temperatura na frequência oscilatória de 1,0 Hz das formulações monopoliméricas contendo P407 (% p/p) e poliméricas binárias contendo P407 – C934P (% p/p). Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

5.4.5 Análise do perfil de textura

As propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade e adesividade) de todas as formulações testadas estão apresentadas na Tabela 19.

Algumas formulações não foram adequadas para a análise de adesividade. Por outro lado, as formulações examinadas apresentaram diferentes propriedades mecânicas, as quais foram afetadas significativamente pelas mudanças na concentração, no tipo de polímero presente e na temperatura.

Dessa forma, para as formulações monopoliméricas, aumentando a concentração de P407 e a temperatura observou-se um aumento significativo na dureza, na compressibilidade e na adesividade. Em contraste, aumentando a concentração e a temperatura das formulações monopoliméricas contendo C934P não aumentou significativamente a dureza e a compressibilidade. Além disso, as formulações monopoliméricas contendo C934P apresentaram adesividade aumentada significativamente com o aumento da concentração polimérica e com a diminuição da temperatura.

O aumento da concentração de P407, de C934P e da temperatura nas formulações poliméricas binárias levou ao aumento significativo na dureza, na compressibilidade e na adesividade. Os valores mínimo e máximo de dureza, compressibilidade e adesividade foram exibidos pelas formulações binárias contendo P407 10% (p/p) com C934P 0,10% (p/p) e P407 20% (p/p) com C934P 0,25% (p/p), respectivamente.

Tabela 19 - Propriedades mecânicas das formulações compostas de poloxamer 407 (P407), Carbopol 934P® (C934P) e suas misturas binárias determinadas através da análise do perfil de textura

P407/C934P (%, p/p)	Dureza*		Compressibilidade*		Adesividade*	
	(N)		(N.mm)		(N.mm)	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
10/0	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,33 ± 0,01	0,29 ± 0,03	-	-
15/0	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,01	-	-
20/0	0,29 ± 0,01	0,40 ± 0,02	2,59 ± 0,10	3,60 ± 0,13	2,38 ± 0,07	3,29 ± 0,12
0/0,10	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,01	-	-
0/0,15	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,02	-	-
0/0,20	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,03	-	-
0/0,25	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,21 ± 0,01	0,40 ± 0,04	0,08 ± 0,00	-
10/0,10	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,02	-	-
10/0,15	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,32 ± 0,02	0,29 ± 0,02	-	-
10/0,20	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,30 ± 0,03	0,30 ± 0,03	-	-
10/0,25	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,03 ± 0,00	-
15/0,10	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,57 ± 0,06	-	0,33 ± 0,02
15/0,15	0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,91 ± 0,09	-	0,73 ± 0,06
15/0,20	0,04 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,30 ± 0,03	1,14 ± 0,07	-	0,92 ± 0,08
15/0,25	0,05 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,35 ± 0,01	1,10 ± 0,10	-	0,89 ± 0,07
20/0,10	0,36 ± 0,01	0,52 ± 0,02	3,27 ± 0,14	4,81 ± 0,16	2,81 ± 0,12	4,08 ± 0,13
20/0,15	0,43 ± 0,02	0,56 ± 0,02	3,84 ± 0,09	5,13 ± 0,17	3,28 ± 0,09	4,32 ± 0,15
20/0,20	0,53 ± 0,01	0,61 ± 0,02	4,77 ± 0,09	4,78 ± 0,18	4,06 ± 0,09	3,98 ± 0,19
20/0,25	0,59 ± 0,03	0,75 ± 0,04	5,37 ± 0,24	6,87 ± 0,24	4,51 ± 0,19	5,82 ± 0,22

* Cada valor representa a média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

5.4.6 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A força necessária para remover cada formulação polimérica binária a partir do disco de mucina está apresentada na Tabela 20. Ocorreu falha na interface amostra/mucina para as formulações contendo 10% (p/p) de P407 com todas as concentrações de C934P, assim a avaliação da mucoadesão não pôde ser determinada com sucesso para essas amostras.

Tabela 20 - Força mucoadesiva das formulações poliméricas binárias contendo poloxamer 407 (P407) e Carbopol 934P® (C934P)

Concentração (% p/p)		Força (N)*
P407	C934P	
15	0,25	0,28 ± 0,02
20	0,10	0,36 ± 0,02
20	0,15	0,38 ± 0,03
20	0,20	0,39 ± 0,03
20	0,25	0,39 ± 0,03

* Cada valor representa a média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

Por outro lado, para as formulações contendo 15% (p/p) de P407 com 0,10; 0,15 ou 0,20% (p/p) de C934P, fragmentos de formulação foram encontrados aderidos ao disco de mucina e, portanto, estes testes foram desconsiderados devido à falha de coesão na amostra. Apenas as formulações contendo 15% (p/p) de P407 com 0,25% (p/p) de C934P e aquelas contendo 20% (p/p) de P407 com todas as concentrações de C934P foram adequadas para a análise. A força vertical de remoção necessária para quebrar a ligação mucoadesiva das formulações com o disco de mucina foi significativamente aumentada com o aumento da concentração de P407 e de C934P.

5.4.7 Determinação seringueabilidade

O trabalho necessário para expelir cada formulação binária a partir da seringa está apresentado na Tabela 21.

Tabela 21 – Efeitos do poloxamer 407 (P407) e do Carbopol 934P® (C934P) no trabalho de seringueamento das formulações poliméricas binárias

Concentration (% p/p)		Trabalho de seringueamento*
P407	C934P	(N.mm)
10	0,10	12,42 ± 1,11
10	0,15	12,53 ± 0,86
10	0,20	15,68 ± 1,03
10	0,25	15,90 ± 1,44
15	0,10	12,59 ± 1,22
15	0,15	12,16 ± 1,08
15	0,20	14,06 ± 1,07
15	0,25	15,06 ± 1,33
20	0,10	12,44 ± 1,12
20	0,15	14,44 ± 1,22
20	0,20	17,20 ± 0,69
20	0,25	18,29 ± 1,78

* Cada valor representa a média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

Aumentos significantes no trabalho de seringueamento foram observados com o aumento da concentração de P407, principalmente de 10 para 15% (p/p) e de 15 para 20% (p/p). Além disso, o aumento da concentração de C934P de 0,10 ou 0,15% (p/p) para 0,20 ou 0,25% (p/p) também aumentou significativamente o trabalho de seringueamento das formulações.

5.4.8 Preparação e caracterização do sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível com micropartículas contendo própolis

5.4.8.1 Análise morfológica

Foram avaliadas três temperaturas (15, 20 e 25 °C) de preparação das micropartículas de própolis nos géis.

Figura 31. Fotografia obtida por microscopia óptica (400X) do sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis SBTS-1 preparado a 20 °C

Observou-se micropartículas em pequenas quantidades e sem aglomeração na temperatura de 15 °C. Por outro lado, a 25 °C houve formação de grumos (agregados desestruturados) e bastante aglomeração. Já na temperatura de 20 °C foi observada a formação de grande quantidade de micropartículas e pouca aglomeração (Figuras 31 e 32).

Figura 32. Fotografia obtida por microscopia óptica (400X) do sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis SBTS-2 preparado a 20 °C

5.4.8.2 Análise granulométrica

A análise de distribuição de tamanho de partículas nos sistemas foi realizada, determinando-se o tamanho das partículas por microscopia óptica, usando-se, como parâmetro de medição, o da medida do diâmetro segundo Feret.

A Tabela 22 e a Figura 33 apresentam a distribuição de tamanho das micropartículas presentes no sistema SBTS-1.

Tabela 22 - Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema bioadesivo termo-sensível SBTS-1

Classe (μm)	Ponto Médio (μm)	Frequência	Frequência Relativa (%)
$0,0 < X \leq 0,5$	0,25	66	1,83
$0,5 < X \leq 1,0$	0,75	1989	55,02
$1,0 < X \leq 1,5$	1,25	1191	32,95
$1,5 < X \leq 2,0$	1,75	297	8,22
$2,0 < X \leq 2,5$	2,25	69	1,91
$2,5 < X \leq 3,0$	2,75	3	0,08
Total		3615	100

O diâmetro médio das micropartículas foi de $1,03 \pm 0,36 \mu\text{m}$, apresentando uma pequena variação de tamanho, indo de pouco menos que $0,5 \mu\text{m}$ a $2,89 \mu\text{m}$, sendo que quase 55,02% das partículas apresentam tamanho entre $0,5$ e $1,0 \mu\text{m}$.

Figura 33. Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema SBTS-1: (■) histograma dos intervalos de classe e (—●—) representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas.

A Tabela 23 e a Figura 34 apresentam a distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema SBTS-2.

Tabela 23 – Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema bioadesivo termo-sensível SBTS-2

Classe (μm)	Ponto Médio (μm)	Frequência	Frequência Relativa (%)
$0,0 < X \leq 0,5$	0,25	152	4,20
$0,5 < X \leq 1,0$	0,75	1830	50,62
$1,0 < X \leq 1,5$	1,25	1100	30,43
$1,5 < X \leq 2,0$	1,75	375	10,37
$2,0 < X \leq 2,5$	2,25	109	3,02
$2,5 < X \leq 3,0$	2,75	16	0,44
$3,0 < X \leq 3,5$	3,25	17	0,47
$3,5 < X \leq 4,0$	3,75	16	0,44
Total		3615	100

Observou-se uma distribuição de tamanho ligeiramente maior do que a das presentes no sistema SBTS-1 (Tabela 22), indo de 0,30 μm a 3,70 μm .

O diâmetro médio das partículas foi de $1,08 \pm 0,47 \mu\text{m}$, e cerca de 50% das partículas apresentaram tamanho entre 0,5 e 1 μm .

Figura 34. Distribuição de tamanho das micropartículas de própolis presentes no sistema SBTS-2: (■) histograma dos intervalos de classe e (—●—) representação da distribuição cumulativa dos tamanhos de partículas.

5.4.8.3 Determinação da densidade relativa

Os sistemas SBTS-1 e SBTS-2 apresentaram densidade relativa de $1,0057 \pm 0,0003$ e $1,0068 \pm 0,00003$, respectivamente.

5.4.8.4 Análise reológica de cisalhamento contínuo

As propriedades de fluxo dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis estão graficamente apresentadas nas Figuras 35 e 36.

Figura 35. Reograma de fluxo do sistema bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis SBTS-1 nas temperaturas de ($\square$) 5°C, ($\circ$) 25 °C e (Δ) 37 °C. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Na reometria de cisalhamento contínuo, ambos os sistemas exibiram comportamento de fluxo do tipo pseudoplástico, com variados graus de valor de rendimento e tixotropia, nas três temperaturas. A tixotropia foi mais marcante a 25 °C e no sistema SBTS-1.

Figura 36. Reograma de fluxo do sistema bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis SBTS-2 nas temperaturas de ($\square$) 5°C, ($\circ$) 25 °C e (Δ) 37 °C. O símbolo fechado representa a curva de ida e o símbolo aberto representa a curva de volta. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Para possibilitar comparações estatísticas dos efeitos de cada componente nas propriedades de fluxo dos sistemas, a curva de ida de cada reograma foi matematicamente definida utilizando o modelo da Lei da Potência (MALKIN, 1994; MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993), a partir do qual o índice k e o índice n de cada sistema foram obtidos (Tabela 24).

Com o aumento da concentração de C934P, o índice k dos dois sistemas aumentou significativamente e, em contraste, o índice n diminuiu. O comportamento de cisalhamento contínuo desses sistemas foi também influenciado pela temperatura. Houve um aumento significativo no índice k com o aumento da temperatura. Em contraste, o índice n foi diminuído significativamente.

Tabela 24 - Índice de consistência (k) e índice de comportamento de fluxo (n) dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis com micropartículas contendo própolis

Sistemas	Temperatura (°C)	k (Pa.s) [*]	n (adimensional) [*]
SBTS-1	5	$0,10 \pm 0,001$	$0,91 \pm 0,001$
SBTS-1	25	$8,11 \pm 0,53$	$0,51 \pm 0,003$
SBTS-1	37	$5,61 \pm 0,41$	$0,54 \pm 0,03$
SBTS-2	5	$0,84 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,003$
SBTS-2	25	$9,05 \pm 0,42$	$0,59 \pm 0,006$
SBTS-2	37	$31,92 \pm 1,80$	$0,40 \pm 0,01$

^{*} Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas

A presença de extrato de própolis nos sistemas não aumentou significativamente o índice k , mas sim o índice n a 5 °C. Por outro lado, a adição de extrato de própolis diminuiu significativamente o índice n dos sistemas a 25 °C.

5.4.8.5 Análise reológica oscilatória

Os efeitos da concentração de C934P, da presença de própolis e da temperatura nas propriedades oscilatórias, nomeadamente, módulo G' , módulo G'' , viscosidade η' e $\tan \delta$, dos dois sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis estão apresentados nas Figuras 37 e 38.

Figura 37. Módulo elástico G' (a) e módulo viscoso G'' (b) em função da frequência para os sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C (Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.)

Os sistemas apresentaram módulo G' , módulo G'' e viscosidade η' dependentes da concentração de C934P, da temperatura e da presença de própolis. Aumentando a temperatura

aumentou significativamente os módulos G' e G'' e a viscosidade η' . Por outro lado, o aumento da temperatura diminuiu significativamente a $\tan \delta$ dos sistemas.

Figura 38. Viscosidade dinâmica η' (a) e tangente de perda $\tan \delta$ (b) em função da frequência para os sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis nas temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Cada reograma é a média de, no mínimo, cinco replicatas com um coeficiente de variação menor que 10%.

Os módulos G' e G'' dos dois sistemas aumentaram significativamente com o aumento da frequência oscilatória, enquanto a viscosidade η' e a $\tan \delta$ diminuíram significativamente.

O comportamento reológico oscilatório das preparações também mudou em função da concentração de C934P. O aumento da concentração de C934P aumentou significativamente o módulo G' , o módulo G'' e a viscosidade η' dos sistemas. Em contraste, a $\tan \delta$ foi diminuída.

A presença de extrato de própolis aumentou significativamente o módulo G' , o módulo G'' e a viscosidade η' , mas diminuiu significativamente a $\tan \delta$, dos sistemas nas temperaturas de 25 e 37 °C. Em contraste, na temperatura de 5 °C, a presença de própolis diminuiu significativamente o módulo G' , o módulo G'' e a viscosidade η' , mas aumentou significativamente a $\tan \delta$.

Na temperatura de 5 °C, e em todas as frequências, o módulo G'' dos sistemas excedeu o módulo G' . Em contraste, nas temperaturas de 25 e 37 °C, a $\tan \delta$ foi menor que um através de toda a faixa de frequência utilizada.

5.4.8.6 Determinação da temperatura de gelificação

A propriedade termo-sensível dos sistemas bioadesivos contendo própolis foi avaliada pela temperatura de transição sol/gel ($T_{\text{sol/gel}}$) e os resultados estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Temperatura de gelificação ($T_{\text{sol/gel}}$) obtida através do método mecânico (preliminar) e método reológico oscilatório dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis

Sistemas	Composição (% p/p)			Temperatura de gelificação (°C)	
	P407	C934P	EFEI2002	Método preliminar**	Método reológico***
				(média $\pm s$)	(média $\pm s$)
SBTS-1	15	0,1	4,0*	29,00 $\pm$ 0,00	28,98 $\pm$ 0,24
SBTS-2	15	0,25	4,0*	26,00 $\pm$ 0,00	27,60 $\pm$ 0,82

* em relação ao gel ** triplicatas *** cinco replicatas

5.4.8.7 Análise do perfil de textura

As propriedades mecânicas dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis foram determinadas através da análise do perfil de textura e estão apresentadas na Tabela 26.

Tabela 26 - Propriedades mecânicas dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis determinadas através de análise do perfil de textura

Sistemas	Temperatura (°C)	Dureza (N)*	Compresibilidade (N.mm)*	Adesividade (N.mm)*
SBTS-1	25	0,0350 ± 0,0023	0,2680 ± 0,0193	-
SBTS-1	37	0,0820 ± 0,0025	0,6584 ± 0,0298	0,4100 ± 0,0201
SBTS-2	25	0,0856 ± 0,0034	0,4984 ± 0,0492	0,3856 ± 0,0358
SBTS-2	37	0,1792 ± 0,0096	1,5252 ± 0,0787	1,2924 ± 0,0911

*Cada valor representa a média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

Aumentando a concentração de C934P de 0,10 para 0,25% (p/p) aumentou significativamente a dureza, a compressibilidade e a adesividade dos sistemas. Estas propriedades mecânicas também foram significativamente aumentadas com o aumento da temperatura e a adição de extrato de própolis.

5.4.8.8 Avaliação *in vitro* da força mucoadesiva

A força necessária para remover cada sistema bioadesivo termo-sensível contendo micropartículas de própolis a partir do disco de mucina está apresentada na Tabela 27.

Tabela 27 - Força mucoadesiva dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis

Sistemas	Concentração (% p/p)			Força (N)*
	P407	C934P	EFEI2002	
SBTS-1	15	0,10	4,0	-
SBTS-2	15	0,25	4,0	0,2308 ± 0,0192

*O valor representa a média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

Ocorreu falha na interface amostra/mucina para o sistema SBTS-1. Fragmentos do sistema foram encontrados aderidos ao disco de mucina e, dessa forma, esses testes não obtiveram sucesso devido à falha de coesão na amostra. Apenas o sistema SBTS-2 foi adequado para a realização da análise. Comparando com o sistema binário sem micropartículas de própolis, a força vertical de remoção para quebra da ligação mucoadesiva do sistema SBTS-2 foi significativamente diminuída com a adição do extrato de própolis.

5.4.8.9 Determinação da seringueabilidade

O trabalho necessário para expelir a partir de uma seringa cada um dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis está apresentado na Tabela 28.

Tabela 28 – Trabalho necessário para expelir a partir de uma seringa os sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis

Sistemas	Concentração (% p/p)			Trabalho de seringueamento (N.mm)*
	P407	C934P	EFEI2002	
SBTS-1	15	0,10	4,0	13,74 ± 1,16
SBTS-2	15	0,25	4,0	13,04 ± 1,20

* O valor representa a média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas.

Não houve diferenças significativas no trabalho de seringueamento dos sistemas com o aumento da concentração de C934P e com a adição de extrato de própolis.

5.4.8.10 Determinação do teor de própolis

Os resultados obtidos para a determinação do teor de própolis nos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis estão descritos na Tabela 29.

Tabela 29 - Teor de própolis nos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis

Sistemas	Teor (média $\pm$ s)			
	Método cromatográfico (CLAE)*			Método espectrofotométrico**
	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	
SBTS-1	0,0121 $\pm$ 0,0004	0,0105 $\pm$ 0,0002	0,0738 $\pm$ 0,0029	0,0223 $\pm$ 0,0006
SBTS-2	0,0121 $\pm$ 0,0003	0,0106 $\pm$ 0,0002	0,0735 $\pm$ 0,0002	0,0223 $\pm$ 0,0007

*massa de crisina (g) por 100g de preparação

**massa de quercetina (g) por 100 g de preparação

Os resultados obtidos através da espectrofotometria demonstraram a boa recuperação do método para a quantificação dos flavonóides totais em quercetina presentes nos sistemas (ICH, 1994). Obteve-se $80,14 \pm 2,16$ % e $80,08 \pm 2,54$ % de recuperação para os sistemas SBTS-1 E SBTS-2, respectivamente. Resultados similares foram obtidos pelo método cromatográfico (Tabela 30).

Tabela 30 - Recuperação do método de quantificação por CLAE da própolis presente nos sistemas bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis

Sistemas	Recuperação (%)*		
	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3
SBTS-1	99,60 $\pm$ 3,95	88,15 $\pm$ 4,06	82,54 $\pm$ 2,14
SBTS-2	99,99 $\pm$ 0,72	88,89 $\pm$ 4,07	83,10 $\pm$ 4,07

* Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão.

5.5 Desenvolvimento e caracterização de sistema precursor de fase cristalina líquida

No desenvolvimento do sistema precursor de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis (PFCL), foi levada em consideração a necessidade de desenvolvimento de um produto que fosse homogêneo, administrável pela seringa e que não tivesse água em quantidade suficiente para o intumescimento e degradação das micropartículas de gelatina até a aplicação.

Nesse sentido, preparou-se uma fórmula livre de água (PFCL-1), que não apresentou homogeneidade, formando grumos, aglomerados e sedimentação rápida (após cessar a

agitação). Assim, houve a necessidade de aumentar a viscosidade da preparação, sem comprometer a seringueabilidade, adicionando quantidades de MI e de água suficientes para estabilizar o sistema (PFCL-2 a 6).

As fórmulas com maior quantidade de MI e de água destilada (PFCL-4, PFCL-5 e SPFCL-6) originaram sistemas com grande quantidade de grumos e separação das micropartículas. Já as fórmulas com 5% de água e 5 ou 10% de MI (PFCL-2 e PFCL-3, respectivamente) originaram sistemas homogeneamente dispersos e sem grumos.

5.5.1 Determinação das características de sedimentação

Os resultados obtidos na determinação das características de sedimentação dos sistemas PFCL-2 e PFCL-3 estão descritos na Tabela 31.

Ambos os sistemas apresentaram redispersão fácil e rápida com um número máximo de quatro movimentos normalizados de 180 °.

Tabela 31 – Volume de sedimentação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis

Tempo (h)	Volume de sedimentação (F)					
	PFCL-2			PFCL-3		
	F	s	CV (%)	F	s	CV (%)
0,5	1	0	0	1	0	0
1	1	0	0	1	0	0
2	1	0	0	1	0	0
4	1	0	0	1	0	0
8	0,98	0,0006	0,06	0,98	0	0
12	0,97	0,0012	0,12	0,97	0	0
24	0,96	0,0175	1,86	0,97	0	0
48	0,93	0,0225	2,49	0,94	0	0
96	0,90	0,0433	4,95	0,91	0,0313	3,45
168	0,89	0,0546	6,24	0,90	0,0393	4,42

5.5.2 Avaliação morfológica

Observou-se a integridade e uma boa distribuição das micropartículas nas preparações (Figura 39).

Figura 39. Fotografias obtidas por microscopia óptica (400X) dos sistemas com micropartículas de gelatina contendo própolis: (a) PFCL-2 e (b) PFCL-3.

5.5.3 Determinação da densidade relativa

As formulações PFCL-2 e PFCL-3 apresentaram densidade relativa de $1,0126 \pm 0,0003$ e $1,0102 \pm 0,00003$, respectivamente.

5.5.4 Análise reológica de cisalhamento contínuo

As propriedades de fluxo dos sistemas (tensão de cisalhamento em função do gradiente de cisalhamento), nas temperaturas de 25 e 37 °C, estão representadas nas figuras 40 e 41.

(a)

(b)

Figura 40. Reogramas de fluxo do sistema PFCL-2 sem (a) e com (b) micropartículas contendo própolis nas temperaturas de (○) 25 °C e (Δ) 37 °C. Os símbolos fechados representam a curva ascendente e os abertos a curva descendente. O coeficiente de variação das análises em, no mínimo, cinco replicatas foi menor que 3% para todos os casos.

Na reometria de cisalhamento contínuo, ambos os sistemas (com e sem micropartículas) exibiram comportamento de fluxo pseudoplástico, com baixos graus de tixotropia, nas duas temperaturas. A tixotropia foi mais evidente na temperatura de 25 °C e no sistema PFCL-2 contendo micropartículas.

(a)

(b)

Figura 41. Reogramas de fluxo do sistema PFCL-3 sem (a) e com (b) micropartículas contendo própolis nas temperaturas de (○) 25 °C e (Δ) 37 °C. Os símbolos fechados representam a curva ascendente e os abertos a curva descendente. O coeficiente de variação das análises em, no mínimo, cinco replicatas foi menor que 8% para todos os casos.

O comportamento de fluxo dos sistemas, com e sem micropartículas de própolis, também pôde ser observado através curva de viscosidade em função do gradiente de cisalhamento (Figura 42).

Figura 42. Curvas de viscosidade (25 e 37 °C) dos sistemas (-▲-) PFCL-2 com micropartículas; (-x-) PFCL-3 com micropartículas; (-◆-) PFCL-2 sem micropartículas; (-■-) PFCL-3 sem micropartículas. O coeficiente de variação das análises em, no mínimo, cinco replicatas foi menor que 8% para todos os casos.

Para comparações estatísticas dos efeitos de cada componente nas propriedades de fluxo das formulações, a curva ascendente de cada reogramas foi matematicamente definida utilizando a equação da Lei da Potência (MALKIN, 1994; MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993), a partir do qual o índice k e o índice n de cada formulação foram derivados (Tabela 32).

Tabela 32 - Valores obtidos dos parâmetros da Lei da Potência para os sistemas PFCL contendo ou não micropartículas

Sistemas	k (Pa.s) ^{**}		n ^{**}	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
PFCL-2*	0,25 ± 0,02	0,130 ± 0,007	0,97 ± 0,01	0,982 ± 0,004
PFCL-2	1,14 ± 0,10	0,48 ± 0,05	0,859 ± 0,001	0,91 ± 0,01
PFCL-3*	0,20 ± 0,01	0,110 ± 0,003	0,981 ± 0,002	0,982 ± 0,001
PFCL-3	0,87 ± 0,07	0,454 ± 0,008	0,868 ± 0,001	0,8923 ± 0,0003

*sem micropartículas de gelatina contendo própolis ** média ± s de, no mínimo, cinco replicatas

Com o aumento da concentração de ACEP, o índice k dos sistemas aumentou significativamente. Por outro lado, não houve diferença significativa no índice n . O comportamento de cisalhamento contínuo dos sistemas foi também influenciado pela temperatura e pela presença de micropartículas contendo própolis. Houve uma diminuição significativa no índice k com o aumento de temperatura. Em contraste, o índice n foi aumentado significativamente. Com a incorporação de micropartículas aos sistemas, houve um aumento significativo do índice k e uma diminuição significativa do índice n .

5.5.5 Análise reológica oscilatória

Os efeitos da concentração de ACEP e de MI, da presença de micropartículas contendo propolis e da temperatura nas propriedades oscilatórias, mais precisamente nos módulos G' e viscoso G'' , na viscosidade η' e na $\tan \delta$, dos sistemas estão representados nos gráficos das Figuras 43 a 46.

Figura 43. Módulo elástico G' em função da frequência para as formulações (-♦-) PFCL-2; (-▲-) PFCL-3; (-●-) PFCL-2 com micropartículas; (-■-) PFCL-3 com micropartículas. Os símbolos abertos representam os resultados a 25 °C e os fechados à 37 °C. O coeficiente de variação das análises em, no mínimo, cinco replicatas foi menor que 10% para todos os casos.

As duas formulações (com e sem micropartículas) apresentaram módulos G' e G'' que foram dependentes da concentração de ACEP e de MI, da temperatura, da presença de micropartículas e da frequência.

Figura 44. Módulo viscoso G'' em função da frequência para as formulações (-♦-) PFCL-2; (-▲-) PFCL-3; (-●-) PFCL-2 com micropartículas; (-■-) PFCL-3 com micropartículas. Os símbolos abertos representam os resultados à 25 °C e os fechados à 37 °C. O coeficiente de variação das análises em, no mínimo, cinco replicatas foi menor que 10% para todos os casos.

O aumento de temperatura diminuiu significativamente os módulos G' e G'' , exceto para o sistema PFCL-2 com micropartículas, que apresentou um aumento significativo do módulo G'' .

Além disso, a viscosidade η' foi diminuída significativamente com o aumento da temperatura, principalmente para as formulações sem micropartículas (Figura 45).

Os módulos G' e G'' de todas as preparações foram aumentados significativamente com o aumento da frequência oscilatória, entretanto, a $\tan \delta$ diminuiu significativamente. Por exemplo, aumentando a frequência oscilatória de 0,6 para 10,0 Hz, aumentou o módulo G' do sistema PFCL-2 contendo micropartículas de 111,42 para 139,40 Pa (25 °C) e de 4,18 para 22,06 Pa (37 °C). Para o sistema PFCL-3 contendo micropartículas o módulo G' aumentou de 119,06 para 160,52 Pa (25 °C) e de 13,11 to 35,21 Pa (37 °C). Além disso, a viscosidade η' foi significativamente diminuída com o aumento da frequência oscilatória.

Figura 45. Viscosidade dinâmica η' em função da frequência para as formulações (-♦-) PFCL-2; (-▲-) PFCL-3; (-●-) PFCL-2 com micropartículas; (-■-) PFCL-3 com micropartículas. Os símbolos abertos representam os resultados a 25 °C e os fechados a 37 °C. O coeficiente de variação das análises em, no mínimo, cinco replicatas foi menor que 10% para todos os casos.

O aumento de temperatura também diminuiu de modo significativo a $\tan \delta$ das formulações sem micropartículas, mas aumentou significativamente a dos sistemas contendo micropartículas (Figura 46).

O comportamento reológico das formulações também mudou em função da concentração de ACEP e de MI. O aumento da concentração de ACEP significativamente

aumentou os módulos G' e G'' das preparações sem micropartículas, mas diminuiu daquelas contendo micropartículas. A viscosidade η' das preparações também significativamente aumentou com o aumento de ACEP, exceto para as preparações contendo micropartículas a 25 °C.

Figura 46. Tangente de delta $\tan \delta$ em função da frequência para as formulações (—♦—) PFCL-2; (—▲—) PFCL-3; (—●—) PFCL-2 com micropartículas; (—■—) PFCL-3 com micropartículas. Os símbolos abertos representam os resultados à 25 °C e os fechados à 37 °C. O coeficiente de variação das análises em, no mínimo, cinco replicatas foi menor que 10% para todos os casos.

A adição de micropartículas às preparações aumentou significativamente o módulo G' , o módulo G'' e a viscosidade η' , mas diminuiu significativamente a $\tan \delta$. Nas duas preparações contendo micropartículas, na temperatura de 25 °C e em todas as frequências, o módulo G' excedeu o módulo G'' . Nos outros casos, a $\tan \delta$ foi maior que um através de toda a faixa de frequência (0.6–10.0 Hz). Assim, os sistemas PFCL-3 com e sem micropartículas apresentaram os maiores e menores valores de módulo G' , módulo G'' e viscosidade η' , respectivamente.

5.5.6 Análise do perfil de textura

As propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade e adesividade) de todas as formulações testadas estão apresentadas na Tabela 33. As formulações apresentaram

diferentes propriedades mecânicas que foram significativamente afetadas pela mudança na concentração de ACEP e de MI, pela presença de micropartículas contendo própolis e pela temperatura.

Tabela 33 - Propriedades mecânicas dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com e sem micropartículas de gelatina contendo própolis

Sistemas	Temperatura (°C)	Dureza ^{**} (N)	Compressibilidade ^{**} (N.mm)	Adesividade ^{**} (N.mm)
PFCL-2*	25	0,0378 ± 0,0016	0,2916 ± 0,0247	0,2520 ± 0,0188
	37	0,0358 ± 0,0019	0,2760 ± 0,0216	0,2472 ± 0,0196
PFCL-2	25	0,0373 ± 0,0024	0,3060 ± 0,0262	0,1955 ± 0,0132
	37	0,0385 ± 0,0035	0,3235 ± 0,0214	0,1560 ± 0,0134
PFCL-3*	25	0,0250 ± 0,0023	0,1652 ± 0,0108	0,1256 ± 0,0056
	37	0,0368 ± 0,0011	0,2880 ± 0,0179	0,2636 ± 0,0180
PFCL-3	25	0,0375 ± 0,0017	0,2850 ± 0,0219	0,0610 ± 0,0060
	37	0,0425 ± 0,0041	0,4795 ± 0,0167	0,2125 ± 0,0150
* sem micropartículas de gelatina contendo própolis			** média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas	

Aumentando a concentração de ACEP, aumentou significativamente a adesividade das formulações à 25 °C, diminuiu significativamente à 37 °C, e não houve diferença significativa na dureza e compressibilidade. Por outro lado, a adição de micropartículas de gelatina contendo própolis nas formulações aumentou significativamente a dureza e a compressibilidade, diminuindo a adesividade das formulações nas duas temperaturas testadas. Além disso o aumento de temperatura aumentou significativamente a compressibilidade e adesividade dos sistemas contendo micropartículas.

A compressibilidade e adesividade dos sistemas sem micropartículas foram significativamente diminuídas com o aumento da temperatura. Os menores valores de dureza e de compressibilidade foram exibidos pelo sistema PFCL-3 sem micropartículas e na temperatura de 25 °C. Essa formulação também demonstrou o maior valor de adesividade, à 37 °C. Ao contrário, o menor valor de adesividade foi demonstrado pela formulação PFCL-3 contendo micropartículas à 25 °C. Além disso, os maiores valores de dureza e compressibilidade foram demonstrados pelo sistema PFCL-3 contendo micropartículas.

5.5.7 Determinação da seringueabilidade

O trabalho requerido para expelir cada formulação a partir de uma seringa está apresentado na Tabela 34.

Tabela 34 - Seringueabilidade dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com e sem micropartículas de gelatina contendo própolis

Sistemas	Trabalho (N.mm) ^{**}
PFCL-2 [*]	10,86 ± 0,85
PFCL-2	10,73 ± 0,85
PFCL-3 [*]	19,87 ± 1,78
PFCL-3	16,54 ± 1,42

^{*} sem micropartículas de gelatina contendo própolis

^{**} média ± desvio padrão de, no mínimo, cinco replicatas

Aumentos significantes foram observados no trabalho de seringueamento com o aumento da concentração de ACEP. Além disso, a adição de micropartículas contendo própolis diminuiu significativamente o trabalho de seringueamento das formulações.

5.5.8 Determinação do teor de própolis

Os resultados obtidos para a determinação do teor de própolis nos sistemas contendo micropartículas estão descritos na Tabela 35.

Tabela 35 - Teor de própolis nos sistemas precursores de fase cristalina líquida contendo micropartículas

Sistemas	Teor (média ± s)			
	Método cromatográfico (CLAE) [*]			Método espectrofotométrico ^{**}
	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	
PFCL-2	0,0035 ± 0,0001	0,0056 ± 0,0003	0,0280 ± 0,0008	0,0238 ± 0,0007
PFCL-3	0,0035 ± 0,00003	0,0056 ± 0,0003	0,0282 ± 0,0014	0,0239 ± 0,0002

^{*} massa de crisina (g) por 100g de preparação ^{**} massa de quercetina (g) por 100 g de preparação

Os resultados obtidos através da espectrofotometria demonstraram a boa recuperação do método para a quantificação dos flavonóides totais em quercetina presentes nos sistemas (ICH, 1994). Obteve-se $98,88 \pm 2,95 \%$ e $98,95 \pm 1,00$ de recuperação para PFCL-2 E PFCL-3, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por cromatografia (Tabela 36).

Tabela 36 - Recuperação do método de quantificação por CLAE da própolis presente nos sistemas precursores de fase cristalina líquida

Sistemas	Recuperação (%) [*]		
	Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3
PFCL-2	$99,60 \pm 3,95$	$88,15 \pm 4,06$	$82,54 \pm 2,14$
PFCL-3	$99,99 \pm 0,72$	$88,89 \pm 4,07$	$83,10 \pm 4,07$

^{*} Cada valor representa a média $\pm$ desvio padrão.

5.6 Estudo do perfil de liberação in vitro da própolis a partir das preparações

Os perfis de liberação do extrato EFEI 2002, disperso 4% (V/V) em água, e das micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis (MPEFEI 2002) em função do tempo estão reportados na Figura 47.

Figura 47. Perfil de liberação da dispersão 4% (V/V) do extrato EFEI 2002 e das micropartículas de gelatina contendo própolis MPEFEI 2002.

Os perfis de liberação a partir dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis estão ilustrados na Figura 48.

Figura 48. Perfis de liberação a partir dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis PFCL-2 e PFCL-3.

Também foi avaliado o perfil de liberação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com extrato de própolis não-microencapsulado (Figura 49).

Figura 49. Perfis de liberação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida contendo extrato de própolis não-microencapsulado PFCL-2 e PFCL-3.

Figura 50. Perfis de liberação a partir dos sistemas semi-sólidos bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis SBTS-1 e SBTS-2.

Resultados semelhantes aos dos sistemas PFCL-2 e PFCL-3 foram obtidos para os sistemas bioadesivos termo-sensíveis SBTS-1 e SBTS-2 com micropartículas (Figura 50). Os valores obtidos na investigação do mecanismo de liberação de própolis a partir dos sistemas, utilizando transformações logarítmicas e análise dos mínimos quadrados, estão descritos na Tabela 37.

Tabela 37 – Análise dos dados obtidos com o ensaio de liberação in vitro a partir dos sistemas com micropartículas

Sistemas	Parâmetros (média $\pm$ s)		
	n	K (min ⁻ⁿ)	r ²
PFCL-2	0,8447 $\pm$ 0,0044	1,0374 $\pm$ 1,0150	0,9999
PFCL-3	0,8186 $\pm$ 0,0202	1,1703 $\pm$ 1,1024	0,9970
SBTS-1	0,95495 $\pm$ 0,0228	0,5891 $\pm$ 1,1181	0,9972
SBTS-2	0,8728 $\pm$ 0,0064	0,9141 $\pm$ 1,0301	0,9997

Os tempos requeridos para a liberação de 10, 30 ou 50% da concentração original de própolis a partir de cada sistema foram calculados e estatisticamente comparados. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 38.

Tabela 38 – Tempo necessário para a liberação de 10, 30 ou 50% da concentração original de própolis a partir dos sistemas desenvolvidos

Sistemas	Tempo (h)*		
	10%	30%	50%
PFCL-2	14,64 ± 0,59	53,62 ± 2,02	98,04 ± 3,58
PFCL-3	13,89 ± 2,81	52,97 ± 5,05	98,76 ± 5,85
SBTS-1	20,51 ± 1,84	62,26 ± 4,14	104,60 ± 5,69
SBTS-2	17,93 ± 6,36	54,55 ± 3,62	97,79 ± 5,95

*Os valores representam a média ± desvio padrão de, no mínimo, três replicatas.

O efeito da diferença na concentração de P407/C934P no tempo requerido para liberar 10, 30 ou 50% de própolis a partir dos sistemas SBTS não foi estatisticamente significativa.

Da mesma forma, o efeito da diferença de proporção ACEP/MI também não foi significativa no tempo necessário para liberar 10, 30 ou 50% de própolis a partir dos sistemas PFCL.

A Figura 51 ilustra os perfis de liberação de todos os sistemas, em conjunto, possibilitando uma análise comparativa entre os mesmos.

Os tempos requeridos para liberar 10% e 30% do teor de própolis a partir do sistema SBTS-1 foram significativamente maior em relação aos dos sistemas PFCL-2 e PFCL-3.

Além disso, a Figura 51 ilustra o perfil de liberação dos flavonóides totais expresso em massa por volume de meio coletado em cada amostragem, comparando com a concentração de flavonóides totais equivalente a maior CIM obtida para as micropartículas MPEFEI 2002.

(a)

(b)

Figura 51. Perfis de liberação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida, com micropartículas de gelatina contendo própolis, e dos sistemas semi-sólidos bioadesivos contendo micropartículas de própolis: (a) comparação dos perfis obtidos para os sistemas e (b) perfis de liberação em termos da concentração de flavonóides totais obtida em cada amostragem a partir dos sistemas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação das amostras de própolis, dos extratos e das micropartículas de gelatina contendo própolis

A substituição, adulteração e falsificação da droga vegetal, assim como a não uniformidade da composição química entre amostras de uma mesma espécie e contaminações microbiológicas, por metais pesados e por defensivos agrícolas, são frequentemente detectados na análise de insumos vegetais (FARIAS, 2000). Muitos destes problemas também são detectados na própolis (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000; PAMPLONA, 1997).

A flora existente ao redor do apiário, a qual pode variar de região para região, assim como a variabilidade de composição química, época e forma de coleta, situação e manejo das colméias, linhagem das abelhas, densidade populacional das colméias e localização do apiário também podem influenciar na qualidade da própolis (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000; FRANCO; BUENO, 1999). Somado a esses problemas, é importante ressaltar o grande número de formas de preparação de extrato de própolis sem controle e padronização (BRUSCHI et al., 2002; CUNHA et al., 2004).

Nesse sentido, o conjunto de critérios e o protocolo de análises adotados, desde a coleta das amostras de própolis até a obtenção dos extratos etanólicos, permitiram controlar e garantir a qualidade dos mesmos, ao quais foram utilizados na preparação de micropartículas contendo própolis.

A microencapsulação por *spray-drying* é uma técnica atraente por ser simples e referida como um método útil na produção de micropartículas em grande escala (BROADHEAD et al., 1992; PALMIERI; WEHRLÉ; STAMM, 1994; ZHANG; PING; XIAO, 2000). A utilização dessa técnica ainda é justificada pela capacidade de produzir micropartículas utilizando gelatina, como polímero formador de parede, de uma forma mais simples sem a utilização de agentes reticulantes, que podem levar a efeitos colaterais tóxicos (resíduos) ou reações não desejadas com o fármaco (BRUSCHI et al., 2003a; ESPOSITO et al., 1996; VENUGOPAL; SINGH, 2001).

As micropartículas produzidas utilizando-se os extratos EFEI 97 (MPEFEI 97) e EFEI 2002 (MPEFEI 2002) apresentaram um bom teor de umidade ($7,32 \pm 0,18\%$ e $5,81 \pm 0,23\%$, respectivamente), estando de acordo com os resultados obtidos por Bruschi et al. (2003a). Além disso, as mesmas mostraram-se esféricas e com uma superfície lisa e uniforme (Figura 12), com poucas depressões na superfície e pouca aglomeração. A presença de manitol em formulações obtidas por *spray-drying* melhora as características do material e evita a formação de agregados (WADE; WELLER, 1994). Além disso, o manitol é um poliálcool

utilizado como uma alternativa à sacarose e outros açúcares fermentáveis em formulações odontológicas (IMFELD, 1993; JORI, 1984; LOESCHE, 1984; LOESCHE et al., 1984).

O conhecimento da distribuição de tamanho das micropartículas é muito importante na tecnologia farmacêutica. Dependendo das características da partícula, a análise de distribuição de tamanho pode ser realizada por tamisação a seco ou a úmido, por microscopia óptica e eletrônica, por espalhamento de luz, por difração de laser, por elutriação, por sedimentação centrífuga e por permeabilidade e absorção em gás (BRUSCHI, 2002). Segundo Barber (1993), a microscopia óptica pode ser utilizada para análise de partículas com tamanho entre 0,5-500 μm , podendo ser determinada pelo diâmetro de Feret (valor médio da distância entre linhas paralelas tangentes ao perfil da partícula e perpendicular à escala ocular).

Neste trabalho, a análise de distribuição de tamanho de partículas foi realizada por microscopia óptica, utilizando-se como parâmetro de medição o da medida do diâmetro segundo Feret. Os resultados demonstraram que o tamanho médio das micropartículas ficou entre 2,27 e 2,48 μm , com pequena variação. Tais uniformidades de tamanho estão relacionadas com o sistema de agitação constante e as condições empregadas durante a secagem (BRUSCHI, 2002).

Estes resultados estão de acordo com a microscopia eletrônica de varredura (Figura 12) e com os resultados obtidos por Bruschi et al. (2003a), confirmando que as partículas obtidas possuem tamanho da ordem de micrômetros.

Considerando esses resultados e a boa eficiência de encapsulação (Tabela 12), ambas as micropartículas apresentaram características adequadas para serem utilizadas no desenvolvimento de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal (BRUSCHI, 2002).

Por outro lado, a combinação de temperatura, pequeno espaço e umidade proporcionam às colméias uma boa condição para crescimento de microrganismos (OTA et al., 2001). As atividades antibacteriana e antifúngica são as mais populares da própolis, figurando entre as suas ações biológicas mais extensivamente investigadas (D'AURIA et al., 2003; DE VARGAS et al., 2004; MARCUCCI, 1995; SALOMAO et al., 2004; SAWAYA et al., 2004; SILICI et al., 2005), sendo as de principal interesse no presente trabalho.

Portanto, a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos de própolis e das micropartículas foi avaliada frente a cepas de microrganismos provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC). Foram utilizadas cepas de microrganismos relacionados com as principais infecções do organismo e, especificamente, cepas de microrganismos importantes

em doenças orais (AZEVEDO et al., 1999; GEBARA; LIMA; MAYER, 2002; GIBBONS, 1984; KOO et al., 2000; LOESCHE, 1986; SEYMOUR; HEASMAN, 1992).

A técnica utilizada de difusão em agar é uma extensão daquela adotada nos laboratórios médicos para determinação da sensibilidade de bactérias isoladas aos antimicrobianos. Ambos os extratos apresentaram atividade frente a todas as cepas testadas, com halos de inibição de tamanhos próximos ao do controle positivo, principalmente para os microrganismos de importância oral, indicando uma boa atividade antibacteriana frente a esses microrganismos. Os resultados obtidos para os controles positivos e para o etanol controlaram os ensaios e descartam a possível interferência do etanol dos extratos na atividade antimicrobiana da própolis.

A utilização de micropartículas pode melhorar ou aumentar o efeito terapêutico de materiais biomédicos ou de fármacos (BARAS et al., 2000). Assim, o resultado esperado seria um maior tamanho dos halos de inibição para as micropartículas que de seus respectivos extratos. No entanto, as micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis não apresentaram atividade frente a todas as cepas testadas (Tabela 13). O tamanho da zona inibitória (halo de inibição) é reflexo da sensibilidade microbiana, da solubilidade e da quantidade de agente liberado nas primeiras horas após sua utilização. Bruschi et al. (2004) demonstraram que compostos menos polares, como o marcador 3 (Figura 11), possuem uma liberação mais lenta em água e que a estrutura da micropartícula pode dificultar a saída desses marcadores, aumentando o tempo de liberação dos mesmos. Além disso, as micropartículas, por estarem em um meio gelificado com pouca quantidade de água livre, provavelmente tiveram comprometimento na liberação das substâncias ativas (BRUSCHI et al., 2003a).

Essas deduções foram confirmadas pelos resultados obtidos através da determinação da CIM, onde as micropartículas (Tabela 14) apresentaram atividade frente a todas as cepas testadas. Isso se deve ao fato dessa técnica utilizar como meio caldo TSB, e não agar, proporcionando uma maior quantidade de água livre, facilitando a liberação e difusão das substâncias ativas tanto a partir dos extratos, como das micropartículas. Levando em consideração que a própolis sempre apresentou atividade, mesmo com a variabilidade de composição química nas diferentes regiões geográficas, devida as fontes diferentes de vegetais (KUJUMGIEV et al., 1999; MARKHAM et al., 1996), problemas semelhantes a esses foram observados ao se verificar que alguns autores relataram a atividade da própolis frente a *E. coli* e *P. aeruginosa* (DE VARGAS et al., 2004; GRANGE; DAVEY, 1990; SFORCIN et al., 2000; TOSI et al., 1996; WOISKY et al., 1994) e outros não (KUJUMGIEV et al., 1999, NIEVA MORENO et al., 1999). Bruschi et al. (2003a) observaram a atividade

antibacteriana de micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis frente a *S. aureus*, utilizando meio de cultura Mueller Hinton (caldo). Analisando as metodologias empregadas em todos esses estudos, observa-se que as técnicas que facilitaram a solubilização e/ou difusão do extrato e/ou substâncias ativas no meio, renderam os melhores resultados em termos de atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos pela técnica de determinação da CIM para os extratos foram menores ou iguais a 300 µg/mL, demonstrando boa atividade antimicrobiana frente às cepas testadas. Eles apresentaram menores valores de CIM frente a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* (ATCC 10231), *S. sanguinis* e *S. mitis*. A menor susceptibilidade para os extratos foi demonstrada frente a cepa de *L. casei*, sendo necessários 300 µg/mL de extrato EFEI 2002 para inibir o crescimento. Resultados similares foram obtidos com as micropartículas. No entanto, considerando o resíduo seco dos extratos (Tabela 6), a quantidade de extrato utilizado na preparação das micropartículas (Tabela 2) e a eficiência de encapsulação das micropartículas, que não foi maior que 86,44% (Tabela 12), a atividade das micropartículas foi maior que de seus respectivos extratos para alguns microrganismos. Os valores de CIM para as micropartículas foram de 37,5% a 60% menores que de seus respectivos extratos, para *E. salivarius*, *S. sanguinis* e *C. albicans*. Os controles positivos (penicilina, gentamicina e miconazol) apresentaram valores de CIM muito menores que aqueles dos extratos e das micropartículas. Entretanto, a atividade antimicrobiana dos extratos de produtos naturais é considerada muito importante em concentrações abaixo de 100 µg/mL (RIOS; RECIO, 2005), como foi obtido nesse estudo para *P. aeruginosa* (extratos e micropartículas MPEFEI 2002), *E. coli* (extratos), *C. albicans* ATCC 10231 (extratos e micropartículas), *E. salivarius* (micropartículas), *S. sanguinis* (extratos e micropartículas), *S. mitis* (extratos e micropartículas), *C. albicans* ATCC 28366 (micropartículas). Além disso, a própolis pode apresentar sinergismo antimicrobiano quando administrada juntamente com alguns antimicrobianos (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2005; HOLDERNA; KEDZIA, 1987; STEPANOVIC et al., 2003).

Dessa maneira, pôde ser verificado que os extratos produzidos apresentaram qualidade, com variações de valores dos parâmetros analisados em função da amostra de própolis utilizada na preparação dos mesmos, com destaque ao maior teor de flavonóides totais e ao teor dos marcadores obtidos por CLAE do extrato EFEI 2002 (Tabela 6 e Tabela 8, respectivamente). Uma maior eficiência de encapsulação de flavonóides totais e uma maior homogeneidade na eficiência de encapsulação dos marcadores obtidos por CLAE também foram obtidas pelas micropartículas MPEFEI 2002 (Tabela 12). Além disso, apesar da

semelhança entre as atividades antimicrobianas dos extratos e entre as das micropartículas, as micropartículas MPEFEI 2002 apresentaram uma maior atividade frente a *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *C. albicans* (ATCC 28366) que as micropartículas MPEFEI 97. Assim, utilizou-se o extrato EFEI2002 e as micropartículas MPEFEI 2002 no desenvolvimento dos sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal.

A concentração de própolis a ser utilizada nos sistemas foi estabelecida baseada na literatura e nos resultados obtidos através da avaliação físico-química e microbiológica do extrato EFEI 2002 e das micropartículas MPEFEI 2002.

A dispersão aquosa de 2 - 4% (V/V) é a forma normalmente utilizada de extrato de própolis na terapêutica (BURDOCK, 1998; DE VARGAS et al., 2004; KOSONOCKA, 1991; PAMPLONA, 1997), levando-se em consideração a variação no teor de substâncias ativas da droga e, conseqüentemente, do extrato, com a origem geográfica e época de coleta (BANKOVA, 2005; CUNHA et al., 2004; FRANCO, 2001). Concentrações inferiores a 2% demonstraram atividade *in vitro* do extrato etanólico de própolis brasileiras frente a bactérias anaeróbias orais periodontopatogênicas (FERES et al., 2005; GEBARA et al., 2002, 2003; SANTOS et al., 1999, 2002a,b; SONMEZ et al., 2005) e frente a espécies de *Candida* sp. (AZEVEDO et al., 1999; KUJUMGIEV et al., 1999; OTA et al., 2001; SANTOS et al., 2005; SAWAYA et al., 2002). Além disso, os resultados obtidos através da avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato EFEI 2002 e das micropartículas MPEFEI 2002 demonstraram atividade antimicrobiana em concentrações médias de 200 µg/mL.

Levando-se em consideração esses resultados, o teor de extrato de própolis (resíduo seco) nas micropartículas de gelatina e o fato de que os sistemas de liberação intrabolsa devem liberar o agente antimicrobiano por períodos prolongados de tempo nas bolsas afetadas em níveis maiores que a concentração inibitória mínima (CIM) para os microrganismos (MEDLICOTT et al., 1994), as concentrações de extrato EFEI 2002 e de micropartículas MPEFEI 2002 utilizadas nos sistemas foram de 4% (p/p) e de 6,41% (p/p), respectivamente.

Essa concentração de MPEFEI2002 está diretamente relacionada ao teor de resíduo seco do extrato EFEI 2002 na mesma, considerando ainda, a eficiência de encapsulação de flavonóides totais e dos marcadores.

6.2 Sistemas de liberação intrabolsa periodontal

O desenvolvimento de sistemas SLIB está diretamente relacionado ao sucesso do tratamento da doença periodontal (JONES et al., 2000; MEDLICOTT et al., 1994). Um

problema particular comum para muitos desses sistemas é a sua fraca retenção no sítio de aplicação (JONES et al., 1999). Esse problema pode ser resolvido pela utilização de polímeros que respondem a estímulos e/ou condições do ambiente (KABANOV et al., 2002), tais como polímeros termo-sensíveis e/ou bioadesivos, além de sistemas precursores de fase cristalina líquida liotrópica.

Nesse sentido, foram desenvolvidos dois sistemas inéditos para essa aplicação. O primeiro, baseado nas propriedades físico-químicas dos polímeros P407 (termo-sensível) e C934P (bioadesivo), e o segundo baseado na capacidade da mistura de ACEP e MI em formar fases cristalinas líquidas pela adição de água.

6.2.1 Desenvolvimento e caracterização de sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível

Vários estudos têm demonstrado resultados positivos com a utilização de sistemas semi-sólidos bioadesivos (NEEDLEMAN et al., 1998; VARSHOSAZ et al., 2002), principalmente de géis bioerodíveis, contendo agentes antiinflamatórios (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1998), anestésicos (SCHERLUND et al., 2000), inibidores de reabsorção óssea (REDDY; KUMAR; VEENA, 2005) ou antimicrobianos para o tratamento de doença periodontal (BROMBERG et al., 2001; JONES et al., 1996, 2000; KELLY et al., 2004; KIM et al., 2002; MAZE et al., 1996; PAGE, 2004; SCHWACH-ABDELLAOUI et al., 2002; SOSKOLONE et al., 1998; VINHOLIS et al., 2001). Adicionalmente, polímeros que apresentam aumento da viscosidade com o aumento da temperatura têm atraído um interesse crescente (CHUNG et al., 2002; KOFFI et al., 2006; NISBET et al., 2006), sendo muito utilizados em sistemas semi-sólidos de liberação intrabolsa periodontal (GABARRA et al., 2001; KELLY et al., 2004; SCHERLUND et al., 2000).

A associação de polímeros bioadesivos com polímeros termo-sensíveis possui a vantagem de poder formar sistemas administráveis por seringa, biodegradáveis e com controle da liberação de fármaco no fluido crevicular gengival (KOFFI et al., 2006; VARSHOSAZ et al., 2002). Além disso, eles podem interagir com o epitélio revestido de mucina e as superfícies do dente, pelo princípio da bioadesão, exibindo boa retenção no interior da bolsa pelo período de tempo desejável (JONES et al., 2000; VYAS et al., 2001).

Partindo desse pressuposto, utilizou-se P407 e C934P no desenvolvimento de um sistema semi-sólido bioadesivo termo-sensível para a liberação de própolis no interior da bolsa periodontal.

A utilização desses dois polímeros se justifica pelas suas características.

O P407 é um copolímero anfifílico composto por blocos de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP) em cadeia ($OE_x-OP_y-OE_x$), com a propriedade de gelificação termorreversível. As moléculas individuais dos blocos de copolímeros (unímeros) do P407 possuem a habilidade de se auto-organizarem em micelas quando em dispersões aquosas (micelização), em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) e com o aumento da temperatura, para minimizar a energia livre da solução (CABANA; AIT-KADI; JUHÁSZ, 1997). Assim, a formação de micelas, que podem ser esféricas, cilíndricas ou lamelares, dependendo do comprimento das cadeias de OE e OP, da concentração de polímero e da temperatura, leva ao aumento da viscosidade (KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002). As micelas de fase líquida formadas pelo P407 sofrem transições para fases de cristal líquido em resposta às mudanças na temperatura (IVANOVA; LINDMAN; ALEXANDRIDIS, 2002; SHARMA; BHATIA, 2004). Portanto, uma solução aquosa desse composto é um líquido claro a baixas temperaturas, formando um gel ao aquecimento (SCHMOLKA, 1972; TUNG, 1994), sendo de grande interesse no desenvolvimento de novos sistemas para liberação controlada de fármacos (BENTLEY et al., 1999; CARTHEW et al., 1996; JANNIN; POCHARD; CHAMBIN, 2006; KHIDR, 1994; KOFFI et al., 2006; REDDY; MURTHY, 2005; SHARMA; BHATIA, 2004). Além disso, o P407 é um polímero não-tóxico podendo ser utilizado em preparações de uso tópico (LEE et al., 2004; RICCI et al., 2002; SCHMOLKA, 1972), oftálmicas (EDSMAN et al., 1998), parenterais (KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002), vaginais (CHANG et al., 2002a,b), em supositórios (CHOI et al., 1999; EL-KAMEL; EL-KHATIB, 2006), em preparações orais e odontológicas (BASF, 2002).

Já o C934P é um carbômero pertencente a classe de polímeros sintéticos do ácido acrílico combinado, através de ligações cruzadas, com alilsacarose ou alil-éteres de pentaeritrol. Hidroexpansível e gelificante, com excelente estabilidade em viscosidades elevadas (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2001), o C934P possui uma ampla utilidade farmacêutica no preparo de cremes, géis, pomadas, preparações oftálmicas, retais, ou tópicas (BONACUCINA; MARTELLI; PALMIERI, 2004; BROMBERG, 2001; ISLAM et al., 2004). Nas últimas décadas têm sido muito utilizado em sistemas de liberação de fármaco, principalmente para administração ocular (EDSMAN; CARLFORS; HARJU, 1996) e nas cavidades vaginal (SHIN; KIM; OH, 2000) e oral (CHOI; KIM, 2000; LLABOT et al., 2004; NEEDLEMAN; SMALES, 1995; PATEL et al., 1999; SHIN; KIM; OH, 2000; SHIN; KIM, 2000), pelas suas propriedades mucoadesivas em baixas concentrações (BAEYENS et al.,

1998; BAI; CHANG; GUO, 1995; CHUN; CHO; CHOI, 2002; CLEARY; BROMBERG; MAGNER, 2004; LEE; PARK; ROBINSON, 2000; LUEBEN et al., 1996; RILEY et al., 2001; SHIN; KIM, 2000). Além disso, em ambiente alcalino, os grupos carboxila do C934P ionizam gerando cargas negativas ao longo do esqueleto polimérico que se repelem, causando a abertura e expansão da molécula que resulta no intumescimento do polímero e o aumento de viscosidade. Isoladamente em concentrações de C934P inferiores a 0,5% não formam gel (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2001), mas as proporções utilizadas no presente estudo em associação ao P407 contribuem para a viscosidade do sistema (SHIN; BUM; CHOI, 2000).

A manipulação da rede estrutural de sistemas poliméricos pode proporcionar uma série de formulações com uma ampla faixa de propriedades físicas. As formulações poliméricas binárias, preparadas com proporções diversas de P407 e C934P, foram diferentes quanto à aparência e consistência. Os mesmos resultados foram obtidos por Shin et al. (2000) ao preparar géis mucoadesivos contendo P407 e C934P em diferentes proporções. Esses mesmos autores verificaram, ainda, que o pH afeta a viscosidade, porém o agente neutralizante (tampão tris, trietanolamina ou solução de hidróxido de sódio) não afeta de forma direta. Por outro lado, a utilização de trietanolamina como agente neutralizante (pH 6,9 – 7,1) para as formulações do presente estudo foi justificada pelo fato de proporcionar a utilização clínica e aumentar a propriedade de bioadesão das formulações (MUSIAL; KUBIS, 2004; TAMBURIC; CRAIG, 1995). Assim, a avaliação das propriedades apresentadas pelas formulações preparadas, monopoliméricas e poliméricas binárias, foram importantes para prever e entender o comportamento *in vivo* dos sistemas bioadesivos termo-sensíveis propostos.

A natureza reológica das formulações preparadas foi dependente da temperatura e da concentração de cada componente polimérico. Na reometria de cisalhamento contínuo, as formulações monopoliméricas contendo P407 exibiram diferentes comportamentos de fluxo (Figura 15). Estes resultados estão de acordo com as propriedades reológicas nas quais soluções aquosas diluídas de P407 apresentam fluxo Newtoniano, o qual é modificado para fluxo plástico com uma mudança pronunciada na fluidez em concentrações superiores a 10% e com o aumento da temperatura (SCHMOLKA, 1972). Além disso, o comportamento pseudoplástico com vários graus de valor de rendimento e tixotropia apresentado pelas formulações monopoliméricas contendo C934P (Figura 16) é característico de formulações aquosas contendo esse polímero (CHU et al., 1992; CLARKE, 1993).

O comportamento de cisalhamento contínuo apresentado pelas formulações binárias (Figuras 17, 18 e 19) foi influenciado pela temperatura e pela concentração de cada polímero.

Na temperatura de 5 °C, as formulações apresentaram baixo índice k (Tabela 15), existindo na forma líquida. Por outro lado, em temperaturas mais elevadas (25 e 37 °C), as formulações binárias exibiram índices de consistência maiores, existindo no estado semi-sólido.

Tem sido reportado que a viscosidade de formulações aquosas contendo poloxamer aumenta com o aumento da concentração polimérica e com a temperatura (SCHMOLKA, 1972). Em contraste, formulações aquosas de Carbopol® apresentam diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura (CLARKE, 1993). Conseqüentemente, o comportamento de fluxo das formulações binárias foi devido, em parte, às propriedades reológicas do P407 e do C934P.

As formulações binárias exibiram fluxo pseudoplástico, típico de pomadas e cremes, géis ou outros semi-sólidos (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001; JONES; LAWLOR; WOOLFSON, 2004). As respostas não-lineares para a tensão de cisalhamento exibidas por essas formulações nas três temperaturas foram resultado das alterações estruturais causadas pelo cisalhamento. Provavelmente, as formulações consistiam primariamente de moléculas poliméricas de cadeia longa no estado de relaxamento. Com a exposição à tensão de cisalhamento, as cadeias poliméricas se desemaranharam e alinharam ao longo da direção do cisalhamento, liberando o solvente que tinha sido previamente aprisionado nos emaranhados moleculares. Como resultado, o cisalhamento subsequente aconteceu mais prontamente e a viscosidade aparente diminuiu. A propriedade de diminuição da viscosidade com o cisalhamento é desejável em formulações desenvolvidas para a administração intrabolsa periodontal (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). Por exemplo, durante a expulsão a partir de uma seringa, em altas taxas de cisalhamento, o material fluirá prontamente, facilitando a administração clínica. Entretanto, em condições de baixo cisalhamento, tais como aquelas que ocorrem na bolsa periodontal, o material adotará uma mais alta consistência, retornando às propriedades reológicas originais que ele possuía antes da administração. Como a temperatura de administração para os sistemas será acima de 25 °C e a temperatura no interior da bolsa periodontal é da ordem de 34 a 37 °C (SEYMOUR; HEASMAN, 1992), para algumas formulações a recuperação das propriedades reológicas originais acontecerá junto com a gelificação do sistema.

A reopexia observada para as formulações poliméricas binárias contendo 10 ou 15% (p/p) de P407 com 0,10 ou 0,15% (p/p) de C934P, nas temperaturas de 25 e 37 °C, indica que a restauração da configuração molecular relaxada resultou em uma maior viscosidade aparente e necessitou apenas de um curto período de tempo após a remoção da tensão de cisalhamento. Além do mais, o baixo grau de tixotropia das formulações binárias contendo

15% (p/p) de P407 com 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P e daquelas contendo 20% (p/p) de P407 com 0,10 ou 0,15% (p/p) de C934P também indica um curto período de tempo para a restauração da configuração molecular relaxada. Esses atributos são vantajosos para formulações que são desenvolvidas para a administração intrabolsa periodontal, pois melhorará a retenção das mesmas dentro do ambiente. A natureza tixotrópica das formulações contendo 20% (p/p) de P407 com 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P foi vista como menos adequada para a corrente aplicação.

As propriedades viscoelásticas proporcionam informação a respeito da natureza estrutural da formulação e a resposta reológica a forças sub-destrutivas, propriedades estas que influenciam diretamente na performance de sistemas semi-sólidos (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001; ANDREWS; JONES, 2006). No presente estudo, as propriedades viscoelásticas das formulações foram caracterizadas através da reometria oscilatória.

Para a maioria das amostras, aumentando a concentração de P407 e de C934P, seja nas formulações monopoliméricas ou poliméricas binárias, aumentou significativamente o módulo G' , o módulo G'' e a viscosidade η' . Esse comportamento pode ser creditado diretamente ao aumento do emaranhado polimérico, que resulta em resistência aumentada à deformação polimérica (ANDREWS; JONES, 2006; CHU et al., 1992). Além disso, pode ser o resultado de uma forte associação do emaranhado de moléculas de P407 com as de C934P, devido à formação de ligações secundárias. Esse fenômeno físico foi previamente observado para sistemas compostos de poloxamer com ácido poliacrílico, principalmente via ponte de hidrogênio e interação iônica (CHANG et al., 2002b; SHIN; KIM; OH, 2000).

De forma interessante, nas formulações monopoliméricas contendo 10, 15 ou 20% (p/p) de P407 (5 °C) e 10% (p/p) de P407 (25 °C), o módulo G'' excedeu o módulo G' sobre toda a faixa de frequência e, assim, essas formulações podem ser descritas com soluções poliméricas elastoviscosas (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). O mesmo comportamento foi observado para as formulações monopoliméricas contendo 0,10% (p/p) de C934P e para as formulações poliméricas binárias contendo 10% (p/p) de P407 com 0,10; 0,15; 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P, em todas as temperaturas. Em contraste, para todas as outras formulações, o módulo G' excedeu o módulo G'' sobre toda a faixa de frequência aplicada e, assim, esses sistemas são mais apropriadamente descritos como géis ou semi-sólidos (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001).

Nas formulações poliméricas binárias contendo 15% (p/p) de P407 (25 e 37 °C) ou 20% (p/p) de P407 (37 °C), a magnitude do módulo G' excedeu o valor esperado (calculado),

evidenciando um sinergismo reológico entre P407 e C934P. Por exemplo, pontes de hidrogênio envolvendo grupos carboxila neutralizados do C934P e grupos hidroxilas do P407 ou, alternativamente, envolvendo interações de Van der Waal ou relacionadas (ANDREWS et al., 2005; CHANG et al., 2002a). Como a magnitude do sinergismo reológico observado entre P407 e C934P foi dependente da proporção destes dois polímeros e da temperatura, uma interação ótima entre os mesmos pode ser definida (ANDREWS; GORMAN; JONES, 2005; JONES; LAWLOR; WOOLFSON, 2004).

Considerando a utilização proposta dessas formulações, têm sido reportado que a elasticidade das mesmas é importante para assegurar a resistência à deformação e, assim, a boa retenção do sistema dentro da bolsa periodontal (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). Dentro desse contexto, a utilização das formulações binárias contendo 15% (p/p) de P407 são as mais apropriadas.

A viscosidade η' é comumente empregada para caracterizar a natureza viscosa de sistemas viscoelásticos (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001; MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993). Nesse estudo, a viscosidade η' de cada formulação foi dependente da frequência oscilatória, de acordo com o modelo de Maxwell para a resposta de materiais viscoelásticos frente a tensões oscilatórias (MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993). Assim, em altos valores de frequência, as propriedades viscosas de cada formulação dominaram, enquanto, em baixos valores de frequência, a contribuição elástica para a resposta viscoelástica foi considerável. Com o aumento da frequência oscilatória, a magnitude da viscosidade η' diminuiu devido ao relativamente curto período de tempo disponível durante cada ciclo de oscilação para deformações viscosas (tempo dependentes). Além disso, aumentando a concentração de cada componente polimérico, aumentou significativamente a viscosidade η' , refletindo os efeitos desses polímeros na viscosidade das formulações.

A $T_{\text{sol/gel}}$ corresponde à temperatura caracterizada por uma drástica mudança no comportamento reológico e no G' (CHANG et al., 2002a; CHUNG et al., 2002). O módulo G' , uma medida da energia estocada e recuperada por ciclo de deformação, reflete o componente sólido do comportamento elástico (ALMDAL et al., 1993). Antes do ponto de gelificação, G' é baixo e a amostra é caracterizada como um líquido elástico. A partir do ponto de gelificação, ele aumenta e a amostra é caracterizada como gel (sólido viscoso). A última fase consiste de uma estabilização dos valores do módulo G' (RICCI et al., 2002).

As formulações monopoliméricas contendo 10% (p/p) de P407 não aumentaram significativamente a viscosidade η' com o aumento da temperatura, não exibindo $T_{\text{sol/gel}}$. Considerando que uma solução aquosa de P407 apresenta $T_{\text{sol/gel}}$ apenas a partir da

concentração de 15% (p/p) (SCHMOLKA, 1972), as concentrações crescentes de C934P adicionadas nas formulações poliméricas binárias contendo 10% (p/p) de P407 não foram suficientes para aumentar significativamente a viscosidade η' com o aumento da temperatura. A formulação monopolimérica contendo 15% (p/p) de P407 exibiu valor de $T_{sol/gel}$ menor que as formulações poliméricas binárias correspondentes. Em contraste, a formulação monopolimérica contendo 20% (p/p) de P407 apresentou valor de $T_{sol/gel}$ maior que os das formulações poliméricas binárias correspondentes. Esses resultados estão de acordo com os obtidos para o parâmetro de interação, o qual demonstrou os maiores valores para as formulações contendo 15% (p/p) de P407.

A $T_{sol/gel}$ da maioria das formulações poliméricas binárias demonstrou-se adequada, podendo garantir o comportamento de gel no interior da bolsa periodontal. Ambas as formulações contendo 15 e 20% (p/p) de P407 existiram na forma líquida a temperatura ambiente e gelificaram na temperatura da bolsa periodontal humana. Usualmente, as temperatura de gelificação têm sido consideradas adequadas se elas estiverem entre 25 e 37 °C (CHANG et al., 2002a). Se a $T_{sol/gel}$ de uma formulação termo-sensível é mais baixa que 25°C, um gel poderia ser formado à temperatura ambiente dificultando a manufatura, manuseio e administração do mesmo. Além disso, se a $T_{sol/gel}$ é maior que 37 °C, o estado líquido persiste no interior da bolsa periodontal, resultando na saída e perda do sistema a partir do sítio-alvo. As formulações poliméricas binárias apresentaram valores de $T_{sol/gel}$ na faixa de 21,84 a 34,74 °C. Além disso, as formulações polimérica binárias que exibiram valores de $T_{sol/gel}$ maiores que 25 °C foram aquelas contendo 15% (p/p) de P407.

Como para a viscosidade η' , o aumento da concentração de cada polímero aumentou a dureza, a compressibilidade e a adesividade das formulações monopoliméricas, reforçando o aumento do emaranhado polimérico discutido anteriormente (JONES et al., 2000; JONES; LAWLOR; WOOLFSON, 2004). De forma similar aos efeitos nas propriedades viscoelásticas, as propriedades de dureza, compressibilidade e adesividade das formulações poliméricas binárias contendo 15% (p/p) de P407 (25 °C) ou 20% (p/p) de P407 (25 e 37 °C) foram maiores que a soma das contribuições individuais e contribuem para a evidência de sinergismo reológico. Como anteriormente, os efeitos das misturas binárias no sinergismo reológico foram dependentes da razão da concentração entre os polímeros e da temperatura. Isso infere que uma faixa ótima de temperatura e de proporção entre P407 e C934P existe, refletindo a disponibilidade de grupos acessíveis em cada polímero para interação molecular.

Nesse estudo, as propriedades de fluxo compressional de várias formulações poliméricas foram determinadas utilizando análise do perfil de textura, uma técnica que tem

sido empregada para examinar as propriedades de fluxo compressional de sistemas farmacêuticos semelhantes (ANDREWS; GORMAN; JONES, 2005; JONES et al., 1999, 2000; JONES; LAWLOR; WOOLFSON, 2002; JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997a). A relação entre compressibilidade e a fácil administração de formulações farmacêuticas na bolsa periodontal, através de seringa, tem sido reportada (JONES et al., 2000), sendo esse parâmetro particularmente útil para a avaliação da adequabilidade dos sistemas. Essa técnica permitiu definir a resistência máxima à deformação compressional (dureza) e o trabalho necessário para comprimir a amostra (compressibilidade) (JONES et al., 1996).

Na análise de textura, a adesividade refere ao trabalho necessário para superar as ligações entre a amostra e a prova, sendo determinada a partir da área sobre a curva força-distância na parte de tensão do gráfico (JONES et al., 1999). Trata-se de uma medida da interação e da adesividade (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997b), sendo a informação proporcionada por essa técnica útil para a aplicação pretendida, visto que tem sido reportada a relação entre bioadesão e adesividade para formulações bioadesivas (JONES et al., 2000). As formulações monopolímericas contendo P407 exibiram adesividade apenas na concentração de 20% (p/p). Além disso, as formulações monopolímericas contendo C934P exibiram adesividade na concentração de 0,25% (p/p) e na temperatura de 25 °C. Entretanto, as formulações poliméricas binárias contendo 10% (p/p) de P407 com 0,25% (p/p) de C934P exibiram adesividade na temperatura de 25 °C. Adicionalmente, as formulações binárias contendo 15 ou 20% (p/p) de P407 também exibiram adesividade a 37 °C ou a 25 e 37 °C, respectivamente. Esses resultados reforçam a interação entre os polímeros e atuam como uma evidência de mucoadesão, favorecendo uma melhor retenção da formulação dentro da bolsa periodontal (JONES et al., 1996, 1999, 2000).

A propriedade de mucoadesão das formulações foram examinadas através da utilização do método de tensão, como previamente descrito (JONES et al., 2000; JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997b), empregando um disco de mucina parcialmente hidratado como substrato. Como a força de coesão das ligações associadas com algumas formulações foram menores que das ligações formulação-mucina, a quantificação direta de sua mucoadesão não pôde ser determinada. A formulação polimérica binária contendo 15% (p/p) de P407 com 0,25% (p/p) de C934P, assim como aquelas contendo 20% (p/p) de P407 com 0,10; 0,15; 0,20 ou 0,25% (p/p) de C934P, exibiram força mucoadesiva que foi significativamente aumentada com o aumento da concentração polimérica. É aceito que o C934P possui propriedades mucoadesivas (CHANG et al., 2002a, HANGERSTROM; EDSMAN, 2001; TAMBURIC; CRAIG, 1995). Assim, a possibilidade de um maior contato

entre as duas interfaces permitiu o movimento de água a partir da formulação para o disco de mucina, assegurando intumescimento da mucina e possibilitando a interpenetração das cadeias de mucina com as cadeias poliméricas da formulação. Considerando as concentrações poliméricas utilizadas nas formulações, a quantidade de água foi suficiente para produzir intumescimento da mucina, assegurando a força de ligação adesiva entre essa e a formulação. Adicionalmente, não foi observado diminuição da força bioadesiva das formulações devido o problema de super hidratação da interface entre as duas fases aderentes, como tem sido reportado (WOOLFSON et al., 1995).

O número de grupos de ácido carboxílico livres (não carregados) presentes nas cadeias poliméricas do C934P pode afetar a propriedade de mucoadesão do mesmo (GANDHI; ROBINSON, 1994). Entretanto a utilização de trietanolamina como agente neutralizante nas formulações contendo C934P proporcionou uma boa performance mucoadesiva das formulações (Tabela 20). Esses resultados estão de acordo com Tamburic e Craig (1995). Esses pesquisadores relataram que sistemas neutralizados exibiram uma maior densidade de carga que sistemas não neutralizados, devido a presença de base para promover a dissociação. É conhecido que a natureza expandida da rede polimérica contribui significativamente para a força de mucoadesão, assim, a natureza não-emaranhada das moléculas poliméricas dentro das formulações neutralizadas pode ser explicada por esses efeitos. Além disso, foi observado que cátions monovalentes, como o hidróxido de sódio, reduzem o intumescimento de ácidos poliacrílicos (DURRANI et al., 1994), afetando a mucoadesão.

Os segmentos de OP do P407 podem agregar formando o núcleo de micelas em resposta ao aumento da temperatura. Adicionalmente, os segmentos de OE são exteriorizados formando a coroa (BROMBERG et al., 2004; SCHMOLKA et al., 1972). Como estão presentes grupo hidroxilas nos segmentos de OE, que podem formar pontes de hidrogênio com os grupos carboxila do C934P, esses últimos são também exteriorizados contribuindo para a interpenetração das cadeias poliméricas de mucina com as formulações. Assim, a temperatura do interior da bolsa periodontal é favorável a uma boa performance da propriedade mucoadesiva das formulações.

Além disso, os valores da $\tan \delta$ foram menores para as formulações mais mucoadesivas (Figuras 25, 27, 29 e Tabela 20), indicando que a mucoadesão é maior em sistemas com um componente elástico maior, como previamente sugerido (TAMBURIC; CRAIG, 1995).

Adicionalmente, o trabalho de seringueamento das formulações poliméricas binárias foi determinado na temperatura de 25 °C, utilizando um analisador de textura no modo de

compressão. O aumento do trabalho de seringueamento associado com concentrações aumentadas de P407 e de C934P dentro das formulações é provavelmente devido ao concomitante aumento da viscosidade dos produtos como reportado anteriormente. Os valores de trabalho observados para todas as formulações (Tabela 21) foram similares ou menores que aqueles reportados para outros sistemas semi-sólidos desenvolvidos para a administração intrabolsa periodontal (JONES et al., 1996, 1999, 2000; KELLY et al., 2004), sendo muito desejável com relação a uma fácil administração.

A partir dos resultados obtidos, pôde ser inferido que as formulações poliméricas binárias contendo 15% (p/p) de P407 exibiram as melhores características para serem utilizadas no desenvolvimento de um sistema SBTS para liberação de própolis intrabolsa periodontal. Além disso, considerando os resultados semelhantes obtidos para as formulações poliméricas binárias contendo 0,10 e 0,15% (p/p) de C934P, assim como entre aquelas contendo 0,20 e 0,25% (p/p) de C934P, as formulações contendo 15% (p/p) de P407 com 0,10% (p/p) de C934P (SBTS-1) ou com 0,25% (p/p) de C934P (SBTS-2) foram selecionadas para o desenvolvimento do sistema.

Em ensaios preliminares observou-se que as micropartículas de gelatina contendo extrato de própolis MPEFEI2002 intumesciam e se desestruturavam quando incorporadas nos géis SBTS-1 e SBTS-2, não podendo ser utilizadas. Por outro lado, o extrato etanólico de própolis possui uma determinada complexidade química responsável por características particulares como a adesividade e a formação de agregados estruturados que aprisionam boa parte dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica (BRUSCHI, 2002). Levando ainda em consideração as propriedades reológicas dos sistemas e as propriedades físico-químicas do P407 e do C934P, utilizou-se, de forma inédita, o extrato EFEI2002 na preparação de micropartículas *in situ* nos sistemas SBTS-1 e SBTS-2.

Foram avaliadas três temperaturas (15, 20 e 25 °C) de preparação das micropartículas de extrato de própolis nos géis, onde a temperatura de 20 °C possibilitou a obtenção dos melhores resultados (Figuras 31 e 32).

A análise de distribuição de tamanho de partículas preparadas *in situ* nos sistemas demonstrou que as micropartículas formadas apresentam diâmetro médio em torno de 1,0 µm, apresentando uma pequena variação de tamanho, sendo observado uma distribuição de tamanho ligeiramente maior das micropartículas presentes no sistema SBTS-2 (Tabela 23). Tais diferenças de tamanho podem ser consequência das viscosidades diferentes dos sistemas. Por outro lado, a uniformidade de tamanho das partículas em cada preparação estão

relacionadas com a agitação constante e as condições empregadas durante a preparação *in situ* (BRUSCHI, 2002).

Os sistemas SBTS-1 e SBTS-2 com micropartículas de própolis apresentaram, ainda, valores de densidade muito próximos do da água. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que mais de 80% (p/p) dos sistemas sejam constituídos por água. Além disso, o sistema SBTS-2, que possui uma quantidade ligeiramente inferior de água (84,02%) em relação ao SBTS-1 (84,18%), apresentou valor de densidade ligeiramente maior.

A incorporação de micropartículas de própolis nas formulações poliméricas binárias contendo P407 e C934P pode alterar o comportamento reológico das mesmas. Chang et al. (2002a) observaram que diferenças na composição de géis bioadesivos termo-sensíveis podem levar a alterações dramáticas no comportamento reológico. Nesse sentido, o estudo do comportamento de fluxo de sistemas SBTS pode prever a estabilidade física (CILEK; CELEBI; TIRNAKSIZ, 2006; PATEL et al., 2001), o comportamento quando da administração (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001; LABBA, 1993), o espalhamento por todos os locais no interior da bolsa (MEDLICOTT et al., 1994, STOLTZE, 1995) e a recuperação da estrutura dos mesmos após a administração (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). Além disso, as tensões oscilatórias associadas com o movimento gengival, tais como falar e mastigar, podem produzir deformação dinâmica não-destrutível na formulação, sendo importante entender a resposta da mesma frente a tais tensões (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). Portanto, as propriedades reológicas dos sistemas semi-sólidos bioadesivos termo-sensíveis contendo micropartículas de própolis, desenvolvidos para a administração intrabolsa periodontal, foram caracterizados por técnicas destrutivas (reometria de fluxo) e não-destrutivas (reometria oscilatória).

A natureza reológica dos dois sistemas foi dependente da temperatura, da presença de micropartículas de própolis e da concentração de C934P na formulação. Os resultados obtidos a partir da reometria de cisalhamento contínuo demonstraram que o comportamento de fluxo dos sistemas SBTS continuou sendo do tipo pseudoplástico, com baixo grau de área de histerese e de valor de rendimento. O valor de rendimento aumentou principalmente a partir de 25 °C. Além disso, a temperatura influenciou no aparecimento de tixotropia, indicando que o período de tempo necessário para a restauração da configuração molecular original é curto. Esses resultados favorecem a manutenção dessas preparações na bolsa após a administração (EOUANI et al., 2001; JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001).

Na temperatura de 5 °C, os sistemas SBTS exibiram índices de consistência baixos (Tabela 24), existindo na forma líquida. Porém, nas temperaturas maiores (25 e 37 °C), eles

exibiram índices de consistência maiores, existindo como uma forma sólida. Por outro lado, levando em consideração o gradiente de cisalhamento aproximado para a operação de injetar através de uma seringa hipodérmica (1.000 a 10.000 s^{-1}) (SCHRAMM, 1998), os valores de rendimento e de índice k observados para os dois sistemas não dificultam a administração (NORLING et al., 1992) e favorecem o espalhamento dos mesmos no interior da bolsa (JONES et al., 1996).

Os valores de índice k obtidos, levando em consideração a temperatura e o gradiente de cisalhamento, estão de acordo com os relatados por Norling et al. (1992) e contribuem para a manutenção dos géis no sítio de aplicação. O k dos sistemas SBTS foi aumentado com a presença das micropartículas de própolis (Tabela 24), principalmente na temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. No entanto, na temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ o k diminuiu no sistema SBTS-1. Esses resultados e os observados para as áreas de histerese (Figuras 35 e 36) indicam a influência dos compostos do extrato de própolis e da concentração de C934P na viscosidade dos sistemas. Podemos inferir que em temperaturas próximo de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a influência na queda de consistência dos componentes da própolis (resina, cera de abelhas, etc.) foi maior no sistema.

Através da análise oscilatória, foi observado que a presença de micropartículas de própolis aumentou os módulos G' e G'' e a viscosidade η' , nas temperaturas de 25 e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, com o aumento resultante da resistência à deformação. Além disso, somente na temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ os sistemas SBTS apresentaram características elastoviscosas ($G'' > G'$). Por outro lado, em todas as outras condições, o G' excedeu o G'' sobre toda a faixa de frequência aplicada, sendo os sistemas descritos como viscoelásticos (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989). Considerando a proposta de utilização clínica desses sistemas, a elasticidade dos mesmo nas temperaturas de 25 e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ é importante para assegurar resistência a deformação, proporcionando uma boa retenção dentro da bolsa (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001).

Nessas temperaturas (25 e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), a viscosidade η' foi dependente da frequência oscilatória para os dois sistemas, concordando com as respectivas formulações sem micropartículas de própolis e com o modelo de Maxwell para a resposta de materiais viscoelásticos frente a tensões oscilatórias (MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993). Além disso, nessas mesmas temperaturas, a viscosidade η' foi aumentada com o aumento da concentração de C934P ou com a presença de micropartículas de própolis, indicando, mais uma vez, a influência destes na viscosidade dos sistemas.

A adição das micropartículas de própolis interferiu, ainda, na $T_{\text{sol/gel}}$ dos sistemas SBTS (Tabela 25). A transição sol/gel é induzida por um aumento na temperatura, mas depende da concentração de polímero e presença de aditivos tais como sais e outros

polímeros. O aumento da concentração destes proporciona um aumento da força do gel e uma diminuição da $T_{sol/gel}$ (EDSMAN et al., 1998). Com a incorporação do extrato etanólico de própolis, foi observada uma queda de 5,76 °C na $T_{sol/gel}$ do sistema SBTS-1 (16,58 %) e de 4,31 °C na $T_{sol/gel}$ do sistema SBTS-2 (13,51 %), o que não prejudica a administração intrabolsa dos mesmos (JONES et al., 2000). Choi et al. (1999) e BASF (2002) relataram que o etanol aumenta a $T_{sol/gel}$ de dispersões aquosas de P407. Levando em consideração que o teor alcoólico do extrato EFEI2002 é de 83,33 % (V/V) e que a quantidade adicionada foi muito pequena (4%), o etanol não influenciou na $T_{sol/gel}$ dos sistemas. Além disso, o método preliminar utilizado para a determinação da $T_{sol/gel}$ proporcionou resultados muito próximos aos obtidos pela reologia, demonstrando ser um técnica útil.

A administração de sistemas semi-sólidos no interior da bolsa periodontal requer a utilização de uma seringa e, assim, as propriedades de fluxo desses sistemas são de importância clínica. Como previamente discutido, sistemas semi-sólidos para administração intrabolsa periodontal deveriam exibir baixa viscosidade durante a administração, tixotropia ou reopexia mínimas e, ainda, seguindo a administração, deveriam possuir viscosidade de alto equilíbrio (estado de equilíbrio) para assegurar que haja uma retenção adequada dentro da bolsa. Assim, o fluxo após a aplicação de forças de compressão será similar àquele que ocorre durante a administração utilizando uma seringa (ANDREWS; GORMAN; JONES, 2005). Nesse sentido, as propriedades mecânicas (dureza, compressibilidade e adesividade) dos sistemas são fundamentais para a performance clínica dos mesmos (JONES et al., 2000). Através da análise do perfil de textura, foi observado que a adição de micropartículas de própolis aumentou os valores das propriedades mecânicas, principalmente do sistema SBTS-2 (Tabela 26).

Como os dois sistemas apresentaram adesividade na temperatura de 37 °C (Tabela 26), as propriedades mucoadesivas dos mesmos foram examinadas. No entanto, a força das ligações responsáveis pela coesão do sistema SBTS-1 foram menores que a das ligações sistema-mucina, e o exame direto da mucoadesão desse sistema não pôde ser executado. Já o sistema SBTS-2 exibiu força mucoadesiva que foi diminuída com a adição de micropartículas de própolis. Assim, provavelmente os componentes do extrato de própolis interagiram com as cadeias poliméricas dos sistemas, diminuindo a habilidade das mesmas de interpenetrarem nas cadeias de mucina.

A seringueabilidade dos dois sistemas SBTS contendo micropartículas de própolis também foi determinada na temperatura de 25 °C. Temperatura normalmente encontrada no ambiente dos consultórios odontológicos. As diferenças no trabalho de seringueamento

associadas com a presença das micropartículas não foram significantes, apesar do aumento concomitante nas viscosidades dos sistemas, como reportado anteriormente. Os valores de trabalho observados (Tabela 28) foram desejáveis com relação a uma fácil administração (injeção) (JONES et al., 1996, 1999, 2000; KELLY et al., 2004).

O teor de própolis nos sistemas SBTS-1 e SBTS-2 contendo micropartículas, obtidos através da espectrofotometria (Tabela 29), demonstraram a boa recuperação do método para a quantificação dos flavonóides totais em quercetina presentes nos sistemas (ICH, 1994), com resultados similares pelo método cromatográfico (Tabelas 29 e 30).

6.2.2 Desenvolvimento e caracterização de sistema precursor de fase cristalina líquida

Os sistemas formadores de mesofases cristalinas líquidas liotrópicas têm merecido destaque na liberação de fármacos (HYDE, 2001). Por possuírem características físicas que os posicionam entre os sólidos e os fluidos, com parcial ordenamento das espécies atômicas, são também chamados de mesofases, onde o prefixo grego meso significa intermediário. Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados de liotrópicos (EZRAHI; ASERIN; GARTI, 1999).

Estudos demonstraram o desenvolvimento e avaliação de um sistema de liberação de metronidazol intrabolsa periodontal precursor de fase cristalina líquida (AINAMO et al., 1992; KLINGE et al., 1992; NORLING et al., 1992; PEDRAZZOLI et al., 1992; STOLTZE, 1992, 1995). Quando a mistura de um triglicerídeo e óleo de gergelin (sésamo) entram em contato com a água, ocorre a formação de um estado cristalino líquido, aumentando a viscosidade (FRIBERG; QUENCER; HILTON, 1996) e facilitando a retenção da formulação no interior da bolsa periodontal (NORLING et al., 1992). Espósito et al. (1996) também avaliaram uma formulação para liberação de tetraciclina intrabolsa baseada em monoglicerídeos com capacidade de formar fase cristalina líquida em contato com a água.

O álcool cetílico etoxilado 20-OE e propoxilado 5-OP (ACEP) é um tensoativo não iônico multifuncional, atuando em uma ampla faixa de pH, é emoliente hidrossolúvel, com boa tolerância a eletrólitos, atóxico e não irritante (CRODA, 2002). Produzido pela reação do álcool cetílico com uma mistura dos óxidos de etileno e propileno, é de grande utilidade em formulações farmacêuticas e cosméticas (CRODA, 1995). Possui características físico-químicas bastante interessantes para utilização no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos.

Foi observada a capacidade do sistema composto por ACEP e MI, emoliente de características hidrofóbicas (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2001), em formar mesofases cristalinas líquidas (micelares, lamelares e hexagonais), quando adicionado de água (URBAN et al., 2004). Assim, a entrada de líquido proveniente dos fluidos biológicos no interior da bolsa periodontal, principalmente do fluido crevicular gengival, pode exercer um papel formador de sistemas mesofásicos cada vez mais estruturados e com viscosidade maior. Dessa maneira, com uma concentração de água igual ou superior a 20% forma-se fase hexagonal (URBAN, 2004), como foi observado para os sistemas baseados em monoglicerídeos desenvolvidos para a liberação de tetraciclina (ESPOSTIO et al., 1996) e de metronidazol (NORLING et al., 1992; STOLTZE, 1995).

Essas características levaram, de forma inédita, à utilização do sistema ACEP-MI para a liberação de própolis intrabolsa periodontal.

No desenvolvimento do sistema precursor de fase cristalina líquida com micropartículas de gelatina contendo própolis (PFCL), foi levada em consideração a necessidade de desenvolvimento de um produto que fosse homogêneo, administrável pela seringa e que não tivesse água em quantidade suficiente para o intumescimento e degradação das micropartículas de gelatina até a aplicação, visto que a preparação de micropartículas de própolis *in situ* nesse sistema não é possível. As fórmulas com 5% de água e 5 ou 10% de MI (PFCL-2 e PFCL-3, respectivamente) originaram as suspensões de micropartículas mais homogêneas.

Para obter uma suspensão aceitável, o valor de F deve ser no mínimo 0,9 para uma hora (GABRIËLS; PLAIZIER-VERCAMMEN, 2004). No entanto, para a proposta do presente trabalho, um período bem mais longo deve ser considerado. Para PFCL-2, contendo uma menor quantidade de água, os primeiros sinais de sedimentação foram vistos somente após oito horas (Tabela 31). Após 7 dias o valor de F foi de 0,89, o que significa que o sistema possui uma boa estabilidade física. O segundo sistema (PFCL-3) também demonstrou sedimentação somente após 8 horas ($F = 0,98$). Analisando os valores de F para todos os tempos, pode ser observado que a estabilidade física do sistema PFCL-3 foi um pouco maior. Isso pode ser explicado pela maior quantidade de água contida nesse sistema, que proporciona uma maior viscosidade ao mesmo. Além disso, ambos os sistemas foram de fácil redispersão, com micropartículas íntegras e bem distribuídas (Figura 39).

Levando em consideração a densidade relativa do ACEP (1,050) (CRODA, 2002), do MI (0,850-0,855) (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2001) e das características físico-químicas

das micropartículas, foi observado que a densidade relativa dos sistemas diminuiu com a maior quantidade de MI e de água incorporada nos mesmos.

Formas farmacêuticas semi-sólidas podem apresentar uma grande variedade de comportamentos reológicos. As dispersões (suspensões e emulsões) apresentam características de fluxo e viscoelásticas dependentes da fração de volume, distribuição do tamanho das partículas/gotas e viscosidade da fase dispersa (WOOLFSON et al., 2000). O entendimento do comportamento reológico é muito importante no desenvolvimento de tais sistemas, uma vez que afetará uma grande parte dos parâmetros de performance dos mesmos, incluindo as características de liberação de fármaco, características de administração, de espalhabilidade e retenção no interior da bolsa periodontal e as operações utilizadas na preparação. Dessa maneira, como as micropartículas de gelatina contendo própolis estão dispersas no sistema precursor de fase cristalina líquida, o comportamento reológico das mesmas pode prever a estabilidade física (PATEL et al., 2001), a facilidade de administração (LABBA, 1993), o espalhamento por todos os locais e a manutenção da preparação no interior da bolsa (JONES et al., 1997; MEDLICOTT et al., 1994, STOLTZE, 1995). Assim, o comportamento reológico (propriedades de fluxo e viscoelásticas) foi avaliado na temperatura ambiente (25 °C) e na temperatura corporal (37 °C).

As propriedades de fluxo das formulações periodontais determinam as características de administração do produto no interior da bolsa periodontal e a recuperação após a administração (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). A natureza reológica das formulações precursoras de fase cristalina líquida foi dependente da temperatura, da presença de micropartículas e da concentração de ACEP e MI. Na reometria de cisalhamento contínuo, as formulações exibiram o mesmo comportamento de fluxo, pseudoplástico com vários graus de tixotropia, nas duas temperaturas testadas (Figuras 40 e 41). Através da curva de viscosidade em função do gradiente de cisalhamento (Figura 42), observou-se que a viscosidade aparente das preparações diminuiu com o aumento do gradiente de cisalhamento, indicando que a recuperação da estrutura é tempo-dependente. Observou-se ainda, que a preparação PFCL-2 apresentou viscosidade maior que a preparação PFCL-3, com ou sem micropartículas.

As preparações contendo micropartículas apresentaram maior tixotropia que aquelas sem micropartículas, principalmente à 25 °C, comportamento característico de suspensões (FALKIEWICZ, 1996; JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). As respostas não-lineares para a tensão de cisalhamento exibidas pelas formulações nas duas temperaturas foram, assim, resultantes das mudanças estruturais causadas pelo cisalhamento. As formulações consistem

primariamente de compostos de alto peso molecular (ACEP e MI), organizados em micelas com água, onde as micropartículas de própolis foram dispersas. Após a exposição ao gradiente de cisalhamento, as dispersões fluíram, as cadeias do ACEP e do MI se alinharam ao longo da direção do cisalhamento, liberando água ou água e micropartículas (no caso das preparações com micropartículas). Como resultado, um cisalhamento subsequente ocorreu mais prontamente e a viscosidade aparente diminuiu. A diminuição da viscosidade com o cisalhamento é uma propriedade desejável para as formulações desenvolvidas para serem administradas na bolsa periodontal (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). Em altos gradientes de cisalhamento, tais como aqueles que ocorrem durante a expulsão a partir de uma seringa, o material fluirá prontamente, facilitando a administração clínica com sucesso. No entanto, sob condições de baixo cisalhamento, tais como aquelas que ocorrem no interior da bolsa periodontal, o material adotará uma consistência mais alta, recuperando as propriedades reológicas originais que possuía antes da administração.

Além do mais, o baixo grau de tixotropia observado para os sistemas precursores de fase cristalina líquida contendo micropartículas, principalmente à 37 °C, indica que para a restauração da configuração reológica original foi necessário apenas um curto período de tempo após a remoção da tensão de cisalhamento (depois da administração). Este atributo é uma vantagem para esses sistemas, pois favorece a retenção dentro do ambiente da bolsa periodontal.

As propriedades viscoelásticas proporcionam informações a respeito da natureza estrutural da formulação e a resposta reológica à tensões sub-destrutivas, as quais influenciam diretamente na performance de um sistema semi-sólido (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). No presente estudo, as propriedades viscoelásticas dos sistemas, com e sem micropartículas de própolis, foram caracterizadas por reometria oscilatória.

O aumento da concentração de ACEP aumentou significativamente o módulo G' , o módulo G'' e a viscosidade η' das preparações sem micropartículas ao longo de toda a faixa de frequência testada, nas duas temperaturas, podendo ser diretamente relacionado ao aumento das interações entre as moléculas do tensoativo e o número aumentado de moléculas do mesmo nas micelas, resultando em um aumento da resistência do sistema à deformação. Por outro lado, o aumento da concentração de ACEP nas formulações contendo micropartículas, nas duas temperaturas testadas, diminuiu significativamente o módulo G' , o módulo G'' e a viscosidade η' ao longo de toda a faixa de frequência testada, provavelmente devido à presença das micropartículas que diminuíram a organização dos sistemas.

Ainda nos sistemas contendo micropartículas, na temperatura de 25°C, o G' excedeu o G'' ao longo de toda a faixa de frequência testada (viscoelástico). Em contraste, as outras formulações, nas duas temperaturas testadas, G'' foi maior que G' ao longo de toda a faixa de frequência testada. Assim, essas formulações são mais apropriadamente descritas como elastoviscosas (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). Levando em consideração a proposta de uso dessas formulações, tem sido reportado que a elasticidade das mesmas é importante para assegurar a resistência à deformação e, assim a boa retenção dentro da bolsa periodontal (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001). Nesse contexto, esses sistemas precursores de fase cristalina líquida contendo micropartículas são apropriados.

A viscosidade η' é comumente empregada para caracterizar a natureza viscosa de sistemas viscoelásticos (JONES; BROWN; WOOLFSON, 2001; MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993). As formulações contendo micropartículas apresentaram viscosidade η' dependente da frequência oscilatória, de acordo com o modelo de Maxwell para a resposta de materiais viscoelásticos submetidos à tensão oscilatória (MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993). Com o aumento da frequência oscilatória, a magnitude da viscosidade η' diminuiu devido ao período de tempo disponível relativamente curto durante cada ciclo de oscilação para as deformações viscosas (tempo-dependentes). Assim, em altas frequências, as propriedades viscosas de cada sistema dominaram, enquanto, em valores de frequência mais baixos, a contribuição elástica à resposta viscoelástica foi considerável.

As propriedades mecânicas de formulações tópicas influenciam diretamente a performance clínica das mesmas. Existem muitos estudos reportando a utilização da análise do perfil de textura (APT) para a caracterização mecânica de uma gama de sistemas semi-sólidos a serem administrados no interior da bolsa periodontal (JONES et al., 1996, 1997, 1999, 2000; JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997a,b; JONES; WOOLFSON; DJOKIC, 1996).

A compressibilidade descreve o trabalho requerido para comprimir o produto através de uma distância fixa e o trabalho necessário para o espalhamento do produto sobre a superfície da prova (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997b). A presença de micropartículas aumentou a compressibilidade dos sistemas. Aqueles contendo micropartículas apresentaram um aumento da compressibilidade com o aumento da temperatura, indicando uma maior organização dos sistemas, como observado para as propriedades viscoelásticas.

Além disso, a dureza dos sistemas foi também influenciada pela presença de micropartículas, aumentando nas duas temperaturas. Os sistemas contendo micropartículas

apresentaram dureza aumentada com o aumento da temperatura, como observado para a compressibilidade. A dureza e a compressibilidade são parâmetros reológicos que quantificam a deformação de um produto sob compressão e cisalhamento. Assim, os efeitos da temperatura, da presença de micropartículas e da concentração de ACEP e de MI nesses parâmetros podem ser explicados pela influência na viscosidade dos sistemas (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997b).

A adesividade em APT é comumente definida como o trabalho necessário para superar as forças atrativas entre a superfície da amostra e a superfície da prova (JONES et al., 1996). Entretanto, essa medida pode em alguns casos envolver a quebra de ligações coesivas dentro da amostra e, assim, é parcialmente dependente da coesão (alinhavo) da mesma (JONES; WOOLFSON; BROWN, 1997b). Assim, os efeitos da concentração dos componentes da formulação em sua adesividade são devidos às interações aumentadas entre as moléculas e a prova analítica e também devido à coesão aumentada. A adição de micropartículas diminuiu a adesividade devido, provavelmente, à diminuição da coesividade do produto e das interações com a prova analítica, estando de acordo com os outros resultados mecânicos obtidos. Por outro lado, o aumento do alinhavo nas formulações e/ou das interações entre as moléculas e a prova analítica pode ser inferido quando a concentração de ACEP é aumentada, à 25 °C, e quando a temperatura é aumentada para os sistemas contendo micropartículas.

A seringueabilidade dos sistemas foi também determinada através de um analisador de textura que é apropriado para testar formulações a serem administradas remotamente em sítios supragengivais e bolsas periodontais através de seringa (JONES et al., 1999). A diminuição do trabalho de seringueamento com o aumento da concentração de ACEP nas formulações testadas foi provavelmente devida à concomitante diminuição da viscosidade à 25 °C, como reportado anteriormente. Os valores obtidos de trabalho para todas as formulações testadas foram similares ou menores que aqueles reportados para outros sistemas semi-sólidos desenvolvidos para serem administrados no interior da bolsa periodontal (JONES et al., 1996; 1999; 2000; KELLY et al., 2004).

Os resultados da determinação do teor de própolis nas preparações contendo micropartículas, obtidos por espectrofotometria e por CLAE, demonstraram a boa recuperação dos métodos para a quantificação da própolis contida nos sistemas PFCL-2 e PFCL-3 (Tabelas 35 e 36).

6.3 Estudo do perfil de liberação *in vitro* da própolis a partir das preparações

Os testes *in vitro* fornecem condições apropriadas para a realização de medidas de liberação reproduzíveis e precisas, importantes para distinguir diferentes formulações com o mesmo fármaco, a mesma formulação após envelhecimento ou mudança de processo, como também durante o processo de produção. Quando adequadamente realizados, servem para monitorar processos de fabricação durante a fase de desenvolvimento e otimização de formulações, e após a aprovação do produto, além de prever o comportamento do sistema *in vivo* e minimizar o risco da falta de bioequivalência entre lotes (SKOUG et al., 1997). Esses testes não substituem a necessidade de trabalho clínico, mas podem localizar com precisão, durante o desenvolvimento da formulação, os fatores determinantes da cinética de liberação do fármaco (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). Nesse sentido, foi realizado o teste de liberação *in vitro* para as preparações contendo própolis.

A dispersão 4% (V/V) é a forma normalmente utilizada na terapêutica para administração do extrato etanólico de própolis (BURDOCK, 1998; FRANCO, 2001; KOSONOCKA, 1991; PAMPLONA, 1997). Observou-se que praticamente toda a concentração de flavonóides totais (97,57%) do extrato EFEI 2002 foi liberada nas primeiras oito horas, apresentando um modelo de cinética de liberação semelhante ao de primeira ordem (Figura 47).

As micropartículas MPFEI 2002 apresentaram perfil similar ao do extrato EFEI 2002 (Figura 47), com uma liberação mais lenta dos flavonóides totais. Em oito horas, apenas 34% do total foram liberados.

Esse modelo para a cinética de liberação dos flavonóides totais a partir do extrato e das micropartículas de gelatina também foi observado por Bruschi et al. (2004), quantificando através de CLAE os três marcadores liberados, nas mesmas condições deste teste.

No desenvolvimento de um sistema de liberação intrabolsa periodontal, a avaliação do perfil de liberação *in vitro* é uma etapa fundamental (FRIEDMAN; GOLOMB, 1982; GABARRA, 2002; SOSKOLONE; FREIDMAN, 1996; TAN; PEH; AL-HANBALI, 2000) e o sucesso do método é atingido quando as condições experimentais (temperatura, meio de dissolução e agitação ou fluxo) são adequadas, simulando ao máximo as condições *in vivo* (BERRETTA, 2003).

Vários autores têm reportado a utilização de equipamentos e de condições que buscam mimetizar as condições do ambiente interno da bolsa periodontal (ESPOSITO et al., 1996; JONES et al., 2000; NORLING et al., 1992; PERIOLI et al., 2004). No entanto, essas

condições são bastante particulares, principalmente em relação ao volume e constituição do meio de dissolução (MEDLICOTT et al., 1994). Gabarra (2002) desenvolveu e avaliou um dispositivo mimetizador de bolsa periodontal para estudos *in vitro* de liberação de fármacos. O dispositivo fundamentado na liberação por fluxo, possibilitou simular as condições de fluxo, volume e composição do meio de dissolução, e a aplicação de carreadores com diferentes concentrações de fármacos. No entanto, ocorreram vários problemas quanto ao controle de fluxo, ao ambiente (espaço) simulado e ao material coletado para análise.

Os sistemas de liberação por fluxo (sistemas de fluxo) é uma variação dos métodos de dissolução que não usa cesta nem pá. O perfil de liberação é obtido pelo fluxo de solvente através de uma câmara e o monitoramento contínuo da concentração liberada de fármaco. O resultado concentração-tempo depende do volume de solvente, da sua velocidade de fluxo e da distância entre a célula de liberação e o dispositivo coletor/detector ou, mais precisamente, do volume vazio de solvente (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Assim, os sistemas foram avaliados *in vitro* quanto à liberação do extrato de própolis em um dispositivo de fluxo especialmente desenvolvido para as preparações semi-sólidas, com fluxo de saliva artificial e temperatura controlados, simulando o máximo possível as condições do interior da bolsa periodontal.

O sistema de liberação foi isolado com filme de PVC, auxiliando na manutenção da temperatura, e protegido da luz, para evitar uma possível degradação dos flavonóides (ZUANAZZI, 2000). Além disso, o tempo de 10 minutos antes de iniciar o fluxo foi importante para os sistemas atingirem a temperatura desejada ($37 \pm 0,5$ °C).

A saliva artificial utilizada como meio de dissolução contempla as características iônicas e de viscosidade, sendo muito próximas das da saliva natural e do fluido crevicular gengival (NAKAMOTO, 1979). Além disso, o fluxo de $0,9 \pm 0,05$ µL/min é um valor médio normalmente relatado em casos de doença periodontal (GABARRA, 2002; KLINGE et al., 1992; MEDLICOTT et al., 1994; STOLTZE, 1992).

O problema do volume vazio de solvente no sistema (FLORENCE; ATTWOOD, 2003) foi resolvido pela padronização do tamanho da conexão que liga a célula ao tubo coletor e pela contagem do tempo de liberação somente depois que o meio entrou em contato com a amostra. Como o fluxo é muito pequeno, os tempos de amostragem foram de 24 h, o que permitiu a coleta de um teor de flavonóides totais passível de quantificação.

As preparações PFCL-2 e PFCL-3 apresentaram liberação prolongada (Figura 48), com perfis muito semelhantes, sendo a concentração total liberada em sete dias de 76,71% e

de 77,21%, respectivamente. Dessa forma, pode ser inferido que a variação no teor de água e de MI não influenciou no perfil de liberação das duas preparações.

Também foi avaliado o perfil de liberação dos sistemas precursores de fase cristalina líquida com extrato de própolis não-microencapsulado (Figura 49), onde foi observada a liberação lenta dos flavonóides por um período de 144 horas (seis dias), porém não prolongada como as obtidas com o extrato microencapsulado. Esses resultados demonstram a capacidade do sistema polimérico e das micropartículas em prolongar a liberação de própolis.

Resultados semelhantes aos dos sistemas PFCL-2 e PFCL-3 foram obtidos para os géis bioadesivos SBTS-1 e SBTS-2 com micropartículas (Figura 50). O gel SBTS-1 liberou 77,60% de flavonóides totais em sete dias, uma quantidade inferior à do SBTS-2 (79,72%).

O mecanismo de liberação de própolis a partir dos sistemas foi investigado através da equação geral (equação 14) que descreve a liberação de fármaco a partir de sistemas poliméricos matriciais (KORSMEYER et al., 1983), utilizando transformações logarítmicas e análise dos mínimos quadrados (equação 15). Nesse contexto, $n = 0,5$ indica liberação controlada por difusão fickiana (HIGUCHI, 1963) e $n = 1$ indica uma liberação controlada puramente pelo relaxamento das cadeias poliméricas (transporte Caso II). Valores intermediários indicam um comportamento anômalo (cinética não fickiana correspondente aos fenômenos de difusão e de relaxamento do polímero) (RITGER; PEPPAS, 1987). Ocasionalmente, valores de $n > 1$ têm sido observados, os quais estão relacionados com cinéticas do tipo Super Caso II (LLABOT; MANZO; ALLEMANDI, 2004; MUNDAY; COX, 2000).

Os valores de n para os sistemas PFCL-2 e PFCL-3 foram maiores que 0,5 e menores que 0,89 (Tabela 37), indicando um comportamento anômalo (MUNDAY; COX, 2000) onde a cinética de liberação (não fickiana) foi determinada pela saída dos flavonóides totais a partir das micropartículas de gelatina e a difusão através da fase cristalina líquida formada, juntamente com o processo de relaxamento do ACEP, envolvendo a entrada de água e as alterações de fase.

Alguns estudos relataram que a liberação de fármaco a partir de sistemas matriciais compostos por P407 seguem o modelo de cinética de ordem zero (BHARDWAJ; BLANCHARD, 1996; ZHANG et al., 2002), onde a liberação do fármaco é controlada principalmente pela dissolução do gel que pela difusão (GILBERT et al., 1986; MOORE et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que as micelas de P407 aparentemente servem como reservatório para a liberação de substâncias, sendo úteis na liberação prolongada de fármacos a partir sistemas semi-sólidos (SUH; JUN, 1996), e que géis mais concentrados dissolvem

mais lentamente que os menos concentrados devido à diminuição do coeficiente de difusão da água no gel (ANDERSON; PANDIT; MALLAPRAGADA, 2001).

O valor de n obtido para o gel SBTS-1 (Tabela 37) foi muito próximo de 1, indicando que o mesmo apresentou um comportamento muito próximo da cinética de ordem zero, o que concorda com a composição da matriz que é constituída por 99,34% de P407 e apenas 0,66% de C934P. A associação de P407 e C934P é um processo endotérmico que ocorre para um ganho de entropia quando a interação entre os polímeros permite a restauração da estrutura de pontes de hidrogênio livres de água, reestruturando o processo de micelização (BARREIRO-IGLESIAS; ALVAREZ-LORENZO; CONCHEIRO, 2003). Assim, o C934P não teve grande influência na cinética de liberação dos flavonóides a partir do gel SBTS-1.

A associação de P407 com outros polímeros tem também demonstrado que a liberação de fármaco a partir dessas matrizes pode seguir a cinética de raiz quadrada do tempo, onde $n = 0,5$ (PAAVOLA; YLIRUUSI; ROSENBERG, 1998). Para n do gel SBTS-2, foi obtido um valor intermediário de 0,5 e 1, indicando um comportamento anômalo (RITGER; PEPPAS, 1987) com a cinética de liberação dos flavonóides sendo governada pela difusão através da matriz e pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Assim, pode ser observado que a maior concentração de C934P no gel SBTS-2 alterou o modelo da cinética de liberação.

Analisando os valores obtidos para a constante de cinética K , foi observado que os sistemas PFCL-2 e PFCL-3 apresentaram valores ligeiramente maiores que os géis SBTS-1 e SBTS-2, indicando uma velocidade maior de liberação. Comparando os valores de K dos sistemas PFCL-2 e PFCL-3, foi observado que a cinética de liberação de PFCL-3 foi um pouco maior. Essa diferença foi mais acentuada entre os géis SBTS-1 e SBTS-2. Esses resultados podem ser observados através da Figura 50.

Adicionalmente, foi verificado que não houve diferença significativa entre os tempos requeridos para liberar 10, 30 ou 50% de própolis a partir dos sistemas SBTS ou PFCL. Contudo, o SBTS-1 exibiu liberação mais lenta em relação aos sistemas PFCL, principalmente nos tempos requeridos para liberar 10% e 30% do teor original de própolis. A Figura 51 ilustra o perfil de liberação dos flavonóides totais expresso em massa por volume de meio coletado em cada amostragem. Foi plotado, ainda, a concentração de flavonóides totais equivalente a maior CIM obtida para as micropartículas MPEFEI 2002, demonstrando que os sistemas liberaram controladamente (CHIEN, 1992; JONES; LAWLOR; WOOLFSON, 2004) por sete dias uma concentração bem acima do nível terapêutico obtido *in vitro*.

7 CONCLUSÕES

- As amostras de própolis apresentaram boa qualidade, com características muito semelhantes às de outras coletadas ou não na mesma região.
- Os extratos produzidos demonstraram qualidade, com pequenas variações de valores dos parâmetros analisados em função da amostra de própolis utilizada na preparação dos mesmos.
- As micropartículas de gelatina contendo própolis apresentaram boas características físico-químicas, podendo ser utilizadas no desenvolvimento de sistema de liberação de própolis intrabolsa periodontal.
- Os extratos etanólicos de própolis demonstraram atividade frente a bactérias importantes em doenças orais e frente a bactérias relacionadas com casos de superinfecção. Além disso, a técnica de microencapsulação por *spray-drying* não alterou a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente a cepas de bactérias testadas.
- Foi possível o desenvolvimento de dois sistemas semi-sólidos inéditos para a liberação intrabolsa periodontal de própolis inéditos: (i) sistema bioadesivo termo-sensível e (ii) sistema precursor de fase cristalina líquida.
- O sistema bioadesivo termo-sensível, formado por poloxamer 407 e Carbopol 934P®, possibilitou a preparação de micropartículas de própolis *in situ*. Além disso, os dois sistemas obtidos apresentaram temperatura de gelificação, comportamento reológico e mecânico, de mucoadesão, de seringueabilidade e teor de própolis adequados para a liberação intrabolsa periodontal.
- Os sistemas precursores de fase cristalina líquida, formados por álcool cetílico etoxilado 20-OE e propoxilado 5-OP com miristato de isopropila e micropartículas de gelatina contendo própolis, apresentaram comportamento reológico e mecânico, seringueabilidade e teor de própolis adequados, podendo ser utilizados na liberação intrabolsa periodontal.

- A determinação do perfil de liberação *in vitro* a partir dos sistemas desenvolvidos demonstrou que a própolis pode ser liberada de forma controlada por um período superior a sete dias no interior da bolsa periodontal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ABELHAS. Minas Gerais: **Revista Minas Faz Ciência n. 9**, Fapemig, Minas Gerais. Disponível em: <[http:// revista.fapemig.br/9/propolis.html](http://revista.fapemig.br/9/propolis.html)>. Acesso em: 01 outubro 2002.
- ABREU, E. G.; ESTRADA, E. C.; LÓPEZ, A. R.; ILLANCE, M. P. Atividade anticáries de una crema dental con propóleos. **Rev. Cubana Estomatol.**, Havana, v. 37, n. 3, p. 166-170, 2000.
- ABREU, E. G.; ESTRADA, E. C.; LÓPEZ, A. R.; RODRÍGUEZ, B. O. Estudio comparativo del efecto del cepillado con una crema dental con propóleos rojos y de un gel con clorofila. **Rev. Cubana Estomatol.**, Havana, v. 35, n. 3, p. 112-118, 1998.
- ADDY, M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 13, p. 957-964, 1986.
- ADDY, M.; HASSAN, H.; MORAN, J.; WADE, W.; NEWCOMBERT, R. Use of antimicrobial containing acrylic strips in the treatment of chronic periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 59, n. 9, p. 557-564, 1988.
- ADDY, M.; LANGEROUDI, M. Comparison of the immediate effects on the subgingival microflora of acrylic strips containing 40% chlorhexidine, metronidazole or tetracycline. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 11, n. 6, p. 379-386, 1984.
- ADDY, M.; RAWLE, L.; HANDLEY, R.; NEWMAN, H. N.; COVENTRY, J. F. The development and *in vitro* evaluation of acrylic strips and dialysis tubing for local drug delivery. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 53, n. 11, p. 693-699, 1982.
- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Tóquio, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.
- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K. S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **J. Agric. Food Chem.**, Davis, v. 52, n. 24, p. 7286-7292, 2004.
- AHUJA, A.; ALI, J.; RAHMAN, S. Bioadegradable periodontal intrapocket device containing metronidazole and amoxycillin: formulation and characterisation. **Pharmazie**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 25-29, 2006.
- AHUJA, A.; ALI, J.; SARKAR, R.; SHAREEF, A.; KHAR, R. K. Targeted retentive device for oro-dental infections: formulation and development. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 259, p. 47-55, 2003.
- AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, Filadelfia, v. 23, n. 5, p. 489-515, 1997.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- AIMETTI, M.; ROMANO, F.; TORTA, I.; CIRILLO, D.; CAPOSIO, P.; ROMAGNOLI, R. Debridement and local application of tetracycline-loaded fibres in the management of persistent periodontitis: results after 12 months. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, p. 166-172, 2004.
- AINAMO, J.; LIE, T.; ELLINGSEN, B. H.; HANSEN, B. F.; JOHANSSON, L. A.; KARRING, T.; KISCH, J.; PAUNIO, K.; STOLTZ, K. Clinical responses to subgingival application of a metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, n. 9, p. 723-729, 1992.
- AKALIN, F. A.; BALTACIOGLU, E.; SENGÜN, D.; HEKIMOGLU, S.; TASKIN, M.; ETIKAN, I.; FISENK, I. A comparative evaluation of the clinical effects of systemic and local doxycycline in the treatment of chronic periodontitis. **J. Oral Sci.**, Tóquio, v. 46, n. 1, p. 25-35, 2004.
- ALEKSEJÚNIENÉ, J.; HOLST, D.; ERIKSEN, H. M.; GJERMO, P. Psychosocial stress, lifestyle and periodontal health. A hypothesised structural equation model. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 29, p. 326-335, 2002.
- ALMDAL, K.; DYRE, J.; HVIDT, S.; KRAMER, O. Towards a phenomenological definition of term gel. **Polym. Gels Netw.**, Londres, v. 1, p. 5-17, 1993.
- AL-SHAHER, A.; WALLACE, J.; AGARWAL, S.; BRETZ, W.; BAUGH, D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. **J. Endod.**, Chicago, v. 30, n. 5, p. 359-361, 2004.
- ANDERSON, B. C.; PANDIT, N. K.; MALLAPRAGADA, S. K. Understanding drug release from poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) gels. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 70, p. 157-167, 2001.
- ANDLAUER, W.; MARTENA, M. J.; FÜRST, P. Determination of selected phytochemicals by reversed-phase high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v. 849, p. 341-348, 1999.
- ANDREWS, G. P.; GORMAN, S. P.; JONES, D. S. Rheological characterisation of primary and binary interactive bioadhesive gels composed of cellulose derivatives designed as ophtalmic viscosurgical devices. **Biomaterials**, Guilford, v. 26, p. 571-580, 2005.
- ANDREWS, G. P.; JONES, D. S. Rheological characterization of bioadhesive binary polymeric systems designed as platforms for drug delivery implants. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 3, p. 899-906, 2006.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antim. Chemother.**, Oxford, v. 48, s. 1, p. 5-16, 2001.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568p.

ASO, K.; KANNO, S.-I.; SATOH, S.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 27, n. 5, p. 727-730, 2004.

ASTUDILLO, S. L.; AVILA, R. F.; MORRISON, A. R.; GUTIERREZ, C. M.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Biologically active compounds from Chilean propolis **Bol. Soc. Chil. Quim.**, Santiago, v. 45, n. 4, p. 1-5, 2000.

AWARTANI, F. A.; ZULQARNAIN, B. J. Comparison of the clinical effects of subgingival application of metronidazole 25% gel and scaling in the treatment of adult periodontitis **Quintessence Int.**, Londres, v. 29, n. 1, p. 41-48, 1998.

AZAD, A. A. Novel drugs and vaccines based on the structure and function of HIV pathogenic proteins including Nef. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, Nova Iorque, v. 1056, p. 279-292, 2005.

AZEVEDO, I. B. S.; SAMPAIO, R. F.; MONTES, J. C.; CONTRERAS, R. L. L. Tratamento de escaras de decúbito com própolis. **Rev. Bras. Enf.**, Brasília, v. 39, p. 33-37, 1986.

AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C.; SALVETTI, C.; REZENDE, F. H. C. Candida sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and Periogard. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 30, p. 335-341, 1999.

BAAKILINI, M. F.; LARA, E. H. G.; PANZERI, H. Adición de própolis en formulaciones de dentífricos. Evaluación de sus propiedades y estabilidad **Rev.Fola/Oral**, São Paulo, n. 6, p. 130-132, 1996.

BADERSTEN, A. NILVÉUS, R.; EGELBERG, J. Effect of nonsurgical periodontal therapy I. Moderately advanced periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 8, p. 57-72, 1981.

BAEYENS, V.; KALTSATOS, V.; BOISRAMÉ, B.; VARESIO, E.; VEUTHEY, J.-L.; FATHI, M.; BALANT, L. P.; GEX-FABRY, M.; GURNY, R. Optimized release of dexamethasone and gentamicin from a soluble ocular insert for the treatment of external ophthalmic infections. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 52, p. 215-220, 1998.

BAI, J. P. F.; CHANG, L. L.; GUO, J. H. Effects of polyacrylic polymers on the luminal proteolysis of peptide drugs on the colon. **J. Pharm. Sci.**, Nova Iorque, v. 84, n. 11, p. 1291-1294, 1995.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V. S.; CHRISTOV, R. S.; TEJERA, A. D. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. **Phytochemistry**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 1414-1415, 1999.

BANKOVA, V. S.; DYULGEROV, A.; POPOV, S. S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O.; ZANJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, Les Ulis, v. 23, p. 79-85, 1992.

- BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, Les Ulis, v. 29, p. 361-367, 1998.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Volatile constituents of propolis. **Z. Naturforsch.**, Tümbibgen, v. 49 c, p. 6-10, 1994.
- BANKOVA, V.S.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, Tübingen, v. 50, p. 1-6, 1995.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 8, p. 16-23, 2001.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother. Res.**, Londres, v. 15, p. 561-571, 2001.
- BARANOWSKA, I.; RARÓG, D. Application of derivative spectrophotometry to determination of flavonoid mixtures. **Talanta**, Londres, v. 55, p. 209-212, 2001.
- BARAS, B.; BENOIT, M. A.; POULAIN-GODEFROY, O.; SCHACHT, A. M.; CAPRON, A.; GILLARD, J.; RIVEAU, G. Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. **Vaccine**, Surrey, v. 18, p. 1495-1505, 2000.
- BARBER, T. A. **Pharmaceutical particulate matter: analysis and control**. Buffalo Grove: Interfarma, 1993. p. 266-303.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS K. **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 212p.
- BARREIRO-IGLESIAS, R.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A. Poly(acrylic acid) microgels (Carbopol[®]) surfactant interactions in aqueous media Part I: nonionic surfactants. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 258, p. 165-177, 2003.
- BASF FINE CHEMICALS. **Technical information: Lutrol F 127[®]**. Ludwigshafen, Germany, 2002. Catálogo.
- BATUSHANOV, P. I.; GRIGOROV, G. I.; ALEKSANDROV, G. A. A clinical study of a silicate toothpaste with extract from propolis. **Folia Med.**, Plovdiv, v. 43, n. 1-2, p. 28-30, 2001.
- BECKER, W.; BERG, L.; BECKER, B. E. Untreated periodontal disease: A longitudinal study. **J. Periodontol.**, Chicago, v 50, p. 234-244, 1979.
- BENTLEY, M. V.; MARCHETTI, J. M.; RICARDO, N.; ALI-ABI, Z.; COLLET, J. H. Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vivo permeation studies. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 49-55, 1999.

BERRETTA, A. A. **Desenvolvimento e avaliação de uma forma farmacêutica de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis para o tratamento de queimaduras**. 2003. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

BEYER, G.; MELZIG, M. F. Effects of propolis on hypoxanthine-xanthine oxidase-induced toxicity in cultivated human cells and on neutrophil elastase activity. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 28, n. 7, p. 1183-1186, 2005.

BHARDWAJ, R.; BLANCHARD, J. Controlled-release delivery system for the α -MSH analog melanotan-I using poloxamer 407. **J. Pharm. Sci.**, Nova Iorque, v. 85, n. 9, p. 915-919, 1996.

BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z.P.; SCHELLER, S.; KROL, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 91, p. 25-30, 2004.

BOLSTAD, A. I.; JENSEN, H. B.; BAKKEN, V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 9, n. 1, p. 55-71, 1996.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological, mucoadhesive and release properties of Carbopol gels in hydrophilic cosolvents. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 282, p. 115-130, 2004.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters Appl. Microbiol.**, Cardiff, v. 31, p. 174-177, 2000.

BOUCKAERT, S.; LEFEBVRE, R. A.; REMON, J. P. In vitro/in vivo correlation of the bioadhesive properties of a buccal bioadhesive miconazole slow-release tablet. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 10, n. 6, p. 853-856, 1993.

BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technol.**, Chicago, Jul., p. 62-66, 1978.

BRITT, M. R.; POHLOD, D. J. Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 57, p. 104-107, 1986.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, Nova Iorque, v. 8, n. 11&12, p. 1169-1206, 1992.

BROMBERG, L. E. Interactions among proteins and hydrophobically modified polyelectrolytes. **J. Pharm. Pharmacol.**, Londres, v. 53, p. 541-547, 2001.

BROMBERG, L. E.; BUXTON, D. K.; FRIDEN, P. M. Novel periodontal drug delivery system for treatment of periodontitis. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 71, p. 251-259, 2001.

BROMBERG, L.; TEMCHENKO, M.; ALAKHOV, V.; HATTON, T. A. Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly(acrylic acid) hydrogels. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 282, p. 45-60, 2004.

BROOK, I. M.; VAN NOORT, R. Controlled delivery of drugs. **Br. Dent. J.**, Londres, v. 157, n. 11, p. 11-15, 1984.

BRUSCHI, M. L. **Desenvolvimento e caracterização de micropartículas obtidas a partir de extrato etanólico de própolis**. 2002. 211 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara:2002.

BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; LUCCHESI, M. B.; GREMIÃO, M. P. Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 264, p. 45-55, 2003a.

BRUSCHI, M. L.; FRANCO, S. L.; GREMIÃO, M. P. D. Application of an HPLC method for analysis of propolis extract. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, Nova Iorque, v. 26, n. 14, p. 2381-2391, 2003b.

BRUSCHI, M. L.; KLEIN, T.; LOPES, R. S.; FRANCO, S. L.; GREMIÃO, M. P. D. Contribuição ao protocolo de controle de qualidade da própolis e de seus extratos. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 289-306, 2002.

BRUSCHI, M. L.; LOPES, R. S.; FRANCO, S. L.; GREMIÃO, M. P. D. *In vitro* release of propolis from gelatin microparticles prepared by spray-drying technique. **Rev. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 79-84, 2004.

BUCKLEY, L. A.; CROWLEY, M. J. A longitudinal study of untreated periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 11, p. 523-530, 1984.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). **Food Chem. Toxicol.**, Richmond, v. 36, p. 347-363, 1998.

CABANA, A.; AIT-KADI, A.; JUHÁSZ, J. Study of the gelation process of polyethylene oxide - polypropylene oxide - polyethylene oxide copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions. **J. Colloid Int. Sci.**, Chicago, v. 190, p. 307-312, 1997.

CALLEJO, A.; ARMENTIA, A.; LOMBARDEO, M.; MARTÍNEZ, C.; REBOLLO, S.; SEDANO, E.; DE LA FUENTE, R.; FERNÁNDEZ, A. Hipersensibilidad a propóleos. **Alergol. Immunol. Clin.**, Barcelona, v. 16, p. 113-117, 2001.

CARMO, L. H. A. **Desenvolvimento e avaliação de formulações para uso externo contendo extrato de própolis**. 1999. 154 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999.

CARTHEW, D. L.; BUCKTON, G.; PARSONS, G. E.; POOLE, S. The effect of temperature on the surface nature of an adsorbed layer of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) blocks copolymers. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 13, n. 11, p. 1730-1733, 1996.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 73, p. s1-s6, 2002.

- CESCHEL, G. C.; MAFFEI, P.; SFORZINI, A.; LOMBARDI BORGIA, S.; YASIN, A.; RONCHI, C. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 73, suppl. 1, p. s44-s52, 2002.
- CETIN, E. O.; BUDUNELI, N.; ATLIHAN, E.; KIRILMAZ, L. In vitro studies of a degradable device for controlled-release of meloxicam. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 32, n. 7, p. 773-777, 2005.
- CETIN, E. O.; BUDUNELI, N.; ATLIHAN, E.; KIRILMAZ, L. In vitro studies on controlled-release cellulose acetate films for local delivery of chlorhexidine, indomethacin, and meloxicam. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, n. 12, p. 1117-1121, 2004.
- CHANG, J. Y.; OH, Y.-K.; CHOI, H.-G.; KIM, Y. B.; KIM, C.-K. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 241, p. 155-163, 2002a.
- CHANG, J. Y.; OH, Y.-K.; KONG, H. S.; KIM, E. J.; JANG, D. D.; NAM, K. T.; KIM, C.-K. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 82, p. 39-50, 2002b.
- CHEN, C.-N.; WENG, M.-S.; WU, C.-L.; LIN, J.-K. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. **Evid. Based Complem. Alternat. Med.**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 175-185, 2004.
- CHIDAMBARAM, N.; SRIVATSAVA, A. K. Buccal drug delivery systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, Nova Iorque, v. 21, n. 9, p. 1009-1036, 1995.
- CHIEN, Y. W. **Novel drug delivery systems**. 2. ed., New York: Marcel Dekker, 1992. 670 p.
- CHOI, H.-G.; KIM, C.-K. Development of omeprazole buccal adhesive tablets with stability enhancement in human saliva. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 68, p. 397-404, 2000.
- CHOI, H.-G.; LEE, M.-K.; KIM, M.-H.; KIM, C.-K. Effect of additives on the physicochemical properties of liquid suppository bases. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 190, p. 13-19, 1999.
- CHRISTOV, R.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; BERTRAND, M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. **Nat. Prod. Res.**, Londres, v. 19, n. 7, p. 673-678, 2005.
- CHU, J. S.; AMIDON, G. L.; WEINER, N. D.; GOLDBERG, A. H. Viscoelastic properties of polyacrylic acid gels in mixed solvents. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 9, n. 12, p. 1659-1663, 1992.
- CHUN, M.-K.; CHO, C.-S.; CHOI, H.-K. Mucoadhesive drug carrier based on interpolymer complex of poly(vinyl pyrrolidone) and poly(acrylic acid) prepared by template polymerization. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 81, p. 327-334, 2002.

CHUNG, Y.-M.; SIMMONS, K. L.; GUTOWSKA, A.; JEONG, B. Sol-gel transition temperature of PLGA-g-PEG aqueous solutions. **Biomacromolecules**, Washington, v. 3, p. 511-516, 2002.

CIANCIO, S.G. Medication as risk factors for periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n. 10S, p. 1055-1059, 1996.

CILEK, A.; CELEBI, N.; TIRNAKSIZ, F. Lecithin-based microemulsion of a peptide for oral administration: preparation, characterization, and physical stability of the formulation. **Drug Deliv.**, Londres, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2006.

CLARKE, M. T. Rheological additives. In: LABBA, D. (Ed.). **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 55-152.

CLEARY, J.; BROMBERG, L.; MAGNER, E. Adhesion of polyether-modified poly(acrylic acid) to mucin. **Langmuir**, Washington, v. 20, p. 9755-9762, 2004.

COSTACURTA, L. **Anatomia microscópica buco-dental humana**. São Paulo: Atheneu, 1979.

COVENTRY, J.; NEWMAN, H. N. Experimental use of a slow release device employing chlorhexidine gluconate in areas of acute periodontal inflammation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 9, n. 2, p. 129-133, 1982.

CRODA. **Cuidado personal: guia de productos Croda sobre nuevas materias primas para cosméticos**. Parsippany, 1995. Catálogo.

CRODA. **Folha de segurança de produto químico: Procetyl AWS**. Brasil, 2002. Catálogo.

CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; POVIA, G. S.; CARVALHO, P. O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004.

DAHLEN, G. G. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in periodontitis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v. 6, n. 2-3, p. 181-192, 1993.

D'AIUTO, F.; PARKAR, M.; ANDREOU, G.; SUVAN, J.; BRETT, P. M.; READY, D.; TONETTI, M. S. periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. **J. Dent. Res.**, Stanford, v. 83, n. 2, p. 156-160, 2004.

D'AURIA, F. D.; TECCA, M.; SCAZZOCCHIO, F.; RENZINI, V.; STRIPPOLI, V. Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. **J. Chemother.**, Firenze, v. 15, n. 5, p. 454-460, 2003.

DE CASTRO, S. L.; HIGASHI, K. O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 46, n. 1, p. 55-58, 1995.

DE SOUZA, K. C. B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa***. 1997. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

DE SOUZA, K. C. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-metoxi quercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 28, n. 3-4, p. 771-777, 2002.

DE VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; DA COSTA, M. M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 1-7, 2004.

DEASY, P. B.; COLLINS, A. E. M.; MACCARTHY, D. J.; RUSSEL, R. J. Use of strips containing tetracycline hydrochloride or metronidazole for treatment of advanced periodontal disease. **J. Pharm. Pharmacol.**, Londres, v. 41, n. 10, p. 694-699, 1989.

DEGRANDE, G.; BENES, L.; HORRIÈRE, F.; KARSENTY, H.; LACOSTE, C.; MCQUINN, R.; GUO, J. H.; SCHERRER, R. Specialized oral mucosal drug delivery systems: patches. In: RATHBONE, M. J. (Ed.). **Oral mucosal drug delivery**. New York: Marcel Dekker, v. 74, p. 285-317, 1996.

DEUTSCHES Arzneibuch.10. Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1994.

DÍAZ, J. C. Q.; RODRÍGUEZ, O. A.; VELÁZQUEZ, M. D.; MILIÁN, M. L. Empleo de la tintura de propóleo al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. **Rev. Cubana Estomatol.**, Havana, v. 34, n. 1, p. 1-4, 1997.

DOBROWOLSKI, J. W.; VOHORA, S. B.; SHARMA, K.; SHAH, S. A.; NAQVI, S. A. H.; DANDIYA P. C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 35, p. 77-82, 1991.

DOS SANTOS PEREIRA, A.; DE MIRANDA PEREIRA, A. F.; TRUGO, L. C.; DE AQUINO NETO, F. R. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, Tübingen, v. 58, n. 7-8, p. 590-593, 2003.

DUARTE, C. A.; KFOURI, L. S. Ação da própolis sob forma de bochechos. **RGO**, Goiânia, v. 47, n. 2, p. 82-84, 1999.

DUARTE, S.; ROSALEN, P. L.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; BOWEN, W. H.; MARQUIS, R. E.; REHDER, V. L.; SARTORATTO, A.; IKEGAKI, M.; KOO, H. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 15-22, 2006.

DUMEX ORAL HEALTH CARE. **Elyzol dental gel**. 2003. 48 p. Monografia internacional de produto - Dumex, ALPHARMA.

DURAN, N.; KOC, A.; OKSUZ, H.; TAMER, C.; AKAYDIN, C.; KOZLU, T.; CELIK, M. The protective role of topical propolis on experimental keratitis via nitric oxide levels in rabbits. **Mol. Cell. Biochem.**, Amsterdam, v. 281, n. 1-2, p. 153-161, 2006.

DURRANI, M. J.; ANDREWS, A.; WHITAKER, R.; BENNER, S. C. Studies on drug release kinetics from Carbomer matrices. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, Nova Iorque, v. 20, p. 2439-2447, 1994.

ECKLES, T. A.; REINHARDT, R. A.; DYER, J. K.; TUSSING, G. J.; SZYDLOWSKI, W. M.; DUBOIS, L. M. Intracrevicular application of tetracycline in white petrolatum for the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Fredriksberg, v. 17, n. 7, p. 454-462, 1990.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; HARJU, K. Rheological evaluation and ocular contact time of some carbomer gels for ophthalmic use. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 137, p. 233-241, 1996.

EDSMAN, K.; CARLFORS, J.; PETERSSON, R. Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophtalmic use. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 6, p. 105-112, 1998.

ELEY, B. M. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque - a review **Br. Dent. J.**, São Paulo, v. 186, p. 286-296, 1999.

EL-KAMEL, A.; EL-KHATIB, M. Thermally reversible in situ gelling carbamazepine liquid suppository. **Drug Deliv.**, Filadélfia, v. 13, n. 2, p. 143-148, 2006.

ELKAYAM, R.; FRIEDMAN, M.; STABHOLZ, A.; SOSKOLNE, A.W.; SELA, M.N.; GOLUB, L. Sustained release device containing minocycline for local treatment of periodontal disease. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 7, p. 231-236, 1988.

EOUANI, C.; PICCERELLE, PH.; PRINDERRE, P.; BOURRET, E.; JOACHIM, J. In vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 52, p. 45-55, 2001.

ERHART, E. A. **Elementos de anatomia humana**. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 1987.

ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. **Biomaterials**, Guilford, v. 17, p. 2009-2020, 1996.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K. L. (Ed.). **Handbook of microemulsion science technology**. New York: Marcel Dekker 1999. cap 7, p. 195-240.

FALKIEWICZ, M. J. Theory of suspensions. In: Lieberman, H. A.; Rieger, M. M.; Banker, G. S. (eds.). **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**. New York-Basel-Hong Kong: Marcel Dekker, 1996, p. 17-52.

FARIAS, R. F. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Coord.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2000. Cap. 12. p. 197-220.

FARMACOPÉIA brasileira. 2 ed., São Paulo: Siqueira, 1959. 1295 p.

FARMACOPÉIA brasileira. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1 e 2.

FERES FILHO, E. J.; CHEVITARESE, O.; ZEBRAL, A. A.; VILLORIA, G. E. Desenvolvimento de um dispositivo de liberação prolongada contendo metronidazol para terapia periodontal tópica. **RBO**, São Paulo, v. XLVII, n. 2, p. 44-45, 1990.

FERES, M. FIGUEIREDO, L. C.; BARRETO, I. M.; COELHO, M. H.; ARAUJO, M. W.; CORTELLI, S. C. In vitro antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. **J. Int. Acad. Periodontol.**, Memphis, v. 7, n. 3, p. 90-96, 2005.

FERNANDES, A. A. H.; FERNANDES- JÚNIOR, A.; NOVELLI, E. L. B. Effect of Brazilian propolis on experimental hepatotoxicity in rats. **Rev. Ciênc. Farm.**, Araraquara, v. 25, n. 2, p. 85-89, 2004.

FERNANDES-JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E. C.; BETONI, J. E. C.; ORSI, R. O.; CUNHA, M. L. R. S.; MONTELLI, A. C. Própolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 5, p. 563-566, 2005.

FERNANDES-JÚNIOR, A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2001.

FERNANDES-JÚNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtida em três regiões do Brasil. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

FERREIRA, F. B. de A. **Estudo in vitro do efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis e de outros medicamentos usados em endodontia sobre microrganismos anaeróbios**. 1999. 150 f. Dissert. (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1999.

FERREIRA, P. M. Periodontia e farmácia de manipulação: uma relação saudável. **Rev. Racine**, São Paulo, n. 24, dez./jan., p. 30- 32, 1995.

IORELLINI, J. P.; PAQUETTE, D. W. The potential role of controlled-release delivery systems for chemotherapeutic agents in periodontics. **Curr. Opin. Dent.**, Filadélfia, v. 2, p. 63-79, 1992.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3 ed., São Paulo: Edusp, 2003. 732 p.

FLOTTRA, L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 8 (s. 12), n. 41, 1973.

FLOTTRA, L.; GJERMO, G.; ROLLA, G.; WAERHAUG, A. 4 – month study on the effect of a chlorhexidine mouthwash on 50 soldiers. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 80, n. 10, 1972.

FOWLER, E. B.; BREAUULT, L. G.; BRYANT, J. B. Site-specific chlorhexidine: a periodontal alternative. **Gen. Dent.**, Chicago, v. 49, n. 1, p. 84-88, 2001.

FRANCO, S. L. **Própolis: Otimização do processo extrativo. Desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e produção de forma farmacêutica sólida.** 2001. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, Brasília, v. 11, n. 17, p. 48-51, 1999.

FRANCO, S. L.; BRUSCHI, M. L.; BUENO, J. H. F. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Rev. Bras. Farmacog.**, Curitiba, v. 9/10, p. 1-10, 2000.

FRANK, R. M. Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 563-573, 1980.

FREEMAN, E.; ELLEN, R. P.; THOMPSON, G.; WEINBERG, S. E.; SONG, M.; LAZARUS, R. H. Gingival crevicular fluid concentration and side effects of minocycline: a comparison of two regimens. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, p. 13-18, 1992.

FRIBERG; S. E.; QUENCER, L. G.; HILTON, M. L. Theory of emulsions. In: **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems.** LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. (Ed.). 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. v. 1, p. 53-90.

FRIEDMAN, M.; GOLOMB, G. New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use. I- Development and kinetics of release. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 17, n. 3, p. 323-328, 1982.

FRIEDMAN, M.; STEINBERG, D. Sustained release delivery systems for treatment of dental diseases. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 7, n. 4, p. 313-317, 1990.

FRIESEN, L. R.; WILLIAMS, K. B.; KRAUSE, L. S.; KILLOY, W. J. Controlled local delivery of tetracycline with polymer strips in the treatment of periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 73, n. 1, p. 13-19, 2002.

FULIANG, H. U.; HEPBURN, H. R.; XUAN, H.; CHEN, M.; DAYA, S.; RADLOFF, S. E. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. **Pharmacol. Res.**, Londres, v. 51, n. 2, p. 147-152, 2005.

GABARRA, F. R. **Dispositivo mimetizador de bolsa periodontal para estudos in vitro de liberação de fármaco.** 2002. 197 f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral)-Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

GABARRA, F. R.; LARA, E. H. G.; PANZERI, H.; SHUHAMA, I. K.; DEL CIAMPO, J. O.; JABOR, J. R. A device for oral mucosal drug delivery. In: VI PHARMATECH, 2001, Recife. **Anais...** Recife: SBTf, 2001. p. 125-126.

- GABRIËLS, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Experimental designed optimisation and stability evaluation of dry suspensions with artemisinin derivatives for paediatric use. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 283, p. 19-34, 2004.
- GANDHI, R. B.; ROBINSON, J. R. Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. **Adv. Drug Del. Rev.**, Amsterdam, v. 13, p. 43-74, 1994.
- GEBARA, E. C. E. Avaliação clínica e microbiológica do uso da própolis como coadjuvante no tratamento periodontal. 1999. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- GEBARA, E. C. E.; MAYER, M. P. A.; PUSTIGLIONI, A. N.; LIMA, L. A. P. A. Propolis extract as adjuvant to periodontal treatment. In: CONGRESSO DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, 3., 2001, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Comissão de Cultura e Extensão Universitária do ICB/USP, 2001. p. 1 v.
- GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 33, p. 365-369, 2002.
- GEBARA, E. C.; PUSTIGLIONI, A. N.; DE LIMA, L. A.; MAYER, M. P. Propolis extract as an adjuvant to periodontal treatment. **Oral Health Prev. Dent.**, Surrey, v. 1, n. 1, p. 29-35, 2003.
- GENCO, R. J. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 52, p. 545-558, 1981.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, Cardiff, v. 60, p. 59-80, 1979.
- GIBBONS, R. J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 63, n. 3, p. 378-385, 1984.
- GILBERT, J. C.; HADGRAFT, J.; BYE, A.; BROOKES, L. G. Drug release from Pluronic F-127 gels. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 32, p. 223-228, 1986.
- GIORDANO, J.; LOESCHE, W. J.; WALSH, L.; AMALFITANO, J. Effect of local delivery of metronidazole or chlorhexidine in periodontitis patients. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 71, p. 319, 1992.
- GIUSTI, F.; MIGLIETTA, R.; PEPE, P.; SEIDENARI, S. Sensitization to propolis in 1255 children undergoing patch testing. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 51, n. 5-6, p. 255-258, 2004.
- GOLOMB, G.; FRIEDMAN, M.; SOSKOLONE, W. A.; STABHOLZ, A.; SELA, M. N. Sustained release device containing metronidazole for periodontal use. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 63, n. 9, p. 1149-1153, 1984.
- GOODSON, J. M. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 68, p. 1625-1632, 1989.

- GOODSON, J. M.; HAFFAJEE, A.; SOCRANSKY, S. S. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. **J. Clin. Periodontol.**, Fredriksberg, v. 6, n. 2, p. 83-92, 1979.
- GOODSON, J. M.; HOLBOROW, D.; DUNN, R. L.; HOGAN, P.; DUNHAM, S. Monolithic tetracycline-containing fibres for controlled delivery to periodontal pockets. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 54, p. 575-579, 1983.
- GOODSON, J. M.; OFFENBACHER, S.; FARR, D. H.; HOGAN, P. E. Periodontal disease treatment by local drug delivery. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 56, p. 265-272, 1985.
- GORDON, J. M.; WALKER, C. B.; GOODSON, J. M.; SOCRANSKY, S.S. Sensitive assay for measuring tetracycline levels in gingival crevice fluid. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 17, p. 193-198, 1980.
- GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J. Soc. Med.**, Londres, v. 83, p. 159-160, 1990.
- GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, Cardiff, v. 71, p. 107-118, 1990.
- GREENSTEIN, G. Clinical significance of bacterial resistance to tetracyclines in the treatment of periodontal diseases. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 11, p. 925-932, 1995.
- GREENSTEIN, G. Effects of subgingival irrigation on periodontal status. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 58, p. 827-836, 1987.
- GREENSTEIN, G.; BERMANT, C.; JAFFINT, R. Chlorhexidine, an adjunct to periodontal therapy. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 57, n. 6, p. 370-376, 1986.
- GROVE, D. C.; RANDALL, M. S. **Assay method of antibiotics**. New York: Medical Encyclopedia, p. 188-96, 1955.
- GULBAHAR, O.; OZTURK, G.; ERDEM, N.; KAZANDI, A. C.; KOKULUDAG, A. Psoriasiform contact dermatitis due to propolis in a beekeeper. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, McLean, v. 94, n. 4, p. 509-511, 2005.
- GUO, J. H.; COOKLOCK, K. M. The effects of backing materials and multilayered systems on the characteristics of bioadhesive buccal patches. **J. Pharm. Pharmacol.**, Londres, v. 48, p. 255-257, 1996.
- GUO, J. H.; CREMER, K. Development of bioadhesive buccal patches. In: Mathiowitz, E.; Chickering, D. E.; Lehr, C. M. (Ed.), **Bioadhesive drug delivery systems**. New York: Marcel Dekker, v. 98, p. 541-562, 1999.
- GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.
- HÄNGERSTRÖM, H.; EDSMAN, K. Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method. **J. Pharm. Pharmacol.**, Londres, v. 53, p. 1589-1599, 2001.

- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HASHIMOTO, T.; TORI, M.; ASAKAWA, Y. Synthesis of two allergenic constituents of propolis and Poplar bud excretion. **Z. Naturforsch.**, Tübingen, v.43c, p. 470-472, 1988.
- HASSAN, E. E.; GALLO, J. M. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 7, n. 5, p. 491-495, 1990.
- HATTINGH, J.; HO, E. The concentration of proteins in human gingival crevicular fluid. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 15, p. 90-95, 1980.
- HAUSEN, B. M. Evaluation of the main contact allergens in propolis (1995 to 2005). **Dermatitis**, Hamilton, v. 16, n. 3, p. 127-129, 2005.
- HAUSEN, B. M.; WOLLENWEBER, E. Propolis allergy (III). Sensitization studies with minor constituents **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 19, p. 296-303, 1988.
- HAUSEN, B. M.; WOLLENWEBER, E.; SENFF, H.; POST, P. Propolis allergy (I). Origin, properties, usage and literature review. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 17, n. 3, p. 163-170, 1987.
- HAYACIBARA, M. F.; KOO H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BOWEN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 101, n. 1-3, p. 110-115, 2005.
- HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chem. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 47, p. 1521-1524, 1999.
- HELLDÉN, L. B.; LISTGARTEN, M. A.; LINDHE, J. The effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 6, p. 222-230, 1979.
- HERNÁNDEZ, I. M.; FERNANDEZ, M. C.; CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 68, p. 931-934, 2005.
- HIGASHI, K.; MATSUSHITA, M.; MORISAKI, K.; HAYASHI, S.; MAYUMI, T. Local drug delivery systems for the treatment of periodontal disease. **J. Pharmacobio. Dyn.**, Tóquio, v. 14, p. 72-81, 1991.
- HIGASHI, K.; MORISAKI, K.; HAYASHI, S.; KITAMURA, M.; FUJIMOTO, N.; KIMURA, S.; EBISU, S.; OKADA, H. Local ofloxacin delivery using a controlled-release insert in the human periodontal pocket. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 1-5, 1990.

HIGASHI, K.; SEIKE, M.; MITANI, Y.; MORISAKI, K.; HAYASHI, S.; KITAMURA, M.; FUJIMOTO, N.; KIMURA, S.; EBISU, S.; OKADA, H. Concentration of ofloxacin in human gingival crevicular fluid after oral administration of Tarivid®. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 24, p. 409-411, 1989.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **J. Pharm. Sci.**, Easton, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963.

HIRASAWA, M.; TAKADA, K.; MAKIMURA, M.; OTAKE, S. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 37, p. 433-438, 2002.

HITZIG, C.; CHARBIT, Y.; BITTON, C.; FOSSE, T.; TEBOUL, M.; HANNOUN, L.; VARONNE, R. Topical metronidazole as an adjunct to subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 21, p. 146-151, 1994.

HOLBOROW, D. W. Local delivery of antibacterial agents in the treatment of periodontal disease. **N. Z. Dental J.**, Dunedin, v. 82, p. 119-121, 1986.

HOLBOROW, D. W.; GAUDIE, W.; HUNG, T.; GOODSON, J. M. Periodontal pocket concentration of tetracycline by local delivery. **J. Dent. Res.**, Alexandria, Abstracts, p. 25, 1988.

HOLDERNA, E.; KEDZIA, B. Investigations upon the combined action of propolis and antimycotic drugs on *Candida albicans*. **Herba Pol.**, Varsóvia, v. 33, n. 2, p. 145-151, 1987.

HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 100, n. 3, p. 276-283, 2005.

HYDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K. (Ed.). **Handbook of applied surface and colloid chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 16, p. 299-332.

ICH (International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use) Q2A. **Text on validation of analytical procedures**, 1994.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res.**, Basel, v. 25, p. 347-351, 1991.

IKINCI, G.; SENEL, S.; AKINCIBAY, H.; KAS, S.; ERCIS, S.; WILSON, C. G.; HINCAL, A. A. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 235, p. 121-127, 2002.

IMFELD, T. Efficacy of sweeteners and sugar substitutes in caries prevention. **Caries Res.**, Basel, v. 27, n. suppl. 1, p. 50-55, 1993.

IMHOF, M.; LIPOVAC, M.; KURZ, CH.; BARTA, J.; VERHOEVEN, H. C.; HUBER, J. C. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, Nova Iorque, v. 89, p. 127-132, 2005.

INOKUCHI, Y.; SHIMAZAWA, M.; NAKAJIMA, Y.; SUEMORI, S.; MISHIMA, S.; HARA, H. Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 71-77, 2006.

ISLA, M. I.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; NIEVA-MORENO, M. I.; KOO, H.; PARK, Y. K. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1166-1172, 2005.

ISLAM, M. T.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N.; CIOTTI, S.; ACKERMANN, C. Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH. **Pharm. Res.**, Nova Iorque, v. 21, n. 7, p. 1192-1199, 2004.

ITO, I. Y.; ALONSO VERRI, R.; RIBAS, J. P.; MARQUES DE LIMA, S. N.; PALAMIN, R. V.; MAIA CAMPOS, G. Efeitos do cloreto de cetilpiridíniona inibição da placa dental. **Odont. Moderno**, São Paulo, p. 8-23, 1980.

IVANOVA, R.; LINDMAN, B.; ALEXANDRIDIS, P. Effect of pharmaceutical acceptable glycols on the stability of the liquid crystalline gels formed by Poloxamer 407 in water. **J. Colloid Interface Sci.**, Orlando, v. 252, p. 226-235, 2002.

JANNIN, V.; POCHARD, E.; CHAMBIN, O. Influence of poloxamers on the dissolution performance and stability of controlled-release formulations containing Precirol®. ATO 5. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 309, p. 6-15, 2006.

JEFFCOAT, M. K. Diagnosis of periodontal diseases: building a bridge from today's methods to tomorrow's technology. **J. Dent. Educ.**, Washington, v. 58, n. 8, p. 613-619, 1994.

JONES, A.; WOOD, R.; NEWBOLD, D.; MANWELL, M.; KORMAN, K. Clinical effects of subgingival minocycline in periodontitis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 17, p. 245, 1992.

JONES, D. S. **Pharmaceutical statistics**. Londres: The Pharmaceutical Press, 2002, 586 p.

JONES, D. S.; BROWN, A. F.; WOOLFSON, A. D. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolids designed for the treatment of periodontal diseases: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. **J. Pharm. Sci.**, Nova Iorque, v. 90, n. 12, p. 1978-1990, 2001.

JONES, D. S.; IRWIN, C. R.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J.; ADAMS, V. Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis. **J. Pharm. Sci.**, Nova Iorque, v. 88, n. 6, p. 592-598, 1999.

JONES, D. S.; LAWLOR, M. S.; WOOLFSON, A. D. Examination of the flow rheological and textural properties of polymer gels composed of poly(methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly(vinylpyrrolidone): rheological and mathematical interpretation of textural parameters. **J. Pharm. Sci.**, Nova Iorque, v. 91, n. 9, p. 2090-2101, 2002.

- JONES, D. S.; LAWLOR, M. S.; WOOLFSON, A. D. Formulation and characterisation of tetracycline-containing bioadhesive polymer networks designed for the treatment of periodontal disease. **Curr. Drug Deliv.**, São Francisco, v. 1, n. 1, p. 17, 25 2004.
- JONES, D. S.; MEDLICOTT, N. J. Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 114, p. 257-261, 1995.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural analysis and flow rheometry of bioadhesive, antimicrobial oral gels. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 14, n. 4, p. 450-457, 1997a.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p. 223-33, 1997b.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F.; COULTER, W. A.; MCCLELLAND, C.; IRWIN, C. R. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 67, p. 357-368, 2000.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F.; O'NEILL, M. J. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 49, p. 71-79, 1997.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J. Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components. **J. App. Pol. Sci.**, Nova Iorque, v. 61, p. 2229-2234, 1996.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J.; COULTER, W. A. Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 13, n. 11, p. 1734-1738, 1996.
- JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F. Viscoelastic properties of bioadhesive, chlorhexidine-containing semi-solids for topical application to the oropharynx. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 15, n. 7, p. 1131-1136, 1998.
- JORGENSEN, M.G.; SLOTS, J. Responsible use of antimicrobials in periodontics. **J. Calif. Dental Assoc.**, Sacramento, p. 1-12, 2000.
- JORI, A. The sugar alcohols: a profile. **Adv. Pharmacol. Chemother.**, Nova Iorque, v. 20, p. 191-218, 1984.
- JOYSTON-BECHAL, S.; EMSLIE, R. D. Topical and systemic antimicrobial agents in the treatment of chronic gingivitis and periodontitis. **Int. Dent. J.**, Londres, v. 37, p. 52-62, 1987.
- KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 82, p. 189-212, 2002.

- KAPLAN, A. H.; WEBER, D. J.; ODDONE, E. Z.; PERFECT, J. R. Infection due *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v. 11, n. 1, p. 46-63, 1989.
- KARAKAYA, S.; EL, S. N. Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. **Food Chem.**, Reading, v. 66, p. 289-292, 1999.
- KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 86, p. 69-73, 2003.
- KATALINIC, V.; RADIC, S.; ROPAC, D.; MULIC, R.; KATALINIC, A. Antioxidative activity of propolis from Dalmatia (Croatia). **Acta Med. Croatica**, Zagreb, v. 58, n. 5, p. 373-376, 2004.
- KELLY, H. M.; DEASY, P. B.; ZIAKA, E.; CLAFFEY, N. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 274, p. 167-183, 2004.
- KHIDR, S. H. Effect of block copolymers on the dissolution of some water-insoluble drugs: 1. Nifedipine-Pluronic F-127 solid dispersion system. **Bull. Pharm. Sci. Assiut University**, Assiut, v. 17, n. 1, p. 81-86, 1994.
- KILIAN, M.; LARSEN, M. J.; FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A. Effects of Fluoride on the inicial colonization of teeth *in vivo*. **Caries Res.**, Basel, v. 13, n. 6, p. 319-329, 1979.
- KIM, T. S.; BURKLIN, T.; SCHARCHER, B.; RATKA-KRUEGER, P. Pharmacokinetics profile of a locally administrated doxycycline gel in crevicular fluid, blood, and saliva. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, n. 11, p. 1285-1291, 2002.
- KIMURA, S.; TODA, H.; SHIMABUKURO, Y.; KITAMURA, M.; FUJIMOTO, N.; MIKI, Y.; OKADA, H. Topical chemotherapy in human periodontitis using a new controlled-release insert containing ofloxacin. I Microbiological observation. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 26, n. 1, p. 33-41, 1991.
- KINANE, D. F. Local antimicrobial therapies in periodontal disease. **Ann. R. Australas. Coll. Dent. Surg.**, Sidnei, v. 15, p. 57-60, 2000.
- KINANE, D. F.; RADVAR, M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 1-7, 1999.
- KLINGE, B.; ATTSTRÖM, R.; KARRING, T.; KISH, J.; LEWIN, B.; STOLTZE, K. 3 regimens of topical metronidazole compared with subgingival scaling on periodontal pathology in adults. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, p. 708-714, 1992.
- KOC, A. N.; SILICI, S.; AYANGIL, D.; FERAHBAŞ, A.; CANKAYA, S. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. **Mycoses**, Berlin, v. 48, n. 3, p. 205-210, 2005.

- KOFFI, A. A.; AGNELY, F.; PONCHEL, G.; GROSSIORD, J. L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 27, p. 328-335, 2006.
- KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, Cardiff, v. 66, n. 136, p. 136-139, 1985.
- KOO, H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M. B.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. **Caries Res.**, Basel, v. 36, p. 445-448, 2002.
- KOO, H.; GOMES, B. P. F. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M. B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 45, p. 141-148, 2000.
- KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 15, p. 25-35, 1983.
- KOSALEC, I.; BAKMAZ, M.; PEPELJNJAK, S.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta Pharm.**, Zagreb, v. 54, n. 1, p. 65-72, 2004.
- KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. **Acta Pharm.**, Zagreb, v. 55, n. 4, p. 423-430, 2005.
- KOSONOCKA, L. Própolis fortalece o sistema imunológico. **Rev. Bras. Apicultura**, São Paulo, p. 22-24, set/out. 1991.
- KOZLOVSKY A.; SINTOV, A.; MOLDOVAN, M.; TAL, H. Inhibition of plaque formation by local application of a degradable controlled release system containing cetylpyridinium chloride. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 21, p. 32-37, 1994.
- KOZLOVSKY, A.; SINTOV, A.; ZUBERY, Y.; TAL, H. Inhibition of plaque formation and gingivitis in beagle dogs by topical use of a degradable controlled release system containing chlorhexidine. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 71, n. 9, p. 1577-1581, 1992.
- KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimitt. Forsch.**, Aulendorf, v. 43, n. 5, p. 607-609, 1993.
- KUBOTA, Y.; UMEGAKI, K.; TANAKA, N.; KAGOTA, S.; NAKAMURA, K.; KUNIMOTO, M.; SHINOZUKA, K. Anty-hypertensive effects of Brazilian propolis in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Oxford, v. 31, n. Suppl 2, p. 29-30, 2004.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 64, p. 235-240, 1999.

- KULEVANOVA, S.; STAFILOV, T.; DOREVSKI, K. Determination of some macroelements in propolis by atomic absorption spectrometry. **Acta Pharm.**, Zagreb, v. 45, p. 45-52, 1995.
- LABBA, D. **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993, 426 p.
- LANGER, R. S.; PEPPAS, N. A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. **Biomaterials**, Guilford, v. 2, n. 4, p. 201-214, 1981.
- LEDÓN, N.; CASACÓ, A.; GONZÁLEZ, R.; BRACHO, J.; ROSADO, A. Assessment of potential dermal and ocular toxicity and allergic properties of na extract of red própolis. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 293, p. 594-596, 2002.
- LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation **J. Pharm. Sci.**, Nova Iorque, v. 89, n. 7, p. 850-866, 2000.
- LEE, S. H.; LEE, J. E.; BAEK, W. Y.; LIM, J. O. Regional delivery of vancomycin using pluronic F-127 to inhibit methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) growth in chronic otitis media in vitro and in vivo. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 96, p. 1-7, 2004.
- LEHR, C. M. From sticky stuff to sweet receptors - achievements, limits and novel approaches to bioadhesion **European J. Drug Metabol. Pharmacokinetics**, Genebra, v. 21, n. 2, p. 139-148, 1996.
- LEITÃO, D. P. S.; SILVA FILHO, A. A.; POLIZELLO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A. C. C. Comparative evaluation of *in-vitro* effects of Brazilian green proplis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.
- LI, Y. J.; LIN, J. L.; YANG, C. W.; YU, C. C. Acute renal failure induced by a Brazilian variety of propolis. **Am. J. Kidney Dis.**, Filadélfia, v. 46, n. 6, p. 125-129, 2005.
- LIE, T.; BRUUN, G.; BÖE, E.; Effects of topical metronidazole and tetracycline in treatment of adult periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 69, n. 7, p. 819-8127, 1998.
- LINDHE, J.; HAFFAJEE, A. J.; SOCRANSKY, S. S. Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 10, p. 433-442, 1983.
- LINDHE, J.; HEIJL, L.; GOODSON, J. M.; SOCRANSKY, S. S. Local delivery using fiber devices in periodontal therapy. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 6, p. 141-149, 1979.
- LINDHE, J.; NYMAN, S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 11, p. 504-514, 1984.
- LISTGARTEN, M. A. Nature of periodontal disease: pathogenic mechanisms. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 22, p. 172-178, 1987.

- LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 13, p. 418-425, 1986.
- LISTGARTEN, M. A.; LINDHE, J.; HELLDÉN, L. Effects of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 5, n. 4, p. 246-271, 1978.
- LIU, C. F.; LIN, C. H.; LIN, C. C.; LIN, Y. H.; CHEN, C. F.; LIN, S. C. Protective effect of propolis ethanol extract on ethanol-induced renal toxicity: an in-vivo study. **Am. J. Chin. Med.**, Singapura, v. 33, n. 5, p. 779-786, 2005.
- LIU, D. Z.; CHEN, W.P.; LEE, C. P.; WU, S. L.; WANG, Y. C.; CHUNG, T. W. Effects of alginate coated on PLGA microspheres for delivery tetracycline hydrochloride to periodontal pockets. **J. Microencapsul.**, Londres, v. 21, n. 6, p. 643-652, 2004.
- LLABOT, J.M.; MANZO, R.H.; ALLEMANDI, D.A. Drug release from carbomer: carbomer sodium salt matrices with potential use as mucoadhesive drug delivery system. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 276, p. 59-66, 2004.
- LÖE, H.; SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 21, n. 6, p. 533-551, 1963.
- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 36, n. 3, p. 177-187, 1965.
- LOESCHE, W. J. Chemotherapy of dental plaque infections. **Oral Sci. Rev.**, Copenhagen, v. 9, p. 65-107, 1976.
- LOESCHE, W. J. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 58, n. 12, p. 2404-2412, 1979.
- LOESCHE, W. J. Rationale for the use of antimicrobial agents in periodontal disease. **Int. J. Technol. Assess. Health Care**, Cambridge, v. 6, n. 3, p. 403-417, 1990.
- LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 50, n. 4, p. 353-380, 1986.
- LOESCHE, W. J. The effect of sugar alcohols on plaque and saliva level of *Streptococcus mutans*. **Swed. Dent. J.**, Jonkoping, v. 8, p. 125-135, 1984.
- LOESCHE, W. J.; GROSSMAN, N. S.; EARNEST, R.; CORPRON, R. The effect of chewing xylitol gum on the plaque and saliva levels of *Streptococcus mutans*. **JADA**, Chicago, v. 108, p. 587-592, 1984.
- LOESCHE, W. J.; SYED, S. A.; SCHMIDT, E.; MORRISON, E. C. Bacterial profiles of subgingival plaque in periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 56, p. 447-456, 1985.
- LOPEZ, N. J.; SMITH, P. C.; GUTIERREZ, J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 73, n. 8, p. 911-924, 2002.

LU, L. C.; CHEN, Y. W.; CHOU, C. C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 102, n. 2, p. 213-220, 2005.

LUCINDA, R. M. **Preparação e caracterização de micropartículas de quitosana-alginato**. 1999. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

LUEBEN, H. L.; LEEUW, B. J.; LANGEMEYER, M. W. E.; BOER, A. G.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin *in vivo*. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 13, n. 11, p. 1668-1672, 1996.

MACIEJEWICZ, W.; DANIEWSKI, M.; BAL, K.; MARKOWSKI, W. GC-MS identification of the flavonoid aglycones isolated from propolis. **Chromatographia**, Amsterdam, v. 53, n. 5/6, p. 343-346, 2001.

MACIEJEWICZ, W.; DANIEWSKI, M.; MIELNIEZUK, Z.; SUPRYNOWICZ, Z. Gas chromatography-mass spectrometry investigation of propolis. Analysis of β -steroids. **Acta Pol. Pharm.**, Varsóvia, v.39, n. 4, p. 277-279, 1982.

MAJIENÉ, D.; TRUMBECKAITÉ, S.; GRUNOVIENÉ, D.; IVANAUSKAS, L.; GENDROLIS, A. Investigation of chemical composition of propolis extract. **Medicina**, Kaunas, v. 40, n. 8, p. 771-774, 2004.

MALKIN, A. Ya. **Fundamental topics in rheology: Rheology Fundamentals**. Ontario: ChemTec Publishing, 1994.

MALLAPRAGADA, S. K.; PEPPAS, N. A.; COLOMBO, P. Crystal dissolution-controlled release systems II. Metronidazole release from semicrystalline poly (vinyl alcohol) systems. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 36, n. 1, p. 125-130, 1997.

MANARA, L. R. B.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W. A. Utilização da própolis em odontologia. **Rev. FOB**, Bauru, v. 7, n 3/4, p. 15-20, 1999.

MANI, F.; DAMASCENO, H. C.; NOVELLI, E. L.; MARTINS, E. A.; SFORCIN, J. M. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v. 105, N. 1-2, P. 95-98, 2005.

MARCUCCI, M.C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Les Ulis, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C.; SALATINO, M.L.; SALATINO, A.; LOPES, C.M.A. Chemical and biological studies of Brazilian propolis. In: IBEROAMERICAN MEETING APICULTURA, 4., 1994, Rio Quarto. **Anais...** Rio Quarto, Argentina, 1994. p. 193-196.

MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 205-211, 1996.

- MARQUELE, F. D.; DI MAMBRO, V. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M. L.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 39, n. 3-4, p. 455-462, 2005.
- MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Physical Pharmacy**. London: Lea & Febiger, 4. ed., 1993. 622p.
- MARTIN, L.; WILSON, C. G.; KOOSHA, F.; UCHEGBU, I. F. Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 55, p. 35-45, 2003.
- MARTIN, M. P.; PILEGGI, R. A quantitative analysis of propolis: a promising new storage media following avulsion. **Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 85-89, 2004.
- MATSUDA, S.; IWATA, H.; SE, N.; IKADA, Y. Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 45, p. 20-27, 1999.
- MATSUI, T.; EBUCHI, S.; FUJISE, T.; ABESUNDARA, K. J. M.; DOI, S.; YAMADA, H.; MATSUMOTO, K. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-*O*-caffeoilquinic. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 27, n. 11, p. 1797-1803, 2004.
- MATSUNO, T. **Propolis: Is pharmacology and therapeutic effects**. Tóquio: M.P.I., 1994. 154p.
- MAZE, G. I.; REINHART, R. A.; PAYNE, J. B.; MAZE, C.; BAKER, R. A.; BOUWSMA, O. J.; DAMANI, N. C.; FITZGERALD, J. H.; HAMLIN, J. C.; GERLACH, R. W. Gingival fluid tetracycline release from bioerodible gels. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, p. 1133-1136, 1996.
- MEDLICOTT, N. J.; JONES, D. S.; TUCKER, I. G.; HOLBOROW, D. W. Preliminary release studies of chlorhexidine (base and diacetate) from poly(ϵ -caprolactone) films prepared by solvent evaporation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 84, p. 85-89, 1992.
- MEDLICOTT, N. J.; RATHBONE, M. J.; TUCKER, I. G.; HOLBOROW, D. W. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 13, p. 181-203, 1994.
- MEDLICOTT, N. J.; TUCKER, I. G.; RATHBONE, M. J.; HOLBOROW, D. W.; JONES, D. S. Chlorhexidine release from poly(ϵ -caprolactone) films prepared by solvent evaporation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 143, p. 25-35, 1996.
- MENEZES, H.; BACCI JR, M.; OLIVEIRA, S. D.; PAGNOCCA, F. C. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**, Les Ulis, v. 28, p. 71-76, 1997.

- MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A.; KADOTA, S. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochem. Anal.**, Chichester, v. 12, n. 6, p. 366-373, 2001.
- MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe editorial, 2000. 116p.
- MINABE, M.; SUZUKI, F.; UMEMOTO, T. Intra-pocket antibiotic therapy using resorbable and non-resorbable slow-release devices containing tetracycline. **Periodontal Clin. Investig.**, Port Washington, v. 22, n. 1, p. 14-21, 2000.
- MINABE, M.; TAAKEUCHI, K.; TOMOMATSU, E.; HORI, T.; UMEMOTO, T. Clinical effects of local application of collagen film-immobilized tetracycline. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 16, p. 291-294, 1989a.
- MINABE, M.; TAMURA, T.; HORI, T.; UMEMOTO, T. Subgingival administration of tetracycline on a collagen film. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 60, p. 552-556, 1989b.
- MINABE, M.; UEMATSU, A.; NISHIJIMA, K.; TOMOMATSU, E.; TAMURA, T.; HORI, T.; UMEMOTO, T.; HINO, T. Application of a local drug delivery system to periodontal therapy: I development of collagen preparations with immobilized tetracycline. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 60, n.2, p. 113-117, 1989c.
- MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 95, p. 913, 2003.
- MISHIMA, S.; INOH, Y. NARITA, Y.; OHTA, S.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; SUZUKI, K. M.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Identification of caffeoylquinic derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 13, n. 20, p. 5814-5818, 2005a.
- MISHIMA, S.; ONO, Y.; ARAKI, Y.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Two related cinnamic acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, Bacharin and Drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 28, n. 6, p. 1025-1030, 2005b.
- MISHIMA, S.; YOSHIDA, C.; AKINO, S.; SAKAMOTO, T. Antihypertensive effects of Brazilian propolis: identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 28, n. 10, p. 1909-1914, 2005c.
- MÖLLER, A. J. R. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. **Odontol. Tidskr.**, Gotemburgo, v. 74, s. 1, p.380, 1966.
- MONBELLI, A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. **Oral Dis.**, Copenhagen, v. 9, sup. 6, p. 6-10, 2003.

MOORE, T.; CROY, S.; MALLAPRAGADA, S.; PANDIT, N. Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic F 127 gel dissolution: drug release in stirred systems. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 67, p. 191-202, 2000.

MOREIRA, T. F. Composição química do própolis: vitaminas e aminoácidos. **Rev. Bras. Farmacog., Curitiba**, v. 1, n. 1, p. 9-12, 1986.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 71, p. 109-114, 2000.

MORTAZAVI, S. A.; SMART, J. D. An investigation of some factors influencing the in vitro assessment of mucoadhesion. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 116, p. 223-230, 1995.

MULDOON, B. C. O. **Mucoadhesive systems for drug delivery**. 2002. 380 f. Tese (Doutorado em Filosofia)–Faculdade de Ciência e Agricultura, *The Queen's University of Belfast*, Belfast: 2002.

MULLER-GLAUSER, W.; SCHROEDER, H. E. The pocket epithelium: a light- and electronmicroscopic study. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 53, n. 3, p. 133-144, 1982.

MUNDAY, D. L.; COX, P. J. Compressed xanthan and karaya gum matrices: hydration, erosion and drug release mechanisms. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 203, p. 179-192, 2000.

MURRAY, M. C.; WORTHINGTON, H. V.; BLINKHORN, A. A study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, n. 11, p. 796-798, 1997.

MUSIAL, W.; KUBIS, A. Carbopols as factors buffering triethanolamine interacting with artificial skin sebum. **Polim. Med.**, Varsóvia, v. 34, n. 4, p. 17-30, 2004.

NAKAGAWA, T.; YAMADA, S.; OOSUKA, Y.; SAITO, A.; HOSAKA, Y.; ISHIKAWA, T.; OKUDA, K. Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Periocline) following scaling and root planning in recurrent periodontal pockets. **Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.**, Tóquio, v. 32, n. 2, p. 63-70, 1991.

NAKAMOTO, R. Y. use of saliva substitute in post-radiation xerostomia. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v. 42, p. 539-542, 1979.

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, J.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of Artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Org. Biomol. Chem.**, Cambridge, v. 1, n. 9, p. 1452-1454, 2003.

NEEDLEMAN, I. G. Controlled drug release in periodontics: a review of new therapies. **Br. Dent. J.**, Londres, v. 170, n. 11, p. 405-408, 1991.

NEEDLEMAN, I. G.; SMALES, F. C. In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. **Biomaterials**, Guilford, v. 16, p. 617-624, 1995.

- NEEDLEMAN, I.G.; MARTIN, G.P.; SMALES, F.C. Characterization of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 74-82, 1998.
- NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 11, n. 5, p. 453-457, 2000.
- NEWMAN, H. N.; YEUNG, F. I. S.; WAN YUSOF, W. A. Z. B.; ADDY, M. Slow release metronidazole and a simplified mechanical oral hygiene regimen in the control of chronic periodontitis **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 11, p. 576-582, 1984.
- NEWMAN, M. G. Current concepts of the pathogenesis of periodontal disease – microbiology emphasis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 56, n. 12, p. 734-739, 1995.
- NIEVA MORENO M. I., ISLA M. I., CUDMANI N. G., VATTUONE M. A., SAMPIETRO A. R. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 68, p. 97-102, 1999.
- NIEVA MORENO, M. I.; ZAMPINI, I. C.; ORDONEZ, R. M.; JAIME, G. S.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, and antimutagenicity of propolis from Tucumán, Argentina. **J. Agric. Food Chem.**, Davis, v. 53, n. 23, p. 8957-8962, 2005.
- NISBET, D. R.; CROMPTON, K. E.; HAMILTON, S. D.; SHIRAKAWA, S.; PRANKERD, R. J.; FINKELSTEIN, D. I.; HORNE, M. K.; FROSYTHE, J. S. Morphology and gelation of thermosensitive xyloglucan hydrogels. **Biophys. Chem.**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 14-20, 2006.
- NOGUCHI, T.; IZUMIZAWA, K.; FUKUDA, M.; KITAMURA, S.; SUZUKI, Y.; IKURA, H. New method for local drug delivery using resorbable base material in periodontal therapy. **Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.**, Tóquio, v. 31, p. 145-153, 1984.
- NORKIEWICZ, D. S.; BREAU LT. G.; WONDERLICH, S. T.; MALONE, K. H. The use of chemotherapeutic agents in localized periodontal pockets. **Mil. Med.**, Washington, v. 166, n. 11, p. 940-946, 2001.
- NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRON, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; MISSEN, S. S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, p. 687-692, 1992.
- NOSTRO, A.; CELLINI, L.; DI BARTOLOMEO, S.; DI CAMPLI, E.; GRANDE, R.; CANNATELLI, M. A.; MARZIO, L.; ALONZO, V. Antibacterial affect of plant extracts against helicobacter pylori. **Phytother. Res.**, Chichester, v. 19, n. 3, p. 198-202, 2005.
- NOYAN, U.; YILMAZ, S.; KURU, B.; KADIR, T.; ACAR, O.; BUGET, E. A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, n. 3, p. 158-165, 1997.

OKSUZ, H.; DURAN, N.; TAMER, C.; CETIN, M.; SILICI, S. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. **Ophthalmic Res.**, Basel, v. 37, n. 6, p. 328-334, 2005.

OKUDA, K.; WOLFF, L.; OLIVER, R.; OSBORN, J.; STOLTENBERG, J.; BEREUTER, J.; ANDERSON, L.; FOSTER, P.; HARDIE, N.; AEPPLI, D.; HARA, K. Mynocline slow-release formulation effect on subgingival bacteria. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 2, p. 73-79, 1992.

ORSI, R. O.; SFORCIN, J. M.; RALL, V. L. M.; FUNARI, S. R. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JR, A. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 109-116, 2005.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomed. Pharmacother.**, Nova Iorque, v. 59, n. 10, p. 561-570, 2005.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 102, n. 1, p. 37-45, 2005.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A. H.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 94, n. 2-3, p. 307-315, 2004.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 28, n. 4, p. 694-700, 2005.

ORSOLIC, N.; SARANOVIC, A. B.; BASIC, I. Direct and indirect mechanism(s) of antitumor activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 72, n. 1, p. 20-27, 2006.

ORSOLIC, N.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumor activity. **Vet. Res. Commun.**, Amsterdam, v. 29, n. 7, p. 575-593, 2005a.

ORSOLIC, N.; SVER, L.; TERZIC, S.; TADIC, Z.; BASIC, I. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible mode of antitumor action. **Nutr. Cancer**, Mahwah, v. 47, n. 2, p. 156-163, 2003.

ORSOLIC, N.; TERZIC, S.; MIHALJEVIC, Z.; SVER, L.; BASIC, I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 28, n. 10, p. 1928-1933, 2005b.

OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, Berlin, v. 44, p. 375-378, 2001.

- OTANI, Y.; TABATA, Y.; IKADA, Y. Effect of additives on gelation and tissue adhesion of gelatin-poly (L-glutamic acid) mixture. **Biomaterials**, Guilford, v. 19, p. 2167-2173, 1998.
- OVERMAN, D. O.; SALOMEN, J. I. Characterization of the human junctional epithelial cells directly attached to the tooth (DAT cells) in periodontal disease. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 73, n. 12, p. 1818-1823, 1994.
- OZKUL, Y.; SILICI, S.; EROGLU, E. The anticariogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 12, n. 10, p. 742-747, 2005.
- PAAVOLA, A.; YLIRUUSI, J.; ROSENBERG, P. Controlled release and dura mater permeability of lidocaine and ibuprofen from injectable poloxamer-based gels. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 52, p. 169-478, 1998.
- PAGE, R. C. The microbiological case for adjunctive therapy for periodontitis. **J. Int. Acad. Periodontol.**, Memphis, v. 6, p. 143-149, 2004.
- PALMIERI, G. F.; WEHRLÉ, P.; STAMM, A. Evaluation of spray-drying as a method to prepare microcapsules for controlled drug release. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, Filadélfia, v. 20, n. 18, p. 2859-2879, 1994.
- PAMPLONA, B. Própolis: Composição e atividades terapêuticas. **Rev. Racine**, São Paulo, v. 7, n. 37, p. 49-53, 1997.
- PANZERI, H.; PEDRAZZI, V.; OGASAWARA, M. S.; ITO, I. Y.; LARA, E. H. G.; GABARRA, F. R. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliações físicas, microbiológicas e clínicas. **Rev. ABO Nac.**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 26-30, 1999.
- PAPAY, V.; TÓTH, L.; SOLTÉSZ, M.; NAGY, É.; LITKEI, G. Isolated compounds from Hungarian propolis on *Populi gemma*. In: FARKAS, L.; GÁBOR, N.; KÁLLAY, F. (Ed.). **Flavonoids and Bioflavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 233-240.
- PARK, E. K.; KIM, S. H.; PARK, S. S. Anti-inflammatory activity of propolis. **Arch. Pharm. Res.**, Seul, v. 19, p. 337-341, 1996.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciênc. Rur. Santa Maria**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.
- PARK, Y. K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; GUZMAN, J. P.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M. Suppression of dioxin mediated aryl hydrocarbon receptor transformation by ethanolic extracts of propolis. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tóquio, v. 68, n. 4, p. 935-938, 2004.
- PARK, Y. K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **J. Agric. Food Chem.**, Davis, v. 53, n. 26, p. 10306-10309, 2005.

- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998a.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Sci.**, Tóquio, v. 21, n. 2, p. 85-90, 2000.
- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; ABREU, J. A. S.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr. Microbiol.**, Nova Iorque, v. 36, p. 24-28, 1998b.
- 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. **J. Agric. Food Chem.**, Davis, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.
- PATEL, D.; SMITH, A. W.; GRIST, N.; BARNETT, P.; SMART, J. D. An in vitro mucosal model predictive of bioadhesive agents in the oral cavity. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 61, p. 175-183, 1999.
- PATEL, N. K.; KENNON, L.; LEVINSON, R. S. Suspensões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Ed.). **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. v. 2, Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2001, cap. 16, p. 819-854.
- PAULINO, N.; DANTAS, A. P.; BANKOVA, V.; LONGHI, A. T.; SCREMIN, A.; DE CASTRO, S. L.; CALIXTO, J. B. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits invitro contraction of airway emooth muscle. **J. Pharm. Sci.**, Nova Iorque, v. 93, p. 307-313, 2003.
- PAVIA, M.; NOBILE, C. G.; ANGELILLO, I. F. meta-analysis of local tetracycline in treating chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 74, n. 6, p. 916-932, 2003.
- PAVIA, M.; NOBILE, C. G.; BIANCO, A.; ANGELILLO, I. F. Meta-analysis of local metronidazole in the treatment of chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 45, n. 6, p. 830-838, 2004.
- PEDRAZZI, V. **Sistemas bioadesivos intrabucais para a liberação programada de fármacos: avaliação da resistência à remoção de um dispositivo acrílico e outro polimérico**. 1999. 169 f. Tese (Doutorado)–Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M.; KARRING, T. Comparative clinical and microbiological affects of topical subgingival application of metronidazole 25% dental gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, p. 715-722, 1992.
- PEH, K. K.; WONG, C. F. Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, Edmonton, v. 2, n. 2, p. 53-61, 1999.

- PENA, S. D. J. Homo brasilis: aspectos genéticos, lingüísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002 (Prefácio).
- PEPPAS, N. A.; HUANG, Y. Nanoscale technology of mucoadhesion interactions. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 56, p. 1675-1687, 2004.
- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.
- PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; RUBINI, D.; GIOVAGNOLI, S.; RICCI, M.; BLASI, P.; ROSSI, C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 95, p. 521-533, 2004.
- PICCINELLI, A. L.; CAMPO FERNANDEZ, M.; CUESTA-RUBIO, O.; MARQUEZ HERNANDEZ, I.; DE SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. **J. Agric. Food Chem.**, Davis, v. 53, n. 23, p. 9010-9016, 2005.
- PITCHER, G. R.; NEWMAN, H. N.; STRAHAN, J. D. Access to subgingival plaque by disclosing agents using mouthrinsing and direct irrigation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 7, p. 300-308, 1980.
- POULET, P. P.; DUFFAUT, D.; LODTER, J. P. Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 26, p. 261-263, 1999.
- QUAGLIA, F.; VIGNOLA, M. C.; DE ROSA, G.; LA ROTONDA, M. I.; MAGLIO, G.; PALUMBO, R. New segmented copolymers containing poly(ϵ -caprolactone) and etheramide segments for the controlled release of bioactive compounds. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 83, p. 263-271, 2002.
- QUEE, T. C. The role of systemic antibiotics in periodontal therapy. **J. Can. Dent. Assoc.**, Toronto, v. 55, n. 12, p. 967-969, 1989.
- RAMFJORD, S. P. maintenance care for treated periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 14, p. 433-437, 1987.
- RANADIVE, K. S.; BHAT, K. M. Local antimicrobial delivery in periodontal therapy. **Indian J. Dent. Res.**, Ahmedabad, v. 9, n. 4, p. 124-130, 1998.
- REDDY, G. T.; KUMAR, T. M.; VEENA. Formulation and evaluation of alendronate sodium gel for the treatment of bone resorptive lesions in periodontitis. **Drug Deliv.**, Filadélfia, v. 12, n. 4, p. 217-222, 2005.
- REDDY, L. H.; MURTHY, R. S. R. Etoposide-loaded nanoparticles made from glyceride lipids: formulation, characterization, in vitro drug release, and stability evaluation. **AAPS PharmSciTech.**, Arlington, v. 6, n. 2, p. 158-166, 2005.

- REIS, C. M. F.; CARVALHO, J. C. T.; PATRÍCIO, K. C. M.; BARBOSA, M. V. J.; CHIEFF, A. L.; BASTOS, E. M. A. F.; KENUPP, J. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Rev. Bras. Farmacog.**, São Paulo, v. 9-10, p. 43-53, 2000.
- RETHMAN, J.; RETHMAN, M.; SUZUKI, J. Controlled release periodontal chemotherapy: the evolution of antimicrobial delivery systems. **Pract. Periodontics Aesthet. Dent.**, Mahwah, p. 1-8, supplement, 1995.
- RICCI, E. J.; BENTLEY, M. V. L. B.; FARAH, M.; BRETAS, R. E. S.; MARCHETTI, J. M. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 17, p. 161-167, 2002.
- RILEY, R. G.; SMART, J. D.; TSIBOUKLIS, J.; DETTMAR, P. W.; HAMPSON, F.; DAVIS, J. A.; KELLY, G.; WILBER, W. R. An investigation of mucus/polymer rheological synergism using synthesised and characterised poly(acrylic acid)s. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 217, p. 87-100, 2001.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medical plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 100, p. 80-84, 2005.
- RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 5, p. 37-42, 1987.
- RODRIGUES, P. H.; CARVALHO, S. A.; COSTA, J. E.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in Brazilian adults with periodontal disease. **Anaerobe**, Londres, v. 5, p. 267-268, 1999.
- RODRIGUES, R. M. J.; GONÇALVES, C.; SOUTO, R.; FERES-FILHO, E. J.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P. V. Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, p. 420-427, 2004.
- ROSCOS, K. V.; FRITZINGER, B. K.; RAO, S. S.; ARMITAGE, G. C.; HELLER, J. Development of a drug delivery system for the treatment of periodontal disease based on bioerodible poly (ortho esters). **Biomaterials**, Guilford, v. 16, n. 4, p. 313-317, 1995.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; WELLER, P. J. **Pharmaceutical excipients 2001**. Handbook de excipientes farmacêuticos. Londres, 2001. CD-ROM.
- RUSSO, A.; CARDILE, A.; SANCHEZ, F.; TRONCOSO, N.; VANELLA, A.; GARBARINO, J. A. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action inhuman tumor cell lines. **Life Sci.**, Oxford, v. 76, n. 5, p. 545-548, 2004.
- SABIR, A.; TABBU, C. R.; AGUSTIONO, P.; SOSROSENO, W. Histological analysis of rat dental pup tissue capped with propolis. **J. Oral Sci.**, Tóquio, v. 47, n. 3, p. 135-138, 2005.

- SAGLIE, R.; NEWMAN, M. G.; CARRANZA JR, F. A.; PATTISON, G. L. Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 53, n. 4, p. 217-222, 1982.
- SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Nat. Prod. Res.**, Milton Park, v. 19, n. 2, p. 183-188, 2005.
- SAKELLARI, D.; GOODSON, J. M.; SOCRANSKY, S. S.; KOLOKOTRONIS, A.; KONSTANTINIDIS, A. Concentration of 3 tetracyclines in plasma, gingival crvice fluid and saliva. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2000.
- SAKELLARI, D.; VOUIROS, I.; KONSTANTINIDIS, A. The use of tetracycline fibres in the treatment of generalised aggressive periodontitis: clinical and microbiological findings. **J. Int. Acad. Periodontol.**, Londres, v. 5, n. 2, p. 52-60, 2003.
- SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.
- SALOMAO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; CAMPOS, L. C.; MACHADO, D. G.; AQUINO NETO, F. R.; DE CASTRO, S. L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 87-92, 2004.
- SAMATI, Y.; YUKSEL, N.; TARIMCI, N. Preparation and characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres containing flubiprofen sodium. **Drug Deliv.**, Filadélfia, v. 13, n. 2, p. 105-111, 2006.
- SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A. F.; UZEDÂ, M.; CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A. Antibacterial activity of propolis produced in Brazil against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* spp. and bacteria from *Bacteroides fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. **Anaerobe**, Londres, v. 5, p. 479-481, 1999.
- SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A.; RODRIGUES, P. H.; UZEDA, M. DE; CARVALHO, M. A. R. DE; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A. Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. **Anaerobe**, Londres, v. 8, p. 9-15, 2002a.
- SANTOS, F.A.; BASTOS, E. M. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A.; BRAGA, F. C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v. 80, p. 1-7, 2002b.
- SANTOS, V. R.; PIMENTA, F. J.; AGUIAR, M. C.; DO CARMO, M. A.; NAVES, M. D.; MESQUITA, R. A. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol própolis extract. **Phytother. Res.**, Chichester, v. 19, n. 7, p. 652-654, 2005.
- SASTRAVAHA, G.; YOTNUENGKIT, P.; BOONCONG, P.; SANGTHERAPITIKUL, P. Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts: a preliminary study. **J. Int. Acad. Periodontol.**, Londres, v. 5, n. 4, p. 106-115, 2003.

- SAWAYA, A. C. H. F.; PALMA, A. M.; CAETANO, F. M.; MARCUCCI, M. C.; DA SILVA CUNHA, I. B.; ARAUJO, C. E. P.; SHIMIZU, M. T. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v. 35, p. 203-207, 2002.
- SAWAYA, A. C. H. F.; SOUZA, K. S.; MARCUCCI, M. C.; CUNHA, I. B. S.; SHIMIZU, M. T. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against Gram-positive bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 104-109, 2004.
- SCHERLUND, M.; MALMSTEN, M.; HOLMQVIST, P.; BRODIN, A. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 194, p. 103-116, 2000.
- SCHMOLKA, I. Artificial skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 6, p. 571-582, 1972.
- SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry**. Germany: Gebrueder HAAKE GmbH, 1998. 291p.
- SCHWACH-ABDELLAOUI, K.; LOUP, P. J.; VIVIEN-CASTIONI, N.; MONBELLI, A.; BAEHNI, P.; BARR, J.; HELLER, J.; GURNY, R. Bioerodible injectable poly(ortho ester) for tetracycline controlled delivery to periodontal pockets: preliminary trial in humans. **AAPS Pharm. Sci.**, Arlington, v. 4, n. 4, p. 1-7, 2002.
- SCIFO, C.; MILASI, A.; GUARNERA, A.; SINATRA, F.; RENIS, M. Resveratrol and propolis extract: an insight into the morphological and molecular changes induced in DU145 cells. **Oncol. Res.**, Elmsford, v. 15, n. 9, p. 409-421, 2006.
- SEIDENARI, S.; GIUSTI, F.; PEPE, P.; MANTOVANI, L. Contact sensitization in 1094 children undergoing patch testing over a 7-year period. **Pediatr. Dermatol.**, Boston, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2005.
- SEYMOUR, R. A.; HEASMAN, P. A. **Drugs, diseases, and the periodontum**. New York: Oxford Medical Publications, Oxford University Press, 1992.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v. 73, p. 243-249, 2000.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C. A. M.; FUNARI, S. R. C.; BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and 53. *Candida tropicalis*. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2001.
- SFORCIN, J. M.; NOVELLI, E. L. B.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2002.

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v. 98, n. 3, p. 301-305, 2005.

SHARMA, P.K.; BHATIA, S.R. Effect of anti-inflammatories on Pluronic[®] F127: micellar assembly, gelation and partitioning. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 278, p. 361-377, 2004.

SHIMIZAWA, M.; CHIKAMATSU, S.; MORIMOTO, N.; MISHIMA, S.; NAGAI, H., HARA, H. Neuroprotection by Brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 201-207, 2005.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemisinin in Brazilian propolis. **Arch. Biochem. Biophys.**, Nova Iorque, v. 424, n. 2, p. 181-188, 2004.

SHIN, S. C.; BUM, J. P.; CHOI, J. S. Enhanced bioavailability by buccal administration of triamcinolone acetonide from the bioadhesive gels in rabbits. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 209, p. 37-43, 2000.

SHIN, S.-C.; KIM, J.-Y.; OH, I.-J. Mucoadhesive and physicochemical characterization of Carbopol-Poloxamer gels containing triamcinolone acetonide. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, Nova Iorque, v. 26, n. 3, p. 307-312, 2000.

SHIN, S.-C.; KIM, J.-Y. Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the buccal mucosa. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 50, p. 217-220, 2000.

SHOJAEI, A. H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, Edmonton, v. 1, n. 1, p. 15-30, 1998.

SHUKLA, S.; BHADARIA, M.; JADON, A. Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Indian J. Exp. Biol.**, Nova Deli, v. 42, n. 10, p. 993-997, 2004.

SIHORKAR, V.; VYAS, S. P. Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. **Pharm. Res.**, Nova Iorque, v. 18, n. 9, 2001.

SILICI, S.; KOÇ, N. A.; AYANGIL, D.; ÇANKAYA, S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with supercritical mycoses. **J. Pharmacol.**, Paris, v. 99, p. 39-44, 2005.

SILVA, F. B.; ALMEIDA, J. M.; SOUSA, S. M. Natural medicaments in endodontics - a comparative study of the anti-inflammatory action. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 174-179, 2004.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v. 94, p. 59-65, 2004.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THIES, D. L.; FREEMAN, F.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharm. Technol.**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 34-43, 1997.

SLOTS, J. Selective medium of isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 15, n. 4, p. 606-609, 1982.

SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 6, p. 351-382, 1979.

SLOTS, J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 84, n. 1, 1976.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SONMEZ, S.; KIRILMAZ, L.; YUCESAY, M.; YÜCEL, B.; YILMAZ, B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **J. Ethnopharmacol.**, Lousane, v. 102, p. 371-376, 2005.

SOSKOLNE, W. A.; GOLOMB, G.; FRIEDMAN, M.; SELA, M. N. New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use II. Use in periodontal therapy. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 18, p. 330, 1993.

SOSKOLONE, W. A.; CHAJEK, T.; FLASHNER, M.; LANDAU, I.; STABHOLTZ, A.; KOLATCH, B.; LERNER, E. I. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChipTM in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, p. 1017-1021, 1998.

SOSKOLONE, W. A.; FREIDMAN, M. F. Intra-periodontal pocket drug delivery systems. In: Rathbone, M. J. (Ed.). **Oral mucosal drug delivery**. New York: Marcel Dekker, v 74, 1996. p. 359-379.

STABHOLZ, A.; NICHOLAS, A. A.; ZIMMERMAN, G. J.; WIKESJO, U. M. Clinical and antimicrobial effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine in deep periodontal pockets. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, n. 10, p. 794-800, 1998.

STABHOLZ, A.; SELA, M. N.; FRIEDMAN, M.; GOLOMB, G.; SOSKOLONE, W. A. Clinical and microbiological effects of sustained release chlorhexidine in periodontal pockets. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 13, n. 8, p. 783-788, 1986.

STABHOLZ, A.; SOSKOLONE, W. A.; FRIEDMAN, M.; SELA, M. N. The use of sustained release delivery of chlorhexidine for the maintenance of periodontal pockets: 2-year clinical trial. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 7, p. 429-433, 1991.

STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M.; SOSKOLNE, A.; SELA, M. N. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: *in vitro* release study. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 61, n. 7, p. 393-398, 1990.

STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M. Sustained release drug delivery devices for local treatment of dental diseases. In: TYLE, P. (ed.). **Drug Delivery Devices**. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 491-515.

STELZEL, M.; FLORES-DE-JACOBY. Topical metronidazole application in recall patients. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, p. 914-919, 1997.

STEPANOVIC, S.; ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC-VLAHOVIC, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiol. Res.**, Jena, v. 158, n. 4, p. 353-357, 2003.

STOLTZE, K. Concentration of metronidazole in periodontal pockets after application of a metronidazole 25% dental gel. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, p. 698-701, 1992.

STOLTZE, K. Elimination of Elyzol 25% Dentalgel matrix from periodontal pockets **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 22, p. 185-187, 1995.

STOLTZE, K.; STELLFED, M. Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 19, p. 693, 1992.

SUH, H.; JUN, H. W. Physicochemical and release studies of naproxen in poloxamer gels. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 129, p. 13-20, 1996.

TAKAGI, Y.; CHOI, I. S.; YAMASHITA, T.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, I.; HASEGAWA, T.; OSHIMA, M.; GU, Y. H. Immune activation and radioprotection by propolis. **Am. J. Chin. Med.**, Singapura, v. 33, n. 2, p. 231-240, 2005.

TAMBURIC, S.; CRAIG, D. Q. M. An investigation into the rheological, dielectric and mucoadhesive properties of poly(acrylic acid) gel systems. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 37, p. 59-68, 1995.

TAN, Y. T. F.; PEH, K. K.; AL-HANBALI, O. Effect of carbopol and polyvinylpyrrolidone on the mechanical, rheological, and release properties of bioadhesive polyethylene glycol gels. **AAPS PharmSciTech.**, Arlington, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2000.

TANNER, A. C. R.; HAFFER, C.; BRATTHAIL, G. T.; VISCONTI, R. A.; SOCRANSKY, S. S. A study of bacteria associated with advancing periodontitis in man. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 6, p. 278-307, 1979.

TAN-NO, K.; NAKAJIMA, T.; SHOJI, T.; NAKAGAWASAI, O.; NIJIMA, F.; ISHIKAWA, M.; ENDO, Y.; SATO, T.; SATOH, S.; TADANO, T. Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. **Biol. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 29, n. 1, p. 96-99, 2006.

TAZAWA, S.; WARASHIMA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chem. Pharm. Bull.**, Tóquio, v. 19, p. 966-970, 1996.

TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

- THOMSON, S. J.; GRAHAM, G. S.; FANCHER, J. P.; BROOME, J. C.; CAUDIL, R. F. Periodontal effects of local tetracycline delivery by two biodegradable vehicles. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 71, p. 295, 1992.
- TING, P. T.; SILVER, S. Allergic contact dermatitis to propolis. **J. Drugs Dermatol.**, Nova Iorque, v. 3, n. 6, p. 685-686, 2004.
- TINOCO, E. M. B.; BELDI, M. I.; CAMPEDELLI, F.; LANA, M.; LOUREIRO, C. A.; BELLINI, H. T.; RAMS, T. E.; TINOCO, P. G.; PREUS, H. R.; Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 69, n. 12, p. 1355-1363, 1998.
- TONETTI, M.; CUGINI, M. A.; GOODSON, J. M. Zero-order delivery with periodontal placement of tetracycline-loaded ethylene vinyl acetate fibres. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v. 25, p. 243-249, 1990.
- TOSH, S. M.; MARANGONI, A. G. Determination of the maximum gelation temperature in gelatin gels. **Appl. Phys. Lett.**, Nova Iorque, v. 84, n. 21, p. 4242-4244, 2004.
- TOSI, B.; DOMINI, A.; ROMAGNOLI, C.; BRUNI, A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytother. Res.**, Chichester, v. 10, p. 335-336, 1996.
- TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; GREGORIO RODRIGUEZ, J.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, Milão, v. 75, n. 7-8, p. 683-689, 2004.
- TUNG, I-C. Rheological behavior of poloxamer 407 aqueous solutions during sol-gel and dehydration processes. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 107, p. 85-90, 1994.
- TURNBULL, R. S. Chemotherapeutic control of plaque and gingivitis. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 55, n. 12, p. 965-966, 1989.
- URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona**. 2004. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara: 2004.
- URBAN, M. C. C.; BRUSCHI, M. L.; CHIAVACCI, L. A.; FREMIÃO, M. P. Development and physical characterization of non-ionic microemulsions containing PPG-5-CETETH-20. In: SURFACTANTS IN SOLUTION SYMPOSIUM, 15., 2004, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: UNESP, 2004. 1 CD-ROM.
- USIA, T.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v. 65, p. 673-676, 2002.
- UZEL, A.; SORKUN, K.; ONCAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIB, B. Chemical composition and antimicrobial activities of our different Anatolian propolis samples. **Microbiol. Res.**, Jena, v. 160, n. 2, p. 189-195, 2005.

VAN DER OUDERAA, F. J. G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 18, p. 447-454, 1991.

VAN STEENBERGHE, D.; BERCY, P.; KOHL, J.; DE BOEVER, J.; ADRIAENS, P.; VANDERFAEILLIE, A.; ANDRIAENSSEN, C.; ROMPEN, E.; DE VREE, H.; MCCARTHY, F.; VANDENHOVEN, G. Subgingival minocycline hydrochloride ointment in moderate to severe chronic adult type periodontitis: a randomized, double blind, vehicle-controlled, multicenter study. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 64, p. 637, 1993.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Fisiologia humana**. 3. ed., São Paulo: McGraw-Hill, 1981, p. 1-3.

VANDERKERCKHOVE, B. N. A.; QUIRYNEN, M.; STEENBERGHE, D. The use of locally-delivered minocycline in the treatment of chronic periodontitis. A review of the literature. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, p. 964-968, 1998.

VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis. - I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. **J. Pharm. Belg.**, Bruxelas, v. 35, n. 5, p. 253-259, 1979.

VARSHOSAZ, J.; DEHGHAN, Z. Development and characterization of buccoadhesive nifedipine tablets. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 54, p. 135-141, 2002.

VENUGOPAL, K.; SINGH, S. Avaliação de gelatinas quanto ao potencial de encadeamento cruzado. **Pharm. Technol. Brasil**, São Paulo, v. 5, n. 6, p. 14-20, 2001.

VINHOLIS, A. H. C.; FIGUEIREDO, L. C.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; MARCANTONIO, R. A. C.; SALVADOR, S. L. S.; GOISSIS, G. Subgingival utilization of a 1% chlorhexidine collagen gel for the treatment of periodontal pockets. A clinical and microbiological study **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 209-213, 2001.

VYAS, S. P.; SIHORKAR, V.; DUBEY, P. K. Preparation, characterization and in vivo antimicrobial activity of metronidazole bearing lectinized liposomes for intra-periodontal pocket delivery. **Pharmazie**, Berlin, v. 56, n. 7, p. 554-560, 2001.

WADE, A.; WELLER, P. J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 2º edição. Londres: The Pharmaceutical Press, 1994. 651 p.

WALGRAVE, S. E.; WARSHAW, E. M.; GLESNE, L. A. Allergic contact dermatitis from propolis. **Dermatitis**, Hamilton, v. 16, n. 4, p. 209-215, 2005.

WAN YUOSOF, W. Z. A.; NEWMAN, H. N.; STRAHAN, J. D.; COVENTRY, J. F. Subgingival metronidazole in dialysis tubing and subgingival chlorhexidine irrigation in the control of chronic inflammatory periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 11, n. 166-175, 1984.

WESTLING, M.; TYNELIUS-BRATTHALL, G. Microbiological and clinical short-term effects of repeated intracrevicular chlorhexidine rinsings. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 19, n. 2, p. 202-209, 1984.

- WILKINS, E. M. **Clinical practice of the dental hygienist**. London: Lea & Febiger, 7. ed., 1994, 990 p.
- WILLIAMS, R. C.; HOWELL, T. H. New technologies for the diagnosis of periodontal disease. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v. 69, n.6, p. 551-557, 1993.
- WOHRL, S.; HEMMER, W.; FOCKE, M.; GOTZ, M. JARISCH, R. Patch testing in children, adults, and the elderly: influence of age and sex on sensitization patterns. **Ped. Dermatol.**, Boston, v. 20, n. 2, p. 1-9, 2003.
- WOISKY, R. G.; GIESBRECHT, A. M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 19-21, 1994.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apic. Res.**, Londres, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.
- WONG, C. F.; YUEN, K. H.; PEH, K. K. An in-vitro method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 180, p. 47-57, 1999a.
- WONG, C. F.; YUEN, K. H.; PEH, K. K. Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 178, p. 11-22, 1999b.
- WOOD, R. How validate analytical methods. **Trends Anyt. Chem., Amsterdam**, v. 18, n. 9+10, p. 624-632, 1999.
- WOOLFSON, A. D.; MALCON, R. K.; CAMPBELL, K.; JONES, D. S.; RUSSELL, J. A. Rheological, mechanical and membrane penetration properties of novel dual drugs systems for percutaneous delivery. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 67, p. 395-408, 2000.
- WOOLFSON, A. D.; McCAFFERTY, D. F.; McCALLION, C. R.; McADAMS, E. T.; ANDERSON, J. M. Moisture-activated, electrically conducting bioadhesive hydrogels as interfaces for bioelectrodes: effect of film hydration on cutaneous adherence in wet environments. **J. Appl. Polym. Sci.**, Nova Iorque, v. 58, p. 1291-1296, 1995.
- YEUNG, F. I. S.; NEWMAN, H. N.; ADDY, M. Subgingival metronidazole in acrylic resin vs chlorhexidine irrigation in the control of chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 54, n. 11, p. 651-657, 1983.
- YOSHIZUMI, K.; NISHIOKA, N.; TSUJI, T. The xanthine oxidase inhibitory activity and hypouricemia effect of the propolis in rats. **Yakugaku Zasshi**, Tóquio, v. 125, n. 3, p. 315-321, 2005.
- ZENÓBIO, E. G.; MENDES, M. M. S. G.; EL GUINDY, M.; DE TOLEDO, B. E. Matriz extracelular homeostasia e regeneração periodontal. **Rev. ABO Nac.**, São Paulo, v. 4, nº 4, p. 240-243, 1996.
- ZHANG, L.; PARSONS, D. L.; NAVARRE, C.; KOMPELLA, U. B. development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 85, p. 73-81, 2002.

ZHANG, Z. Y., PING, Q. N., XIAO, B. Microencapsulation and characterization of tramadol-resin complexes. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 66, p. 107-113, 2000.

ZUANAZZI, J. A. da S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Coord.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2 ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2000. Cap. 23. p. 489-516.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Trabalho 1

86

Rev. ABO Nac.

Vol. 13 nº 2 - Abril/maio 2005

Progressos recentes na pesquisa da utilização de própolis em Periodontia

Recent progresses in research of propolis use in Periodontology

Palavras-chave: Própolis, Uso Terapêutico; Doenças Periodontais, Prevenção e Controle.

Key words: *Propolis, Therapeutic Use; Periodontal Diseases; Prevention and Control.*

Marcos Luciano BRUSCHI*

Heitor PANZERI**

Elza Helena Guimarães LARA***

RESUMO

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas melíferas a partir da coleta de exsudatos de várias fontes vegetais e que possui um amplo espectro de atividades biológicas. Vários grupos de pesquisadores têm estudado a utilização da própolis na Odontologia, e os artigos científicos relatam suas propriedades farmacológicas. Esse artigo revisa os resultados de estudos recentes da utilização de própolis na Periodontia. Também é discutido o desenvolvimento de formas farmacêuticas com própolis, para o uso na prevenção e tratamento de doenças periodontais.

ABSTRACT

Propolis is resinous hive products collected by honeybees from various plant sources. It is a popular folk medicine possessing a broad spectrum of biological activities. Several groups of researches have focused their attention on the use of propolis in dentistry. Many scientific articles are published related to the pharmacological properties of propolis. This review article compiles recent findings on the use of propolis in Periodontology. The development of propolis pharmaceutical dosage forms for use in the prevention and treatment of periodontal diseases is discussed too.

INTRODUÇÃO

A busca pela cura de enfermidades e pelo bem estar tem sido uma constante na história da Humanidade. Durante milênios, o homem vem aprofundando seus conhecimentos na busca de soluções para suas necessidades básicas, como nutrição, reprodução e proteção. Nos dias de hoje, utilizando-se de recursos dos reinos mineral, vegetal e animal, o Homem, com seu conhecimento, busca constantemente o desenvolvimento de novos fármacos.

As virtudes da natureza também são utilizadas por outros seres do reino animal, como é o caso das abelhas, que existem no planeta pelo menos há 20 milhões

de anos e que estabeleceram um comportamento social dos mais eficientes em sua história evolutiva, caracterizado pela prioridade dada ao desempenho coletivo (MALASPINA³⁵, 1991). Assim, a partir da coleta de material resinoso, gomoso ou balsâmico de botões de flores, sépalas e pétalas, folhas, caules e cascas de árvores, esses insetos produzem a própolis.

A importância da própolis na produção de medicamentos evidencia-se pela existência de inúmeras ações farmacológicas, tais como antiinflamatória, antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antioxidante, antiprototozoária e cicatrizante (BURDOCK¹⁴, 1998). Nesse sentido, várias in-

* Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas FCFRP/USP – SP. Mestre em Ciências Farmacêuticas pela FCFAR/UNESP – SP. Professor Assistente do Curso de Farmácia da UEM-PR.

** Doutor em Odontologia pela FORP – USP. Professor titular do Curso de Odontologia da FORP/USP – SP.

*** Doutora em Ciências Farmacêuticas pela FCF/USP – SP. Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP/USP – SP

vestigações têm sido realizadas quanto à utilização da própolis em áreas da Odontologia, tais como na Cariologia, na Cirurgia Oral, na Patologia Oral, na Endodontia e na Periodontia (MANARA *et al.*³⁶, 1999; SANTOS⁴⁷, 1999). Assim, o objetivo do presente artigo é revisar literatura relacionada com a utilização da própolis no tratamento de doenças periodontais.

IDENTIFICAÇÃO E TERMINOLOGIA DA PRÓPOLIS

O termo própolis é derivado do grego, significando em defesa (*pro*) da cidade (*polis*) (GHISALBERTI²⁴, 1979). Trata-se de um forte adesivo, substância resinosa coletada, transformada e usada pelas abelhas para selar frestas em suas colméias, paredes internas e proteger a entrada contra intrusos. As abelhas (*Apis mellifera* L.) coletam a resina em frestas no tronco das árvores, em brotos e nos exsudatos das plantas. A essa "matéria-prima", as abelhas misturam a cera e adicionam enzimas salivares, principalmente a enzima 13-glicosidase, formando a própolis (GREENAWAY *et al.*²⁵, 1990; MOREIRA³⁹, 1986). Seus constituintes refletem a sua origem botânica e, com o advento de análises químicas mais sofisticadas, pôde-se identificar espécies de árvores que podem ser utilizadas como fonte de material para a produção de própolis pelas abelhas (BURDOCK¹⁴, 1998). Na Europa, América do Sul, América do Norte e oeste da Ásia, a principal fonte de própolis é o exsudato de brotos de choupo (*Populus* sp.) e, menos comumente, de outros gêneros, como *Bétula* sp., *Pinus* sp. e *Acacia* sp. (KÖNIG²⁷, 1985). No Brasil, ainda não se conseguiu identificar as diversas espécies de plantas visitadas pelas abelhas para a retirada de resina, mas o alecrim do campo ou vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*), pinheiros (*Pinus* sp.), aroeira (*Schinus terebenthifolius*) e eucalipto (*Eucalyptus* sp.) são alguns exemplos (ABELHAS¹, 2002; PAMPLONA⁴³, 1997).

Basicamente, a própolis é constituída por resina (46%), cera de abelha (27%), princípios voláteis (7%) e impurezas (13%)

(MOREIRA³⁹, 1986). Através de técnicas cromatográficas, mais de 200 constituintes já foram identificados entre eles estão os compostos fenólicos, ésteres, derivados do álcool e do ácido cinâmico, alguns derivados do benzaldeído, substâncias voláteis, ésteres vinílicos, alguns fitosteróis, vitaminas, elementos minerais, aminoácidos e polissacarídeos (VANHAELLEN e VANHAELLEN-FASTRÉ⁵⁴, 1979; BANSKOVA *et al.*^{7,8,9}, 1992; 1994; 1995; KULEVANOVA *et al.*³², 1995; MACIEJEWICZ *et al.*³⁴, 2001).

PRÓPOLIS E PERIODONTIA

A utilização de própolis foi descrita inicialmente pelos assírios, pelos gregos, pelos romanos, pelos incas e pelos egípcios (GHISALBERTI²⁴, 1979; PEREIRA *et al.*⁴⁶, 2002). Na idade moderna, o uso da própolis intensificou-se, como desinfetante e cicatrizante, na guerra dos Bôeres na África do Sul e também no começo do século XIX no tratamento da doença de Chagas na França (CARMO¹⁵, 1999; PAMPLONA⁴³, 1997). Ao longo dos tempos observou-se a sua versatilidade de atividade biológica, onde os efeitos hepatoprotetor e antiinflamatório, assim como as atividades antimicrobianas, antitumoral, imunestimulante e antioxidante, são os mais descritos (BANSKOTA *et al.*¹⁰, 2001).

Existem trabalhos relacionando a sua aplicação em várias áreas da Odontologia (Cariologia, Cirurgia Oral, Endodontia e Periodontia), alguns dos quais muito bem revisados por MANARA *et al.*³⁶ (1999) e por SANTOS⁴⁷ (1999). No entanto, progressos recentes têm sido obtidos principalmente no estudo e desenvolvimento de preparações para a prevenção e o tratamento de doenças periodontais e para a manutenção de um periodonto saudável.

A causa primária da doença periodontal (gingivite e periodontite) é considerada ser os produtos bacterianos presentes na placa dentária. A aderência bacteriana envolve mecanismos físico-químicos específicos, e é influenciada não apenas pela interação entre as estruturas da superfície das bactérias e as superfícies colonizáveis,

mas, também pela atividade da saliva como fluido em suspensão (FERREIRA¹⁹, 1995). A capacidade de cura da própolis em periodontites, como também o impedimento da formação de placas e do desenvolvimento de gengivites, foi relatada (MARCUCCI³⁷, 1995).

Extratos hidroalcoólicos de própolis de várias regiões do Brasil (MG, SP, MS, PR, RS) e compostos isolados apresentaram a capacidade de inibir a atividade da glicosiltransferase, do crescimento de *Streptococcus mutans* e da formação e aderência de placa dentária (PARK *et al.*⁴⁵, 1998; KOO *et al.*^{28, 29}, 2000, 2002).

Dessa maneira, a utilização da própolis como adjuvante no tratamento periodontal foi sugerida por GEBARA²² (1999). Estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados para avaliar a ação antimicrobiana da própolis sobre micro organismos periodonto patogênicos e organismos oportunistas. Os resultados do estudo *in vitro* demonstraram a ação da própolis sobre todos os organismos testados. Os estudos *in vivo*, revelaram que a própolis aplicada através de procedimentos de irrigação da bolsa periodontal, mostrou-se efetiva na diminuição do total de bactérias viáveis, dos níveis de *Porphyromonas gingivalis* e dos sítios positivos para leveduras, não levando à seleção de organismos oportunistas. Ocorreu também uma diminuição da profundidade clínica de sondagem após seis meses dos procedimentos de irrigação. Na sequência, foi investigada a ação de um extrato etanólico de própolis como adjuvante no tratamento periodontal em vinte pacientes adultos com periodontite. Estes receberam instruções de higiene oral, sendo escolhidos em cada um três dentes não adjacentes com profundidade de bolsa de cinco milímetros. Um dos dentes foi irrigado com uma solução aquosa de extrato de própolis, um outro dente recebeu irrigação com um placebo (etanol) e o terceiro dente não recebeu nenhum tratamento adicional. Foram coletados dados microbiológicos e clínicos no início e depois de 4, 6 e 24 semanas de tratamento. A utilização de própolis diminuiu o teor total de bactérias viáveis e aumentou a propor-

ção de sítios com *P. gingivalis*, em quatro semanas e se manteve pelas 24 semanas. A proporção de sítios com presença detectável de fungos diminuiu com o tratamento com extrato de própolis na quarta e sexta semana. O uso de própolis não selecionou organismos oportunistas tais como Estafilococos coagulase positiva e *Pseudomonas* sp. Concluiu-se que o extrato de própolis foi efetivo, *in vivo*, no tratamento periodontal (GEBARA *et al.*²³, 2001).

Os efeitos antimicrobianos de diferentes extratos hidroalcoólicos de própolis frente a *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* sp. e ao grupo *Bacterioides fragilis* foram avaliados por SANTOS *et al.*⁴⁸ (1999). Os resultados demonstraram que os extratos possuíam propriedades inibitórias *in vitro* frente aos micro-organismos testados.

O valor clínico da própolis no tratamento de doenças periodontais também foi demonstrado por SANTOS *et al.*⁴⁹ (2002a). Eles estudaram o perfil de susceptibilidade de 17 cepas de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, isoladas de pacientes com periodontites, e de três cepas de referência frente a seis antimicrobianos, prescritos na Odontologia no Brasil e a própolis. Os agentes antimicrobianos testados foram tetraciclina, penicilina, clindamicina, eritromicina, metronidazol, meropenem e seis extratos hidroalcoólicos de própolis brasileira. As cepas de referência *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram utilizadas na determinação da concentração bactericida mínima e para o ensaio de tempo de morte para os extratos de própolis. Todas as cepas foram susceptíveis à penicilina, eritromicina, meropenem, metronidazol e 95% delas foram susceptíveis à tetraciclina. Trinta e seis por cento das cepas de *P. intermedia* e *P. nigrescens* testadas foram resistentes à clindamicina. Para a própolis, todas as cepas foram susceptíveis e os valores de concentração inibitória mínima foram de 64 a 256 µg/mL. Para as cepas de referência, a concentração bactericida mínima foi de 256 µg/mL e a morte foi observada dentro de 3 horas de incubação para *P. gingivalis* e dentro de 6 horas para *P. intermedia*. Também foi

avaliada a atividade do extrato etanólico e de frações da própolis frente a outras bactérias causadoras de doenças periodontais (*A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *P. gingivalis*; *P. intermedia*, *Eubacterium lentum* e *Peptostreptococcus anaerobius*) (SANTOS *et al.*⁵⁰ 2002). Verificou-se que todas as bactérias ensaiadas foram susceptíveis ao extrato de própolis e às frações. Contudo, nenhuma das frações foi mais ativa que o extrato, sugerindo que a atividade antibacteriana é devida principalmente ao efeito sinérgico de vários compostos presentes no mesmo. Também foi observado por FERREIRA¹⁹ (1999) que o extrato etanólico de própolis 10% possui atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas de *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *Clostridium perfringens* e *Actinomyces israelii*.

Outros estudos investigaram a atividade da própolis frente a patógenos orais. KOO *et al.*²⁹ (2000) estudaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *Prevotella denticola*. Observaram que o extrato de própolis inibiu todos os microrganismos testados, demonstrando uma zona inibitória maior para *Actinomyces* sp. e, ainda inibiu a aderência celular e a formação de glucano insolúvel em água.

A investigação de extratos de própolis de diferentes origens demonstrou atividade antimicrobiana frente a várias espécies de *Cândida*. AZEVEDO *et al.*⁵ (1999) determinaram a diluição máxima inibitória (DMI) do extrato etanólico de própolis 10% e do digluconato de clorexidina 0,12% frente a cepas de *Candida* sp isoladas da cavidade oral de seres humanos com e sem lesões. A maioria das cepas foi sensível aos dois anti-sépticos, sendo o DMI para o extrato de própolis 1:20 e de 1:160 para a clorexidina. KUJUMGIEV *et al.*³¹ (1999), trabalhando com amostras de própolis de diferentes regiões do mundo, avaliou a

atividade de extratos alcoólicos 10% (p/V) frente a *Candida albicans*. Todos os extratos exibiram atividade frente ao microrganismo. Trabalhando com extratos etanólicos de própolis brasileira. SFORCIN *et al.*⁵² (2001) também observaram que *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram sensíveis a baixas concentrações dos mesmos, sendo que a primeira espécie apresentou uma sensibilidade maior. OTA *et al.*⁴² (2001), estudaram a atividade de extratos etanólicos de própolis brasileira frente a 75 cepas de *Cândida*, sendo vinte cepas de *C. albicans*, vinte de *C. tropicalis*, vinte de *C. krusei* e quinze de *C. guilliermondii*. Os fungos demonstraram sensibilidade aos extratos testados com a seguinte ordem de sensibilidade: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*. As atividades antimicrobianas frente a *C. albicans* de extratos etanólicos de própolis brasileira e da Turquia também foram confirmadas por SAWAYA *et al.*⁵¹ (2002) e KARTAL *et al.*²⁶ (2003), respectivamente.

Outras investigações demonstraram a atividade antimicrobiana da própolis frente a várias espécies de bactérias, normalmente na forma de extrato etanólico: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Arthrodema benhamiae*, *Enterococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, dentre outras (KROL *et al.*³⁰, 1993; AGA *et al.*⁴, 1994; TOSI *et al.*⁵³, 1996; MENEZES *et al.*³⁸, 1997; MORENO *et al.*⁴⁰, 1999; BOSIO *et al.*¹¹, 2000; FERNANDES JR *et al.*¹⁸, 2001; KARTAL *et al.*²⁶, 2003).

PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS COM PRÓPOLIS PARA PERIODONTIA

A frequência e a severidade da doença periodontal aumenta com a idade e com a higiene oral inadequada. Estudos clínicos mostraram que os microrganismos começam a colonizar rapidamente superfícies dentárias limpas, se a pessoa fizer abstenção da limpeza dentária mecânica, ao final de poucos dias, os sinais microscópicos e clínicos de gengivite estarão assim, patentes. Essas alterações inflamatórias são so-

lucionadas ou revertidas quando medidas apropriadas de limpeza dentária são retomadas. Além disso, a inflamação pode ser evitada pelo uso diário de agentes antimicrobianos que evitem colonização de bactérias na superfície dentária (FERREIRA²⁰, 1995). Nesse sentido, existem vários estudos de desenvolvimento e avaliação de produtos odontológicos com própolis para a utilização pelo próprio paciente na higiene bucal diária.

BAAKILINI *et al.*⁶ (1996) desenvolveram e avaliaram as propriedades e estabilidade de dentífricos contendo própolis com diferentes níveis de abrasividade. Os resultados obtidos demonstraram um caminho promissor na produção de dentífricos com própolis, levando em consideração a correta formulação do produto. PANZERI *et al.*⁴⁴ (1999) desenvolveram um dentífrico na forma de gel com 3% de extrato de própolis e realizaram testes físico-químicos, clínicos (duplo cego) e microbiológicos. As avaliações físico-químicas revelaram condições ideais para o emprego do produto com própolis como agente terapêutico. Os testes microbiológicos demonstraram uma eficiente ação antibacteriana contra cocos gram-positivos, onde o *Enterococcus faecalis* e os bastonetes gram-negativos foram mais resistentes que os outros microrganismos testados. Pelos testes clínicos observou-se que o dentífrico com própolis foi mais efetivo que o dentífrico sem o agente terapêutico no controle do índice gengival, sendo uma alternativa viável como agente preventivo ou terapêutico da doença periodontal. Resultados similares foram obtidos em estudos com um creme dental com própolis cubana (ABREU *et al.*^{2,3}, 1998; 2000).

Uma das formas mais comuns de utilização da própolis para a higiene bucal é na forma de gargarejo e bochechos. Assim sendo, vários estudos têm sido realizados no sentido de se desenvolver e avaliar a ação de enxaguatórios bucais com própolis. Uma solução hidroalcoólica de própolis 0,84% foi testada *in vivo*, na forma de bochechos, três vezes ao dia após a higiene bucal, por vinte pacientes (DUARTE e KFOURI¹⁷, 1999). Verificou-se que não

houve alteração no índice de placa e de gengivite na concentração utilizada, após vinte dias. Os autores argumentaram a necessidade de se testar preparações mais concentradas de própolis. Por outro lado, MURRAY *et al.*⁴¹ (1997) e KOO *et al.*²⁹ (2000) observaram que enxaguatórios bucais contendo própolis foram capazes de inibir a formação de placa dentária, porém com uma intensidade menor que a clorexidina, e demonstrando também eficiência na redução na formação da placa subgengival, sob condições de alta acumulação de placa.

Pastilhas de própolis foram preparadas com extrato hidroalcoólico 35% e suas propriedades antimicrobianas avaliadas (WOISKY *et al.*⁵⁵, 1994). Observou-se a ação inibitória sobre bactérias Gram-positivas, enquanto as Gram-negativas demonstraram-se em geral resistentes.

Além das pastilhas, os géis e os enxaguatórios bucais são as formas farmacêuticas convencionais para a liberação de fármacos através da mucosa da cavidade oral. Por outro lado, essas formas convencionais possuem a desvantagem de proporcionar uma liberação inicial rápida do fármaco, seguida por uma rápida diminuição da concentração do mesmo. O tratamento tópico sucessivo de enfermidades orais é difícil, devido ao fluxo de saliva constante e a mobilidade dos tecidos envolvidos. As formulações mucoadesivas que podem controlar a liberação do fármaco podem resolver esses problemas (CESCHEL *et al.*¹⁶, 2002). Dessa maneira, sistemas terapêuticos biodegradáveis ou não podem promover a liberação controlada de fármacos no interior da bolsa periodontal, permanecendo por tempo pré-determinado, exercendo ação terapêutica (LANGER e PEPPAS³³, 1981; GABARRA²¹, 2002).

A utilização de técnicas como a microencapsulação pode transformar o extrato hidroalcoólico de própolis em uma forma farmacêutica sólida, eliminando solventes indesejáveis, promovendo o controle da liberação (BRUSCHI *et al.*^{12,13}, 2003) e permitindo a utilização do extrato de própolis em tais sistemas terapêuticos (BRUSCHI *et al.*^{12,13}, 2003), dentro da bolsa periodontal.

CONCLUSÃO

A própolis possui um amplo espectro de atividades biológicas, onde as atividades antiinflamatória e antimicrobiana podem ser de grande interesse na Periodontia. Vários estudos da utilização de própolis demonstram a sua atividade frente a microrganismos anaeróbios frequentemente associadas com periodontites destrutivas. Além disso, pode ser observada a viabilidade de se produzir e utilizar formas farmacêuticas contendo própolis para o tratamento de periodontites, como também para o impedimento da formação de placas e do desenvolvimento de gengivites.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

1. Abelhas. Disponível em: <revista.fapemig.br/9/propolis.html> Acesso em: 01 out. 2002.
2. ABREU, E. G. *et al.* Atividade anticáries de una crema dental con propóleos. *Rev Cubana Estomatol*, v. 37, n. 3, p. 166-170, 2000.
3. ABREU, E. G. *et al.* Estudio comparativo del efecto del cepillado con una crema dental con propóleos rojos y de un gel con clorofila. *Rev Cubana Estomatol*, v. 35, n. 3, p. 112-118, 1998.
4. AGA, H. *et al.* Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosc Biotech Biochem*, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.
5. AZEVEDO, R. V. P. *et al.* *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and perogiol. *Rev Microbiol*, v. 30, p. 335-341, 1999.
6. BAAKILINI, M. F.; LARA, E. H. G.; PANZERI, H. Adición de própolis em formulaciones de dentífricos. Evaluación de sus propiedades y estabilidad. *Rev Fola/Oral*, v.2, p.130-133, dez., n.6, 1996.
7. BANKOVA, V. *et al.* Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, v. 23, p. 79-85, 1992.
8. BANKOVA, V. *et al.* Volatile constituents of propolis. *Z Naturforsch*, v. 49, p. 6-10, 1994.

9. BANKOVA, V. S. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch*, v. 50, p. 1-6, 1995.
10. BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*, v. 15, p. 561-571, 2001.
11. BOSIO, K. *et al.* In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters Appl Microbiol*, v. 31, p. 174-177, 2000.
12. BRUSCHI, M. L. *et al.* Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *Int. J Pharm*, v. 264, p. 45-55, 2003.
13. BRUSCHI, M. L. *et al.* Development and characterization of microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique. In: II Reunião da Rede de Nanobiotecnologia. 2003, Campinas. *Anais...* Campinas: UNICAMP, 2003, p. 119 - 120.
14. BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem Toxicol*, v. 36, p. 347-363, 1998.
15. CARMO, L. H. A. *Desenvolvimento e avaliação de formulações para uso externo contendo extrato de própolis*. São Paulo, 1999. 154 f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
16. CESCHEL, G. C. *et al.* In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. *Fitoterapia*, v. 73, p. S44-S52, 2002.
17. DUARTE, C. A.; KFOURI, L. S. Ação da própolis sob forma de bochechos. *RGO*, v. 47, n. 2, p. 82-84, 1999.
18. FERNANDES JÚNIOR, A. *et al.* The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2001.
19. FERREIRA, F. B. de A. *Estudo in vitro do efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis e de outros medicamentos usados em endodontia sobre microrganismos anaeróbios*. Bauru, 1999. 150 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
20. FERREIRA, P. M. Periodontia e farmácia de manipulação: uma relação saudável. *Rev Racine*, n. 24, p. 30-32, dez./jan. 1995.
21. GABARRA, F. R. *Dispositivo mimetizador de bolsa periodontal para estudos in vitro de liberação de fármaco*. Ribeirão Preto, 2002. 197 p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
22. GEBARA, E. C. E. *Avaliação clínica e microbiológica do uso da própolis como coadjuvante no tratamento periodontal*. São Paulo, 1999. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
23. GEBARA, E. C. E. *et al.* Propolis extract as adjuvant to periodontal treatment. In: CONGRESSO DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, 3., 2001, São Paulo. , 2001.
24. GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, p. 59-80, 1979.
25. GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The composition and plants origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, v. 71, p. 107-118, 1990.
26. KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol*, v. 86, p. 69-73, 2003.
27. KÖNIG, B. Plant sources of propolis. *Bee World*, v. 66, p. 136-139, 1985.
28. KOO, H. *et al.* Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res*, v. 36, p. 445-448, 2002.
29. KOO, H. *et al.* Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res*, v. 34, p. 418-426, 2000.
30. KROL, W. *et al.* Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneim Forsch*, v. 43, n. 5, p. 607-609, 1993.
31. KUJUMGIEV, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, v. 64, p. 235-240, 1999.
32. KULEVANOVA, S.; STAFILOV, T.; DOREVSKI, K. Determination of some macroelements in propolis by atomic absorption spectrometry. *Acta Pharm*, v. 45, p. 45-52, 1995.
33. LANGER, R. S.; PEPPAS, N. A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, v. 2, n. 4, p. 201-214, 1981.
34. MACIEJEWICZ, W. *et al.* GC-MS identification of the flavonoid aglycones isolated from propolis. *Chromatographia*, v. 53, n. 5/6, p. 343-346, 2001.
35. MALASPINA, O. Colméia, empresa eficiente. *Ciênc Hoje*, v. 13, n. 73, p. 69-71, 1991.
36. MANARA, L. R. B. *et al.* Utilização da própolis em odontologia. *Rev FOB*, v. 7, n. 3/4, p. 15-20, jul./dez. 1999.
37. MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v. 26, p. 83-99, 1995.
38. MENEZES, H. *et al.* Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. *s: Apidologie*, v. 28, p. 71-76, 1997.
39. MOREIRA, T. F. Composição química do própolis: vitaminas e aminoácidos. *Rev Bras Farmacog*, v. 1, p. 12-19, 1986.
40. MORENO, M. I. N. *et al.* Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J Ethnopharmacol*, v. 68, p. 97-102, 1999.
41. MURRAY, M. C.; WORTHINGTON, H. V.; BLINKHORN, A. A study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. *J Clin Periodontol*, v. 24, n. 11, p. 796-798, 1997.
42. OTA, C. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, v. 44, p. 375-378, 2001.
43. PAMPLONA, B. Própolis: Composição e atividades terapêuticas. *Rev Racine*, v. 7, n. 37, p. 49-53, 1997.
44. PANZERI, H. *et al.* Um dentífrico experimental contendo própolis: avaliações físicas, microbiológicas e clínicas. *Rev ABO Nac*, v. 7, n. 1, p. 26-30, 1999.
45. PARK, Y. K. *et al.* Estudo da prepara-

- ção dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 18, n. 3, p. 313-318, ago./out. 1998.
46. PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S., AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova*, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.
47. SANTOS, V. R. Própolis: antibiótico natural alternativo em Odontologia? (Revisão de literatura). *Rev CROMG*, v.5, n.3, p.192-195, set./dez., 1999.
48. SANTOS, F. A. *et al.* Antibacterial activity of propolis produced in Brazil against *Actinobacillus actinomycetem-comitans*, *Fusobacterium* spp. and bacteria from *Bacteroides fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. *Anaerobe*, v. 5, p.479-481, 1999.
49. SANTOS, F. A. *et al.* Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. *Anaerobe*, v. 8, p. 9-15, 2002.
50. SANTOS, F.A. *et al.* Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol*, v.80, p.1-7, 2002.
51. SAWAYA, A. C. H. F. *et al.* Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters Appl Microbiol*, v. 35, p. 203-207, 2002.
52. SFORCIN, J.M. *et al.* Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and 53. *Candida tropicalis*. *J Venom Anim Toxins*, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2001.
53. TOSI, B. *et al.* Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother Res*, v. 10, p. 335-336, 1996.
54. VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis. - I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. *J Pharm Belg*, v.35, n.5, p. 253-259, 1979.
55. WOISKY, R. G.; GIESBRECHT, A. M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. *Rev Farm Bioquím Univ São Paulo*, v. 30, n. 1, p. 19-21, 1994.

APÊNDICE B – Trabalho 2

Drug Development and Industrial Pharmacy, 31:293–310, 2005
Copyright © 2005 Taylor & Francis Inc.
ISSN: 0363-9045 print / 1520-5762 online
DOI: 10.1081/DDC-200052073

Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems

Marcos Luciano Bruschi

Departamento de Farmácia e
Farmacologia, Universidade
Estadual de Maringá, Maringá,
PR, Brazil

and
Departamento de Ciências
Farmacêuticas, Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto, Universidade de
São Paulo, Ribeirão Preto,
São Paulo, Brazil

Oswaldo de Freitas

Departamento de Ciências
Farmacêuticas, Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto, Universidade de
São Paulo, Ribeirão Preto,
São Paulo, Brazil

ABSTRACT The oral mucosal cavity is a feasible, safe, and very attractive site for drug delivery with good acceptance by users. The mucosa is relatively permeable and robust, shows short recovery times after stress or damage, is tolerant to potential allergens, and has a rich blood supply. Moreover, oral mucosal drug delivery bypasses the first-pass effect and avoids presystemic elimination in the gastrointestinal tract. Bioadhesive systems provide intimate contact between a dosage form and the absorbing tissue, which may result in high concentration in a local area and hence high drug flux through the absorbing tissue. The efficacy of oral bioadhesive drug delivery systems is affected by the biological environment and the properties of the polymer and the drug. In the present paper, we review systematically some relevant citations regarding the environment, strategies for oral drug delivery and evaluation, and utilization of the main polymers.

KEYWORDS Bioadhesion, Oral mucosa, Oral cavity, Buccal, Drug delivery systems

INTRODUCTION

Among the various routes of drug delivery, the peroral one is perhaps the most preferred by patient and clinician alike. However, peroral administration of drugs has disadvantages, such as hepatic first-pass metabolism and enzymatic degradation within the gastrointestinal tract. These disadvantages may limit or prevent the oral administration of certain classes of drugs, especially peptides and proteins, except when they are inserted in colon-specific delivery systems (Shojaei, 1998). These limitations motivated the exploration of other mucosae as potential release and drug absorption sites. Transmucosal routes of drug delivery (e.g., the mucosal linings of the nasal, rectal, vaginal, ocular, and oral cavity) offer distinct advantages over peroral administration for systemic drug delivery. These advantages include possible bypass of first-pass effect and avoidance of presystemic elimination within the gastrointestinal tract (Chidambaram & Srivatsava, 1995; Gandhi & Robinson, 1994).

Many factors make the oral mucosal cavity a very attractive and feasible site for drug delivery (Varshosaz & Dehghan, 2002; Walker et al., 2002). The mucosa is relatively permeable with a rich blood supply, it is robust and shows

Address correspondence to: Oswaldo de Freitas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Zeferino Vaz, s/n, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil; Fax: 55-16-6024289; E-mail: ofreitas@fctf.usp.br

short recovery times after stress or damage, and the virtual lack of Langerhans cells makes it tolerant to potential allergens (Shojaei, 1998). Drug delivery across the buccal epithelium bypasses the first-pass effect, avoids presystemic metabolism in the gastrointestinal tract, and offers a safer method of drug utilization, since drug absorption can be promptly terminated in cases of toxicity by removing the dosage form from the buccal cavity (Wong et al., 1999a). The mouth is an accessible site for placement of devices (Needleman & Smales, 1995) and is well accepted by users.

OVERVIEW OF THE ORAL CAVITY

Structure

The oral cavity has a relatively small surface area (approximately 50 cm²) (Woodley, 2001). The oral mucosa is composed of stratified squamous epithelium, an outermost layer similar to that found in the rest of the body. It has a mitotically active basal cell layer, advancing through a number of differentiating intermediate layers to the superficial layers, where cells are shed from the surface of the epithelium (Gandhi & Robinson, 1988; Woodley, 2001). The turnover time for the buccal epithelium has been estimated at 5–6 days, a time probably representative of the oral mucosa as a whole (Harris & Robinson, 1992). The oral mucosal thickness varies depending on the site: the buccal mucosa measures at 500–800 µm, while the mucosal thickness of the hard and soft palates, the floor of the mouth, the ventral tongue, and the gingivae measure at about 100–200 µm (Shojaei, 1998).

The composition of the epithelium also varies depending on the site in the oral cavity. It may be keratinized, para-keratinized, or nonkeratinized (Chidambaram & Srivatsava, 1995). The mucosa of areas subject to mechanical stress (the gingivae and hard palate) is keratinized similar to the epidermis. The mucosa of the soft palate, the sublingual and buccal regions, however, is not keratinized (Harris & Robinson, 1992). The keratinized epithelia contain neutral lipids like ceramides and acylceramides, which have been associated with the barrier function. These epithelia are relatively impermeable to water. In contrast, nonkeratinized epithelia, such as the floor of the mouth and the buccal epithelium, do not contain

acylceramides and only have small amounts of ceramide. They also contain small amounts of neutral but polar lipids, mainly cholesterol sulphate and glucosyl ceramides. These epithelia have been found to be considerably more permeable to water than keratinized epithelia (Shojaei, 1998).

Various appendages are situated in or below the lamina-propria. These comprise teeth, the salivary gland ducts, and occasionally, sebaceous glands. These structures communicate with the outer environment and interrupt the otherwise intact surface, providing a route for substances unable to penetrate the epithelium proper, thus forming shunts or parallel diffusion pathways (Chidambaram & Srivatsava, 1995).

Permeability

The connective tissue of the oral mucosa limits the permeability of polar substances, although it may tend to permit the diffusion of nonpolar drug compounds. While a rapid absorption of drugs from the oral cavity has been ascribed to the rich vascular supply of the oral mucosa, it would appear that the blood supply, unless it is drastically reduced, is not normally a significant factor. The oral mucosa provides a protective covering for the underlying tissue, acting as a barrier against microorganisms and toxins (Chidambaram & Srivatsava, 1995).

The oral mucosa in general is a somewhat leaky epithelium intermediate between that of the epidermis and intestinal mucosa, whose estimated permeability is 4–4000 times greater than that of the skin. In general, the permeability of the oral mucosa decreases in the order of sublingual greater than buccal, and buccal greater than palatal (Shojaei, 1998).

It is currently believed that the permeability barrier in the oral mucosa is a result of intercellular material derived from the so-called “membrane coating granules” (MCG) (Gandhi & Robinson, 1994). In both keratinized and nonkeratinized epithelia, the limit of penetration coincides with the level, where the MCGs could be seen adjacent to the superficial plasma membranes of the epithelial cells. The components of the MCGs in keratinized and nonkeratinized epithelia are different. The MCGs of keratinized epithelium are composed of lamellar lipid stacks represented by sphingomyelin, glucosylceramides, ceramides, and other nonpolar lipids. On the other hand, the

nonkeratinized epithelium contains MCGs that are nonlamellar; the major MCG lipid components are cholesterol esters, cholesterol, and glycosphingolipids. In addition to the MCGs, the basement membrane may present some resistance to permeation as well; however, the outer epithelium is still considered to be the rate-limiting structure in mucosal penetration. The structure of the basement membrane is not dense enough to exclude even relatively large molecules, but it may limit the passage of certain particles such as immune complexes (Shojaei, 1998).

The intercellular route through oral epithelium is essentially an aqueous channel, especially in the deeper cell layers. The oral mucosa shares with the gut the ability to maintain a moist surface, one of the characteristics of any mucous membrane. As far as permeability is concerned, this is both a strength and weakness because, while saliva components may contribute to barrier function, the accompanying hydration may increase permeability. Substances can cross cells by endocytosis, by active transport, and by diffusion through the intercellular spaces. In endocytosis, a large number of different cell types are capable of taking up solid particles (phagocytosis) or fluids (pinocytosis) from the outer environment by engulfing the material in membranous vesicles. The processes, referred to in general as endocytosis, affords a means of transporting materials across the cell membrane or transferring material across the whole cell. Cells of the oral epithelium are capable of taking up materials by endocytosis, particularly in the basal and prickly layers (Chidambaram & Srivatsava, 1995).

Environment

The cells of the oral epithelia are surrounded by an intercellular ground substance, mucus, the main components of which are complexes made up of proteins and carbohydrates. These complexes may be loose or some may be attached to certain regions on the cell surfaces. This matrix may actually play a role in cell-cell adhesion, also acting as a lubricant, allowing cells to move relative to one another. Similarly, mucus generally plays a critical role in the bioadhesion of mucoadhesive drug delivery systems (Ahuja et al., 1997). In stratified squamous epithelia found elsewhere in the body, mucus is synthesized by specialized mucus-secreting cells like goblet cells,

whereas in the oral mucosae, mucus is secreted by the major and minor salivary glands as part of saliva. Up to 70% of the total mucin found in saliva is contributed by the minor salivary glands (Shojaei, 1998). At physiological pH, the mucus network carries a negative charge (due to the sialic acid and sulphate residues), which plays a role in mucoadhesion. At this pH, mucus can form a strongly cohesive gel structure that will bind to the epithelial cell surface as a gelatinous layer (Gandhi & Robinson, 1988).

Another feature of the environment of the oral cavity is the presence of saliva produced by the salivary glands. Saliva is the protective fluid for all tissues of the oral cavity. It protects the soft tissues from abrasion by rough materials and from chemicals. It allows for the continuous mineralization of the tooth enamel after eruption and contributes to remineralization of the enamel in the early stages of dental caries (Edgar, 1992; Jones et al., 2000). Saliva is an aqueous fluid with 1% organic and inorganic materials. The major determinant of the salivary composition is the flow rate, which in turn depends upon three factors: the time of day, the type of stimulus, and the degree of stimulation (Edgar, 1992). The salivary pH ranges from 5.5 to 7 depending on the flow rate. At high flow rates, the sodium and bicarbonate concentrations increase, leading to an increase in the pH. The daily salivary volume is between 0.5 to 2 liters and it is this amount of fluid that is available to hydrate oral mucosal dosage forms. A main reason behind the selection of hydrophilic polymeric matrices as vehicles for oral drug delivery systems is this water-rich environment of the oral cavity (Shojaei, 1998).

Additionally, proteolytic activities of endo- and exopeptidases (aminopeptidases and carboxypeptidases) have been identified in buccal tissue homogenates (Walker et al., 2002). A number of peptide drugs have been shown to be degraded in buccal tissue homogenates including enkephalin analogues (Kashi & Lee, 1986), calcitonin (Nakada et al., 1987), insulin, proinsulin (Yamamoto et al., 1990), substance P (Lee & Yamamoto, 1990), and thyrotropin releasing hormone (Dowty et al., 1992). However, as the peptidase activity of cytosol and the membrane cannot be resolved in tissue homogenates, the relevance of these activities during peptide buccal transport is uncertain (Walker et al., 2002). Particularly, it is believed that peptides are transported between the epithelial cells and therefore,

the cytosolic peptidase activity may not be in contact with the peptide during its transport (Rathbone & Tucker, 1993).

Recent studies have contributed to differentiate the cytosolic enzymes of those present in the membrane. The activity of aminopeptidases, using Leu-enkephalin as substrate, was observed on the surface of the intact buccal mucosa excised from pig (Walker et al., 2002). These authors also demonstrated that the insulin and insulin B-chain were not hydrolyzed. Aminopeptidases can only act on insulin B-chain after the initial cleavage by an endopeptidase (Song et al., 1986), while the insulin is not a substrate for aminopeptidases (Stephenson & Kenny, 1988). These results support the hypothesis of the aminopeptidases presence and absence of endopeptidases and carboxypeptidases on the surface of the intact buccal mucosa. The insulin stability in contact with the intact buccal mucosa (Walker et al., 2002), its fast hydrolysis in contact with buccal tissue homogenate, without a serine protease inhibitor aprotinin (Yamamoto et al., 1990), and the fact that the *in vivo* coadministration of the enzyme inhibitor aprotinin with insulin did not improve the bioavailability of insulin across the rat buccal mucosa (Aungst & Rogers, 1988), suggest that the insulin hydrolytic activity, observed on the tissue homogenate, was owed to the cytosolic enzymatic activity.

The possibility of peptides absorption through the intercellular route, the absence of endopeptidases and carboxypeptidases activity in the buccal mucosa surface, and the possibility of use of specific enzymatic inhibitors, pleads in favor of the oral cavity as a promising site for the administration of specific drugs. However, a substantial sum of research is still necessary to demonstrate the rate and the extension of the degradation and of the absorption of each candidate drug to be administrated in this site.

Oral Mucosal Routes of Drug Absorption

The cellular structure of the oral mucosa suggests that there are two permeability barriers (Zhang & Robinson, 1996). Since the intercellular spaces and cytoplasm are hydrophilic in character, lipophilic compounds would have low solubility in this environment. On the other hand, the cell membrane is rather lipophilic in nature and hydrophilic solutes will have difficulty permeating the cell membrane due to a

low partition coefficient. Therefore, the intercellular spaces act as the major barrier to permeation of lipophilic compounds and the cell membrane acts as the major transport barrier for hydrophilic compounds. Considering the coexistence of the hydrophilic and lipophilic regions in the oral mucosa, drug transport may involve a combination of the paracellular and the transcellular routes. All compounds can use these two routes simultaneously, except that one route is usually preferred over the other depending on the physicochemical properties of the diffusant.

ORAL MUCOSA AS A SITE FOR DRUG DELIVERY

Within the oral mucosal cavity, drug delivery is classified into three categories: 1) sublingual delivery, which is systemic delivery of drugs through the mucosal membranes lining the floor of the mouth, 2) buccal delivery, which is drug administration through the mucosal membranes lining the cheeks (buccal mucosa), and 3) local delivery, which is drug delivery into the oral cavity (Shojaei, 1998).

The selection of one category over another is mainly based on anatomical and permeability differences that exist among the various oral mucosal sites. The sublingual mucosa is relatively permeable, giving rapid absorption and acceptable bioavailability of many drugs, and is convenient, accessible, and generally well accepted. The buccal mucosa is considerably less permeable than the sublingual area, and is generally not able to provide the rapid absorption and good bioavailability seen with sublingual administration (Harris & Robinson, 1992).

Local delivery to tissues of the oral cavity has a number of applications, including the treatment of toothaches, bacterial and fungal infections, aphthae and dental stomatitis, and the facilitation of tooth movement with the use of prostaglandins (Bottenberg et al., 2000; Jones et al., 2000; Needleman & Smales, 1995; Repka et al., 2003; Shojaei, 1998; Vivien-Castioni et al., 2000).

Moreover, there is intra-periodontal pocket drug delivery, which is a special category of local delivery where the drug delivery happens in a specific site, within the periodontal pocket (Medlicott et al., 1994), being generally used for treatment of periodontitis (Soskolone & Freidman, 1996). Periodontitis is an

M. L. Bruschi and O. de Freitas

296

inflammatory and infectious disease resulting in the destruction of the supporting structures of the teeth (the periodontal ligament and the alveolar bone). It results in the formation of pockets between the soft tissue of the gingiva (gum) and the tooth, and can eventually cause tooth loss (Jones et al., 2000). Currently, the treatment of periodontal disease, aimed at arresting the progression of the destructive process and preventing recurrence after treatment, is mainly through mechanical cleaning of the tooth surface to remove bacterial plaque and calculus. The potential side effects of the administration of systemic antibiotics and the inability of antiseptic mouthwashes to penetrate the periodontal pocket have fueled interest in the sustained delivery of therapeutic agents within the periodontal pocket, thus ensuring a high, effective concentration of the antimicrobial agent at the site of infection. Consequently, studies on the release of antimicrobial agents, e.g., chlorhexidine, tetracycline, or metronidazole, from several polymeric systems, and the evaluation of their clinical effects have been reported. It has been suggested that mucosa adhesive polymers might be useful for periodontal pocket therapy (Newman, 1992). These problems may be primarily overcome by antimicrobial-containing formulations that are easily introduced into the periodontal pocket (Soskolone & Freidman, 1996).

Intra-periodontal pocket drug delivery systems can be bioadhesives, which interact with the mucin-coated epithelial and tooth surfaces by means of mucoadhesion, and/or produce a sustained effect by virtue of being viscous, ensuring the formulation retention within the pocket (Jones et al., 2000; Medicott et al., 1994).

STRATEGIES FOR ORAL MUCOSAL DRUG DELIVERY

Novel oral dosage forms consist mainly of sustained release systems for oral mucosal delivery intended to release the drug within a defined period of time. The different formulations for sustained oral release can be grouped into two categories: 1) adhesive systems and 2) chewing gums (Chidambaram & Srivatsava, 1995). An adhesive system provides intimate contact between a dosage form and the absorbing tissue, which may result in high concentration in a local area and hence, high drug flux through the absorbing tissue (Ahuja

et al., 1997; Guo & Cooklock, 1996). The desirable attributes of an oral adhesive system for prolonged systemic delivery are a high drug loading capacity, good mucoadhesion, nonirritancy, good feel in the mouth, tastelessness, and sustained drug delivery. An erodible formulation has the added advantage of not requiring retrieval after delivery of the dose (Martin et al., 2003). In recent years, adhesive mucosal dosage forms were suggested for oral delivery, including adhesive solid drug delivery systems (tablets and patches) and adhesive semisolid drug delivery systems.

Adhesive Tablets

In order to improve the bioavailability of administered drug in the oral cavity, several bioadhesive tablet systems have been developed in recent years (Beyssac et al., 1998; Bouckaert et al., 1993a). Adhesive buccal tablets can be applied to different sites in the oral cavity, i.e., the palate, mucosa of the cheek, and between the upper lip and gum. The tablet softens and adheres to the substrate and is retained in position until dissolution and/or release is complete. After a short time the presence of tablet is reported to be no longer noticeable to the patient. The tablet should not be moved about the mouth once in position, since this causes more rapid drug release. The position of successive tablets can be alternated on either side of the mouth. Patients wearing dentures may place the tablet in any comfortable position between the lip and gum (Chidambaram & Srivatsava, 1995).

The location of the tablet in the mouth appears to have a great impact on the tolerance and the retention time. Depending on the location, either palatal or gingival, retention times varied from 4–6 h to 7–12 h, respectively (Vivien-Castioni et al., 2000).

Usually, it is important that excipients of buccal tablets do not cause or stimulate salivation, since in this case a larger fraction of drug may be swallowed rather than becoming bioavailable or being absorbed.

Some systems have been developed and are already available on the market, such as Nicorette® (nicotine), Suscard® (glyceryl trinitrate), and Striant® (testosterone), while others are still in the development phase. The separate or associated polymers in these systems, as well as the drugs and processes used, are summarized in the Table 1.

At present, much effort is focused on the problems of absorption of high molecular weight compounds

Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems

TABLE 1 Materials and Techniques Utilized to Prepare Buccal Bioadhesive Tablets

Materials	Drug	Reference(s)
Thermally modified maize starch, carbopol 934, sodium benzoate, silicium dioxide ^a	Miconazole	Bouckaert et al., 1993a
Polyacrylic acid, thermally modified maize starch, sodium benzoate, silicium dioxide ^a	Miconazole	Bouckaert et al., 1993b
Drum-dried wax maize, carbopol 974P, sodium stearyl fumarate ^a	Testosterone	Voorspoels et al., 1996
Hydroxypropyl methylcellulose, stearic acid, silica gel, lactose anhydrous ^a	Glyceryl trinitrate	Walton & Rutland, 1998
Hydroxypropyl methylcellulose, carbopol 934, and magnesium stearate ^a	Fluoride	Garcia et al., 1998
2-hydroxymetacrylate, methylmetacrylate, and poly(methylmetacrylate) ^b	Fluoride	Lara et al., 1998
Polyoxyethylene, polyisobutylene, and polyethyleneglycol ^a	Vitamin B ₁₂	Tiwari et al., 1999a
Carbopol 974P, hydroxypropyl methylcellulose, sodium lauryl sulphate, magnesium stearate ^a	Pentazocine	Agarwal & Mishra, 1999
Hakea gum ^a	Chlorpheniramine/calcitonine	Alur et al., 1999a, 1999b
Sodium alginate, hydroxypropyl methylcellulose, carbopol 934P, and polycarbophil ^a	Omeprazole	Choi & Kim, 2000
Sodium alginate, hydroxypropyl methylcellulose, magnesium oxide and sodium croscarmellose ^a	Omeprazole	Choi et al., 2000
Pectin and hydroxypropyl methylcellulose ^c	Diltiazem	Miyazaki et al., 2000
β-cyclodextrin, Methocel, and polycarbophil ^a	Danazole	Jain et al., 2002
Carbopol 934P, Methocel, mannitol, and magnesium stearate ^a	Diltiazem hydrochloride	Singh & Ahuja, 2002
Hydroxypropyl methylcellulose, sodium carboxymethyl cellulose, magnesium stearate, and mannitol ^a	Cetylpyridinium chloride	Ali et al., 2002
Hydroxypropylcellulose, carbopol 934, mannitol, lactose, polyvinylpyrrolidone, and magnesium stearate ^a	Nicotine	Park & Munday, 2002
Starch-g-poly(acrylic acid) copolymers and starch/poly(acrylic acid) mixtures ^a	Testosterone	Ameye et al., 2002
Carbopol and hydroxypropylcellulose ^a	Ergotamine	Tsutsumi et al., 2002
Carboxymethyl cellulose, carbomer, polyvinylpyrrolidone, polyvinyl alcohol, hydroxypropyl methylcellulose, and acacia ^a	Nifedipine	Varshosaz & Dehghan, 2002
Polycarbophil-cysteine conjugates ^a	Leu-enkephalin	Langoth et al., 2003

^aDirect compression.^bThermal molding.^cMolding.

such as peptide and proteins, mainly because their oral bioavailability is poor. Oxytocin, chymotrypsin, and insulin are some of the drugs administered by the buccal route (Langoth et al., 2003). However, a substantial sum of efforts is still necessary to improve the rate and extent of absorption of these molecules across the buccal mucosa. The utilization of permeability enhancers and their impact on the physiology of the oral cavity also need to be investigated.

It is important to point out the possible problems that children and elderly individuals may experience with the use of adhesive tablets. Among the potential problems is the possible discomfort provoked by the material applied to the mucosa and the possibility of the dosage form separating from the mucosa, being swallowed, and then adhering to the wall of the esophagus.

Adhesive Patches

Bioadhesive patches are systems that may range from simple erodible and nonerodible adhesive films to more sophisticated systems, which can be designed to provide either unidirectional or multidirectional release of the drug (DeGrande et al., 1996; Guo & Cremer, 1999; Peh & Wong, 1999). The oral cavity mucosa is an ideal surface for the placement of retentive delivery systems such as patches, since it contains a large expanse of smooth and immobile tissue (Harris & Robinson, 1992). Mucoadhesive patches for administration to the mucosa of the oral cavity may have a number of different designs, depending on various considerations, such as the therapeutic aim and the physicochemical and pharmacokinetic properties of the active ingredient. Regarding the therapeutic aim, two different rationales for developing mucosal patches may be considered: patches can be intended to deliver a drug to the systemic circulation in a way that is superior to other routes of administration, or their purpose may be local therapy of the oral mucosa. As alternatives for both classes of patches, more conventional dosage forms are available. In the case of locally acting patches, the alternatives most often used today are oral gels, oral liquids, and lozenges. For systemic action, there are a number of dosage forms, including sustained- or controlled-release oral technologies, transdermal patches, and injectable depot formulations. It is necessary for a successful mucosal

patch to have clearly defined advantages over alternative products. Oral mucosal patches can be applied directly to the affected mucosal region and have the potential to supply the site of action with effective drug levels and to sustain these levels over a prolonged period of time. In contrast, conventional therapy exposes the affected tissues to the dose for a very short period of time (Guo & Cremer, 1999).

Thus, the first step in the development of a patch is the selection and characterization of a polymer with appropriate bioadhesive properties and drug release control or of combined polymers in order to obtain both of these properties (Guo, 1994; Li et al., 1998).

To the more sophisticated patches, which are usually composed by several materials, the formulation constituents are homogeneously mixed and compressed to a predetermined thickness, and appropriate sizes are cut or punched out. As with transdermal patch formulation, an impermeable backing layer should be considered for oral patches to prevent drug loss and for convenient application by the patient. Multilayer systems can be prepared by recompressing two superimposed patches. They can be spray-coated by air-spray units that can contain individual different backing materials (Guo & Cooklock, 1996). The main polymers and drugs used to prepare these kinds of patches are listed in Table 2.

A suitable oral bioadhesive drug delivery system should be flexible, elastic, soft, adequately strong to withstand breakage due to stress from mouth activities, and possess good bioadhesive properties, so that it can be retained in the oral cavity for the desired duration. Patches should be able to meet these requirements and swell to a certain extent when placed in aqueous medium (Peh & Wong, 1999; Wong et al., 1999b). They also ensure more accurate dosing of the drug compared to gels and ointments (Nafee et al., 2003).

The more sophisticated patches are not suitable for delivery of antimicrobial agents directly into the periodontal pocket. The use of nonbiodegradable polymers, the necessity of system removal at the end of therapy, the low flexibility and elasticity, potential immunological reactions, tissue sensitization, and difficult application to the periodontal pocket limit this application (Jones et al., 1996; Wong et al., 1999a). Thus, the use of polymeric films for oral mucosal drug delivery has been investigated (Kohda et al., 1997), although they have been more extensively

TABLE 2 Materials and Drugs Used to Prepare Oral Bioadhesive Patches

Materials	Drug	Reference
Polyurethane	Lignocaine	Brook et al., 1989
Hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, polyvinyl pyrrolidone, polyvinyl alcohol	–	Chidambaram & Srivatsava, 1995
Polyisobutylene, polyisoprene, Carbopol 974P	Buprenorphine	Guo, 1994
Silicone polymers	Peptides	Li et al., 1998
Hydroxypropyl methylcellulose, sodium carboxymethyl cellulose, and Carbopol	Metoprolol tartrate	Wong et al., 1999b
Sodium carboxymethyl cellulose, chitosan, polyvinyl alcohol, hydroxyethyl cellulose, and hydroxypropyl methylcellulose	Miconazole nitrate	Nafee et al., 2003
Polycarbophil, Eudragit S-100, and pharmaceutical wax	Plasmid DNA (CMV- β -gal) or β -galactosidase protein	Cui & Mumper, 2002a
Polycarbophil, Eudragit S-100, and pharmaceutical wax	Synthetic salmon calcitonin	Cui & Mumper, 2002b

employed in pharmaceutical tablet coating formulations to improve appearance, to mask undesirable taste, and to control drug release (Peh & Wong, 1999). Oral bioadhesive films may be preferred over other patches or adhesive tablets in terms of flexibility, comfort, and easy application to the periodontal pocket. In addition, they can circumvent the relatively short residence time of oral gels on the mucosa, which is easily washed away and removed by saliva (Anders & Merkle, 1989; Collins & Deasy, 1990). Moreover, a polymeric adhesive film is able to protect the wound surface, thus reducing pain and treating the oral disease more effectively (Peh & Wong, 1999).

The major method of polymeric film manufacture is the solvent evaporation process, in which the polymeric material, with or without plasticizer, is dissolved in a solvent or solvent mixture and into which the active constituent is dissolved or dispersed. This solution is then cast onto a suitable substrate and the solvent is allowed to evaporate, leaving a solid polymeric film containing the drug (Jones & Medlicott, 1995). However, other techniques have also been used (Repka et al., 2004). Hot-melt extrusion technology has been proposed as a promising technique for films, resulting in shorter and more efficient processing times to a final product, environmental advantages due to elimination of solvents in processing, and increased efficiency of drug delivery to the

patient (McGinity et al., 2001; Repka & McGinity, 2000a, 2000b, 2001a, 2001b; Repka et al., 1999). It was demonstrated that this technology is viable to prepare mucoadhesive matrix films intended for oral cavity clotrimazole delivery for the prophylaxis and treatment of oral candidiasis (Repka et al., 2003).

Besides the ideal characteristics for a suitable oral bioadhesive drug delivery system, an ideal oral film can present swelling. Film swelling, if present, should not be too extensive in order to prevent discomfort. Thus, the mechanical, bioadhesive, and swelling properties of film are critical and their evaluation is essential (Peh & Wong, 1999).

The suitability of films containing sodium carboxymethyl cellulose/polyethylene glycol 400/Carbopol 934P and hydroxypropyl methylcellulose/polyethylene glycol 400/Carbopol 934P was investigated. It was observed that the increase in Carbopol 934P content elevated the elasticity, softness, and bioadhesive strength, but decreased the strength and degree of swelling of both films. Correlation existed between the in vivo and in vitro bioadhesion data within the polymer, but no rank correlation was observed between the two polymers. Thus, films prepared with hydroxypropyl methylcellulose/polyethylene glycol 400/Carbopol 934P may be preferred over sodium carboxymethyl cellulose/polyethylene glycol 400/Carbopol 934P films as a drug vehicle for buccal delivery,

since the former were tougher, more elastic, more bioadhesive *in vivo*, and swelled in a more tolerable manner in the oral cavity than the latter (Peh & Wong, 1999).

Copolymers of acrylic acid and 2-ethylhexyl acrylate for buccal administration were designed, synthesized, and tested. It was observed that incorporation of 2-ethylhexyl acrylate improved the mucoadhesive performance of poly(acrylic acid). The copolymer consisting of a 1:1 mole ratio of the repeat units afforded the most favorable mucoadhesive profile. Of the two factors of contact time and cross-sectional area, the latter was found to have a more pronounced effect on mucoadhesive strength. In order to investigate the possibility of achieving buccal delivery of acyclovir, poly(acrylic acid) sodium salt (PAA) was used to prepare films with chitosan hydrochloride (HCS). The addition of PAA to HCS produced a reduction in the drug release profile. The film based on a 1/1.3 HCS/PAA weight ratio, besides possessing the best properties of resilience on the mucosa, was also characterized by the highest permeation profile and, therefore, represents a promising formulation for buccal delivery of acyclovir (Shojaei et al., 2000). Moreover, a gelatin film with strongly bioadhesive force was developed by introducing free dandling aldehyde groups from glutaraldehyde cross-linking (Matsuda et al., 1999).

Adhesive buccal films were developed in order to improve the drug bioavailability. Two dosage forms, a bioadhesive disc and a fast dissolving disc for buccal and sublingual administration of thiocolchicoside, respectively, were designed. The fast-dissolving (sublingual) form resulted in a quick uptake of 0.5 mg of thiocolchicoside within 15 min, whereas with the adhesive buccal form the same dose can be absorbed over an extended period of time (Artusi et al., 2003).

Attention has been focused on the local drug delivery system as a means to ensure the efficacy of locally administered antibiotics in periodontal therapy. This delivery system is produced by immobilizing antibiotic and antimicrobial agents with a carrier substance to provide controlled local release (Minabe et al., 1989). Cast films of ethylcellulose, with or without polyethylene glycol containing 5%, 10%, and 20% chlorhexidine diacetate, were developed for insertion into periodontal pockets for periodontal disease. The systems exhibited sustained release of the

drug for several months (Friedman & Golomb, 1982). The release of chlorhexidine from ethylcellulose films cast from solvents of different dichloromethane/ethanol compositions was also studied (Jones & Medlicott, 1995). They observed that release rate was proportional to the square root of time. Increased ethanol content within the casting solvent significantly enhanced the rate of release. Release rate and cumulative mass released at different time intervals (5, 10, 15, and 25 days) were proportional to the solubility of the casting solvent. A degradable sustained-release device composed of a cross-linked protein containing chlorhexidine as the therapeutic agent was developed as a new dental drug delivery system to be used as an adjunct in the treatment of periodontal diseases (Steinberg et al., 1990). The results of the assessment of tetracycline systems immobilized on atelocollagen have suggested that, when topically administered, these systems remain both clinically and bacteriologically effective for 2 to 3 weeks (Minabe et al., 1989).

The use of buccal films for oral mucosal drug delivery of vaccines has been reported. The oral buccal mucosa may be an ideal site for mucosal immunization, allowing for the needle-free administration of cost-effective vaccines (Cui & Mumper, 2002a). Bilayer films were developed using polycarbophil and Eudragit S-100 as the mucoadhesive layer and a pharmaceutical wax as the impermeable backing layer. They were post-loaded with plasmid DNA (CMV- β -gal) or β -galactosidase protein. The weight ratio of polycarbophil and Eudragit S-100 had a significant effect on adhesion time of films. Post-loaded plasmid DNA and β -galactosidase protein remained stable after released from films. The feasibility of buccal (genetic) immunization with these novel bilayer films was demonstrated. These same mucoadhesive bilayer films were also used as an alternative and more cost-effective dosage form for delivery of calcitonin, resulting in the delivery of therapeutically efficacious amounts of calcitonin across the buccal mucosa in rabbits (Cui & Mumper, 2002b).

Today, buccal patches intended to deliver drug systemically have clearly received more attention from the scientific community than the patches used for local delivery of drug. Thus, bioadhesive patch formulations are certainly promising alternatives for drug delivery systems (Guo & Cremer, 1999; Nafee et al., 2003).

Adhesive Semi-solid Systems

Adhesive semi-solid systems based on hydrogels are an attractive dosage form. They may be used to deliver the drug via buccal mucosa or intra-periodontal pocket with the possibility of prolonging residence time and improving bioavailability (Chidambaram & Srivatsava, 1995; Jones et al., 1996). Hydrogels are formed from polymers and may be hydrated in an aqueous environment without dissolution, acting as drug delivery systems by physically entrapping molecules, which are then slowly released by diffusion or erosion after gel hydration (Martin et al., 2003). Semi-solid systems have the advantage of being deliverable with a syringe, with a consequent easy placement in periodontal pockets (Needleman, 1991) and easy dispersion throughout the mucosa of oral cavity.

The main drawback of many drug delivery systems, especially semi-solid ones designed for use in the oral cavity, is poor retention at the site of application when the hydrogel polymer has no adhesive properties. This drawback may be minimized or eliminated by the incorporation of a bioadhesive polymer into the formulation (Jones et al., 1996). Moreover, the formulation retention time at the site of application is related to bioadhesive efficacy, and the rate and extent of release depend on the physico-chemical characteristics of the drug and the dosage form. Thus, the release properties can be controlled by qualitative and/or quantitative manipulation of the drug components.

There is a variety of materials that have been used in semi-solid drug delivery systems development. Systems based on hydroxyethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone and polycarbophil (as an adhesive polymer), and tetracycline (model drug), have been produced with various proportions of hydroxyethyl cellulose and polyvinylpyrrolidone, according to a factorial design. Increased concentrations of hydroxyethyl cellulose decreased the rate of release of tetracycline due to the increased viscosity and the decreased rate of diffusion. Conversely, an increased polyvinylpyrrolidone concentration increased tetracycline release rates due to an increased formulation porosity following dissolution of this polymer. Increased concentrations of hydroxyethyl cellulose and polyvinylpyrrolidone increased the hardness (force required to attain a given deformation), compressibil-

ity, and syringeability due to increased product viscosity and to parameters related to bioadhesion, illustrating the adhesive nature of polymers, and enhanced the semi-solid nature of the product, resulting in decreased product elasticity and cohesiveness. The interactions between the polymers were statistically significant when observed within the factorial design with respect to rate of release and all mechanical properties. These interactions arose because of variations in the physical states (dissolved or dispersed) of polymeric formulation components. All formulations demonstrated slow release and zero order kinetics for a period between 24 and 54 hours, with specific release between 1.59 and 15.80 mg/h (Jones et al., 1996). Similar formulations containing flubiprofen or tetracycline hydrochloride were studied in humans and demonstrated good clinical efficacy (Jones et al., 1999, 2000).

Also, for the treatment of periodontal diseases, the effect of subgingival irrigation with a 1% chlorhexidine collagen gel in periodontal pockets as an adjuvant procedure to scaling and root planing has been evaluated. It was concluded that 1% chlorhexidine collagen gel is a promising adjuvant to scaling and root planning in the treatment of adult periodontitis. There was an improvement in clinical parameters in all tested groups with a significantly greater decrease in gingival recession and bleeding in the chlorhexidine group (Vinholis et al., 2001).

Moreover, in dentistry and oral medicine, there are various applications of chitosan, an agent with bioadhesive, biocompatibility, biodegradability, and antimicrobial properties. The release of drugs from chitosan may be modulated by its exclusive use or by its use in combination with polymers of different molecular weight and with different degrees of acetylation. Formulations (gel and film) containing chitosan (1.0% or 2.0%) and chlorhexidine (0.1% or 0.2%) were prepared and their properties were studied. The flow property of the gels was found to be suitable for topical application to the oral mucosa and for injection into the periodontal pocket with a syringe. Both the film and gel formulations exert bioadhesive properties and are not affected by incorporation of chlorhexidine. In vitro release of chlorhexidine from gels and films were maintained for 3 hours and no lag-time in release was observed. The highest antifungal activity was obtained with 2% chitosan, gel and film

form, against the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. The combination of chitosan with chlorhexidine showed a higher activity when compared to that of chlorhexidine alone. This would permit the application of chlorhexidine at lower concentrations, thus preventing its unwanted side effects. Chitosan films and gels, with their bioadhesive property and antimicrobial activity, seem to be promising delivery systems for the local treatment of periodontal diseases (Ikinci et al., 2002).

In animal models, bioadhesive gels have been shown to enhance the bioavailability of drugs by buccal administration. The bioavailability of drugs by buccal administration can be improved by the incorporation of permeability enhancers into the formulation. It was demonstrated in animals (rabbits) that gels containing sodium deoxycholate increase by 1.59 times the relative bioavailability of the triamcinolone acetonide (2.0 mg), similar to the absolute bioavailability of 1 mg (intravenous administration), showing relatively constant sustained blood concentration with minimal fluctuations (Shin et al., 2000). Chitosan gel bases have been investigated in order to transmit and to increase the penetration of large molecules, especially bioactive peptides. Chitosan gel was found to exert the marked permeabilizing effect on growth factor- β (TGF- β) in porcine oral mucosa when appraised by horizontal sectioning localization.

The delivery of hydrophobic drugs is usually obtained using hydrogels from polymer mixtures. Martin et al. (2003) evaluated a physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogel, with different hydrophobicities, in a controlled-release system for the delivery of denbufylline, with and without glycodeoxycholate as a permeability enhancer. Denbufylline reduced the porosity, erosion, and hydration of the gels while glycodeoxycholate increased the hydration and erosion.

EVALUATION STRATEGIES

Satisfactory bioadhesion is essential for the successful application of a bioadhesive drug delivery system in the oral cavity. The main feature of bioadhesion is the strength of attachment of the dosage form to the biological tissue (Wong et al., 1999b). Several test methods have been reported in the literature for studying buccal bioadhesion (Bouckaert et al., 1993a).

These tests are necessary to screen a large number of candidate mucoadhesives and to study their mechanisms. These tests are also important during the design and development of a controlled-release oral bioadhesive system, since they ensure compatibility, physical and mechanical stability, surface analysis, and bioadhesive bond strength. A good review about the methods used to study bioadhesion was presented by Ahuja et al. (1997), who classified the test methods into two major categories, i.e., in vitro/ex vivo methods and in vivo methods.

The in vitro/ex vivo methods based on measurement of tensile strength (force required to break the adhesive bond between a model membrane and the test polymers) use a model membrane (substrate) that is a tissue-model obtained from gastrointestinal mucosa (esophagus, stomach, intestine, etc.), sublingual mucosa, buccal mucosa, gingival, or peritoneal membranes of animals (mouse, pig, rabbit, bullock, rats, hamster, or guinea pig). If the duration of bonding of the bioadhesive system to substrate is to be investigated over significantly long periods, then attempts must be made to maintain the morphology and integrity of the tissue-model. Deterioration of the mucosa could result in adhesive behavior different from the in vivo application. Organ culture techniques allow complete tissues to be maintained for long periods of time and might provide a suitable means for the study of duration (Needleman & Smales, 1995). The results of the studies provided important information regarding the effects of charge density, hydrophobicity, and experimental conditions such as pH, ionic strength, mucolytic agents, and applied pressure on bioadhesion. The instruments usually employed to measure tensile strength are modified scales, tensiometers, or tensile testers. In the last 5 years, these methods have been extensively used and refined (Table 3).

Another in vitro/ex vivo method described is based on measurement of shear strength (Ahuja et al., 1997). Shear stress measures the force that causes the bioadhesive to slide with respect to the mucus layer in a direction parallel to their plane of contact. The method uses a glass plate suspended from a microbalance that is dipped in a temperature-controlled mucus sample. The force required to pull the plate out of the solution is determined under constant experimental conditions. Over the last few years, the bioadhesion of

TABLE 3 The Newest Bioadhesion Measurements in Tensile Strength Investigations

Bioadhesive	Substrate	Instrument	Reference(s)
Silicone polymers, CP 974P	Rabbit buccal mucosa	Tensile apparatus (Instron, U. K.)	Li et al., 1998
Hakea gum, bicarbonate, tartaric acid	Rabbit intestinal mucosa	LTC universal tension-compression stand equipped with model DFM-10 digital force gauge (Chatillon, NC)	Alur et al., 1999a, 1999b
P(AA-co-EHA)	Porcine buccal mucosa	Tensile apparatus (Instron, Canton, MA, USA)	Shojaei et al., 2000
Sodium alginate, HPMC Polycarbophil, HPMC	Hamster cheek pouch Cellulose acetate membrane impregnated with porcine mucin solution (5%)	Modified balance Tensile tester (Chatillon, Greensboro, NC)	Choi & Kim, 2000 Jain et al., 2002
CPC, NaCMC, HPMC CP 934P, HPMC CMC, CP, PVP, PVA, HPMC, acacia Polycarbophil-cysteine conjugate	Bovine cheek pouch Porcine buccal mucosa 1% mucus sample or sodium alginate gel Porcine intestinal mucosa	Modified pan balance Modified pan balance Modified tensiometer Modified balance	Ali et al., 2002 Singh & Ahuja, 2002 Varshosaz & Dehghan, 2002 Langoth et al., 2003

Note: CP=Carbopol; CPC=Cetylpyridinium chloride; HPMC=Hydroxypropyl methylcellulose; P(AA-co-EHA) copolymers of acrylic acid and 2-ethylhexyl acrylate; PVA=Polyvinyl alcohol; PVP=Polyvinylpyrrolidone; NaCMC=Sodium carboxymethyl cellulose.

gelatin films cross-linked with glutaraldehyde has been evaluated using two porcine skins. Bonding strength was measured by shear strength using a tensile instrument (Autograph; Shimadzu Inc., Kyoto, Japan) (Matsuda et al., 1999).

Today, the tensile test using a texture profile analyzer (TPA) is a useful technique that has been extensively employed as a valid means for mechanical

characterization of pharmaceutical buccal bioadhesive solid and semi-solid dosage forms (Eouani et al., 2001). The physical properties of the bioadhesive formulations can be examined using TPA to determine the following parameters (Jones et al., 1996): product hardness (force required to attain a given deformation); adhesiveness (the work necessary to overcome the attractive forces between the surface of the sample

TABLE 4 Bioadhesion Measurements by TA-XT2 Texture Analyzer Equipment

Bioadhesive	Dosage form	Reference(s)
HEC, PVP, PC	Gel	Jones et al., 1996
HEC, SCMC	Gel	Jones et al., 1997
HEC, PVP, PC	Gel	Jones et al., 1999
Eudragit, HPMC, SCMC, CP, PC, PVP, alginic acid, gelatin, chitosan	Patch	Wong et al., 1999a, 1999b
SCMC, PEG, CP 934P	Film	Peh & Wong, 1999
HEC, PVP, PC	Gel	Jones et al., 2000
PVP, CP 971P, PC, SCMC, carrageenan	Film	Eouani et al., 2001
PVP, CP 934, HPC	Tablet	Park & Munday, 2002
Chitosan	Gel and film	Ikinci et al., 2002
PGC	Gel and tablet	Martin et al., 2003

Note: CP=Carbopol; HEC=Hydroxyethyl cellulose; HPC=Hydroxypropyl cellulose; HPMC=Hydroxypropyl methylcellulose; PC=Polycarbophil; PEG=Polyethylene glycol; PVP=Polyvinylpyrrolidone; SCMC=Sodium carboxymethyl cellulose; PGC=Palmitoyl glycol chitosan.

M. L. Bruschi and O. de Freitas

304

and the surface of the probe); compressibility (the work required to deform the product during the first compression of the probe); elasticity (the ratio of the time required to achieve maximum structural deformation on the second compression cycle to that on the first compression cycle, where successive compressions are separated by a defined recovery period); cohesiveness (the ratio of the area under the force-time curve produced in the second compression cycle to that produced on the first compression cycle, where successive compressions are separated by a defined recovery period).

Most investigations describe the use of the Stable Micro Systems TA-XT2 texture analyzer (Haslemere, Surrey, U.K.). Many reports describe the use of this equipment to evaluate oral adhesive tablets, gels, ointments, patches, and films (Table 4).

Using a fluorescent probe method, an *ex vivo* system based on porcine buccal membranes was developed to demonstrate the bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbs on buccal membranes (Schmidgall et al., 2000). The test system was shown to discriminate the adhesive effects of different raw polysaccharides obtained from a variety of medicinal plants.

Atomic force microscopy (AFM) has also been used for oral bioadhesive systems (Patel et al., 2000). Standardized buccal cells were added to polymer solutions and bioadhesion was evaluated, showing that AFM is a sensitive technique for imaging the presence of adsorbed bioadhesive polymers on mucosal cell surfaces under the conditions of minimal sample preparation. The imaging methods described are relatively simple, in that they make use of contact mode, topographic operation, and as such, they are only able to provide qualitative and semi-quantitative information regarding cell coverage. Changes in surface topography were indicative of the presence

of bound polymer. This is an experimental method that provides strong additional supporting evidence about bioadhesion.

A direct method to evaluate the mucoadhesion of polymers from an aqueous dispersion, both *in vitro* and *in vivo*, was also described (Kockisch et al., 2001). Adhering polymer was visualized by staining with either 0.1% (w/v) Alcian blue or eosin solution. The extent of polymer adhesion was quantified by measuring the relative staining intensity of control and polymer-treated cells by image analysis.

Most of the *in vivo* studies of the buccal adhesive drug delivery systems described in the literature focus on the assessment of the bioavailability of the drug contained in them (Cui & Mumper, 2002b; Eouani et al., 2001; İkinci et al., 2002; Jones et al., 1999; Martin et al., 2003; Needleman, 1991; Shin et al., 2000; Varshosaz & Dehghan, 2002; Vinholis et al., 2001). *In vivo* techniques for measuring bioadhesive strength are relatively few, especially for oral bioadhesive systems. Some of the reported methods are based on the measurement of the residence time of oral bioadhesives at the application site (Ahuja et al., 1997).

It is very important to study the bioadhesion by both *in vitro/ex vivo* and *in vivo* methods and to determine the correlation between them. An *in vitro/in vivo* correlation study on the bioadhesive properties of three buccal formulations based on modified starch/polyacrylic acid mixture was performed (Bouckaert et al., 1993b). The *in vitro* method showed no significant influence of miconazole nitrate on the bioadhesion properties of the polymers, while the *in vivo* adhesion time of the pure polymer mixtures was significantly longer than for the polymers containing miconazole. The addition of 10% miconazole to the tablet formulation must have induced a decreased resistance to erosion in comparison to the tablet made of pure polymers. Therefore, the results

TABLE 5 *In Vivo* Methods Used to Study Bioadhesion

Method description	Subject	Reference (s)
Clinical evaluation	Human volunteers	Jones et al., 1999
Placebo buccal bioadhesive device	Adult male beagle dogs	Tiwari et al., 1999a, 1999b
Residence time investigation	Human volunteers	Peh & Wong, 1999
Clinical evaluation	Human volunteers	Jones et al., 2000
Bioadhesive force evaluation	Human volunteers	Choi & Kim, 2000
Evaluation of buccoadhesive erodible disk	Human volunteers	Ali et al., 2002
Study of the drug release	Human volunteers	Nafee et al., 2003

obtained with the *in vitro* method did not correlate well with the *in vivo* data and an *in vitro* method for the assessment of erosion may be necessary for optimization of a buccal bioadhesive dosage form. The *in vitro* method provided information only on the initial bioadhesion and no correlation could be established with the residence time of the tablet in the oral cavity. Some investigations using *in vivo* methods to study bioadhesion were first described by Ahuja et al. (1997), with many others having been developed since (Table 5).

MATERIALS

Bioadhesive materials that can adhere to soft tissues have great potential for medical applications (Matsuda et al., 1999). Polymers that can form adhesive interactions with biological substrates have been reported by several authors to offer certain advantages for drug delivery, including prolonged residence

time and improved location on specific sites (Jones et al., 1997).

A wide range of polymers, both natural and synthetic, have been studied for their potential use as mucoadhesives. The polymers that adhere to the mucin-epithelial surface can be conveniently divided into three broad categories: 1) polymers that become sticky when placed in water and owe their bioadhesion to stickiness; 2) polymers that adhere through nonspecific, noncovalent interactions that are primarily electrostatic in nature (although hydrogen and hydrophobic bonding may be significant); 3) polymers that bind to specific receptor sites on the cell surface (Glantz et al., 1999; Huang et al., 2000; Peppas & Sahlin, 1996).

Polymers that can adhere to either hard or soft tissue have been used for many years in surgery and dentistry. Among these "superglues," polymers and monomeric alpha-cyanoacrylate esters have been most frequently investigated and used. Other synthetic

TABLE 6 Oral Bioadhesive Polymers (Alone or in Combination)

Polymer	Reference(s)
Poly(acrylic acid), modified maize starch ^a	Bouckaert & Remon, 1993
Polyoxyethylene, polyethylene glycol ^a	Tiwari et al., 1999b
Carbopol, hydroxypropyl methylcellulose, gelatin ^a	Vivien-Castioni et al., 2000
Carbopol 934P, ethylcellulose, polyvinylpyrrolidone, cellulose acetate, poly(ethylene-co-vinyl acetate) ^b	Guo & Cooklock, 1996
Chitosan, poly(ethylene oxide), sodium carboxymethyl cellulose, xanthan gum, poly(acrylic acid), Carbopol, polycarbophil ^d	Needleman & Smales, 1995
Hydroxyethyl cellulose, sodium carboxymethyl cellulose ^d	Jones et al., 1997
Hydroxyethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, polycarbophil ^d	Jones et al., 1996, 1999, 2000
Poloxamer 407, Carbopol 934 ^d	Shin et al., 2000
Chitosan ^d	Ikinci et al., 2002; Senel et al., 2000
Collagen ^d	Vinholis et al., 2001
Palmitoyl glycol chitosan ^d	Martin et al., 2003
Ethylcellulose ^c	Friedman & Golomb, 1982
Atelocollagen ^c	Minabe et al., 1989
Cross-linked protein ^c	Steinberg et al., 1990
Ethylcellulose ^c	Jones & Medicott, 1995
Hydroxypropyl methylcellulose, sodium carboxymethyl cellulose, poly(acrylic acid), Carbopol 934P, polyethylene glycol 400 ^c	Peh & Wong, 1999
Gelatin ^c	Matsuda et al., 1999
Poly(acrylic acid-co-ethylhexyl acrylate) ^c	Shojaei et al., 2000
Chitosan ^c	Senel et al., 2000
Chitosan hydrochloride, poly(acrylic acid) ^c	Rossi et al., 2003
Gelatin, carboxymethyl cellulose ^c	Artusi et al., 2003

^aTablet.

^bPatch.

^cFilm.

^dSemi-solid.

M. L. Bruschi and O. de Freitas

306

polymers such as polyurethanes, epoxy resins, polystyrene, acrylates, and cements from natural products, and glues have also been extensively investigated. Cationic and anionic polymers bind more effectively than neutral polymers; polyanions are better than polycations in terms of binding/potential toxicity; water-insoluble polymers provide greater flexibility in dosage form design compared to rapidly or slowly dissolving water-soluble polymers; anionic polymers with sulphate groups bind more effectively than those with carboxylic groups; degree of binding is proportional to the charge density on the polymer (Park & Robinson, 1984).

An ideal polymer for an oral bioadhesive drug delivery system should have the following characteristics (Ahuja et al., 1997; Guo & Cooklock, 1996; Peh & Wong, 1999):

1. The polymer and its degradation products should be nontoxic and not absorbed through the mucous membrane.
2. It should not irritate the mucous membrane.
3. It should preferably form a strong noncovalent bond with the mucin-epithelial cell surfaces.
4. It should adhere quickly to moist tissue and should possess some site specificity.
5. It should allow easy incorporation of the drug and offer no hindrance to its release.
6. The polymer must not decompose during storage or during the shelf-life of the dosage form.
7. The cost of the polymer should not be high, so that the prepared dosage form remains competitive.
8. The polymer should allow flexibility and comfort of the dosage form.

Moreover, some of mucoadhesive polymers were found to inhibit proteolytic enzymes and/or modulate the permeability of tight epithelial tissue barriers (Lehr, 1996). Such features were found to be useful in the context of peptide and protein drug delivery, especially in the oral mucosa (Zhang & Robinson, 1996). Oral bioadhesive polymers currently utilized are presented in Tables 1, 2, and 6.

CONCLUSIONS

The oral mucosa possesses a range of permeabilities and properties. The smooth and relatively immobile surface of the oral cavity is suitable for placement of a

bioadhesive dosage form for sustained delivery of therapeutic agents.

Oral bioadhesive dosage forms have many advantages over traditional oral dosage forms. Adhesive tablets, unlike conventional tablets, allow drinking and speaking without major discomfort. Adhesive semi-solids may be used to deliver the drug via the oral mucosa with the possibility of prolonging residence time and improving bioavailability. Moreover, an adhesive semi-solid may be easily applied to the periodontal pocket using a periodontal syringe, being retained within the pocket for long periods of time. Adhesive patches may range from simple erodible and nonerodible adhesive films to sophisticated systems and can be designed to provide either unidirectional or multidirectional release of the drug. Oral bioadhesive polymeric films may be preferred in terms of flexibility, comfort, and easy application to the periodontal pocket. In addition, they can circumvent the relative short residence time of oral gels on the mucosa, which are easily washed away and removed by saliva. The choice of better oral bioadhesive dosage forms also depends on the characteristics of the drugs and on the site to be treated (periodontal pocket, gingiva, teeth, cheek mucosa, or systemic).

Drugs with short biological half-lives, requiring a sustained effect and/or exhibiting sensitivity to enzymatic degradation in the intestinal tract, may be successfully delivered via oral bioadhesive delivery systems.

Today, research on oral bioadhesive drug delivery systems continues at a rapid pace, aiming at successful treatment of common oral lesions (aphthae, ulcerations, etc.), periodontitis, gingivitis, and dental caries. Optimizing systemic treatment of disease via transmucosal drug delivery from the oral cavity continues to be investigated using a variety of dosage forms containing novel bioadhesive polymers.

REFERENCES

- Agarwal, V., & Mishra, B. (1999). Design, development, and biopharmaceutical properties of buccoadhesive compacts of pentazocine. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(6), 701–709.
- Ahuja, A., Khar, R. K., & Ali, J. (1997). Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(5), 489–515.
- Ali, J., Khar, R., Ahuja, A., & Kalra, R. (2002). Buccoadhesive erodible disk for treatment of orodental infections: design and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 283, 93–103.
- Alur, H. H., Indiran Pather, S., Mitra, A. K., & Johnston, T. P. (1999a).

Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems

- Transmucosal sustained-delivery of chlorpheniramine maleate in rabbits using a novel, natural mucoadhesive gum as an excipient in buccal tablets. *International Journal of Pharmaceutics*, 188, 1–10.
- Alur, H. H., Beal, J. D., Indiran Pather, S., Mitra, A. K., & Johnston, T. P. (1999b). Evaluation of a novel, natural oligosaccharide gum as a sustained-release and mucoadhesive component of calcitonin buccal tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(12), 1313–1319.
- Ameye, D., Voorspoels, J., Foreman, P., Tsai, J., Richardson, P., Geresh, S., & Remon, J. P. (2002). Ex vivo bioadhesion and in vivo testosterone bioavailability study of different bioadhesive formulations based on starch-g-poly(acrylic acid) copolymers and starch/poly(acrylic acid) mixtures. *Journal of Controlled Release*, 79, 173–182.
- Anders, R., & Merkle, H. P. (1989). Evaluation of laminated mucoadhesive patches for buccal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 49, 231–240.
- Artusi, M., Santi, P., Colombo, P., & Junginger, H. E. (2003). Buccal delivery of thiocolchicoside: in vitro and in vivo permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 203–213.
- Aungst, B. J., & Rogers, N. J. (1988). Site dependence of absorption-promoting actions of laurith-9, Na salicylate, and aprotinin on rectal, nasal, and buccal insulin delivery. *Pharmaceutical Research*, 5, 305–308.
- Beyssac, E., Touaref, F., Meyer, M., Jacob, L., Sandouk, P., & Aiache, J.-M. (1998). Bioavailability of morphine after administration of a new bioadhesive buccal tablet. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 19, 401–405.
- Bottenberg, P., Cleymaet, R., Röhrkasten, K., & Lampert, F. (2000). Microhardness changes in surface enamel after application of bioadhesive fluoride tablets in situ. *Clinical Oral Investigations*, 4, 153–156.
- Bouckaert, S., & Remon, J. P. (1993). In-vitro bioadhesion of a buccal, miconazole slow-release tablet. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45, 504–507.
- Bouckaert, S., Lefebvre, R. A., Colardyn, F., & Remon, J. P. (1993a). Influence of the application site on bioadhesion and slow-release characteristics of a bioadhesive buccal slow-release tablet of miconazole. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 44, 331–335.
- Bouckaert, S., Lefebvre, R. A., & Remon, J. P. (1993b). In vitro/in vivo correlation of the bioadhesive properties of a buccal bioadhesive miconazole slow-release tablet. *Pharmaceutical Research*, 10(6), 853–856.
- Brook, I. M., Tucker, G. T., Tuckley, E. C., & Boyes, R. N. (1989). A lignocaine patch for dental analgesia safety and early pharmacology. *Journal of Controlled Release*, 10, 183–188.
- Chidambaram, N., & Srivatsava, A. K. (1995). Buccal drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21(9), 1009–1036.
- Choi, H.-G., & Kim, C.-K. (2000). Development of omeprazole buccal adhesive tablets with stability enhancement in human saliva. *Journal of Controlled Release*, 68, 397–404.
- Choi, H.-G., Jung, J.-H., Yong, C. S., Rhee, C.-D., Lee, M.-K., Han, J.-H., Park, K.-M., & Kim, C.-K. (2000). Formulation and in vivo evaluation of omeprazole buccal adhesive tablet. *Journal of Controlled Release*, 68, 405–412.
- Collins, A. E., & Deasy, P. B. (1990). Bioadhesive lozenge for the improved delivery of cetylpyridinium chloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79, 116–119.
- Cui, Z., & Mumper, R. J. (2002a). Bilayer films for mucosal (genetic) immunization via the buccal route in rabbits. *Pharmaceutical Research*, 19(7), 947–953.
- Cui, Z., & Mumper, R. J. (2002b). Buccal transmucosal delivery of calcitonin in rabbits using thin-film composites. *Pharmaceutical Research*, 19(12), 1901–1906.
- DeGrande, G., Benes, L., Horrière, F., Karsenty, H., Lacoste, C., McQuinn, R., Guo, J. H., & Scherrer, R. (1996). Specialized oral mucosal drug delivery systems: patches. In M. J. Rathbone (Ed.), *Oral Mucosal Drug Delivery* (pp. 285–317). New York: Marcel Dekker.
- Dowty, M. E., Knuth, K. E., Irons, B. K., & Robinson, J. R. (1992). Transport of thyrotropin releasing hormone in rabbit buccal mucosa in vitro. *Pharmaceutical Research*, 9, 1113–1122.
- Edgar, W. M. (1992). Saliva: its secretion, composition and functions. *British Dental Journal*, 172, 305–312.
- Euani, C., Piccerelle, Ph., Prinderre, P., Bourret, E., & Joachim, J. (2001). In vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy*, 52, 45–55.
- Friedman, M., & Golomb, G. (1982). New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use. *Journal of Periodontal Research*, 17, 323–328.
- Gandhi, R. E., & Robinson, J. R. (1988). Bioadhesion in drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 145–152.
- Gandhi, R. E., & Robinson, J. R. (1994). Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 13, 43–74.
- Garcia, A. L., Lara, E. H. G., & Panzeri, H. P. (1998). Estudo in vitro de sistemas bioadesivos para liberação sustentada de fluoreto. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, 12(2), 143–148.
- Glantz, P. O. J., Arnebrant, T., Nylander, T., & Baier, R. E. (1999). Bioadhesion—a phenomenon with multiple dimensions. *Acta Odontologica Scandinavica*, 57, 238–241.
- Guo, J. H. (1994). Investigating the surface properties and bioadhesion of buccal patches. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, 647–650.
- Guo, J. H., & Cooklock, K. M. (1996). The effects of backing materials and multilayered systems on the characteristics of bioadhesive buccal patches. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48, 255–257.
- Guo, J. H., & Cremer, K. (1999). Development of bioadhesive buccal patches. In: E. Mathiowitz, D. E. Chickering, & M. Lehr (Eds.), *Bioadhesive Drug Delivery Systems* (pp. 541–562). New York: Marcel Dekker.
- Harris, D. H., & Robinson, J. R. (1992). Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 1–10.
- Huang, Y., Leobandung, W., Foss, A., & Peppas, N. A. (2000). Molecular aspects of muco- and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces. *Journal of Controlled Release*, 65, 41–63.
- Ikinci, G., Senel, S., Akincibay, H., Kas, S., Ercis, S., Wilson, C. G., & Hincal, A. A. (2002). Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *International Journal of Pharmaceutics*, 235, 121–127.
- Jain, A. C., Aungst, B. J., & Adeyeye, M. C. (2002). Development and in vivo evaluation of buccal tablets prepared using danazol-sulfobutylether 7 β -cyclodextrin (SBE) complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(7), 1659–1668.
- Jones, D. S., & Medlicott, N. J. (1995). Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics*, 114, 257–261.
- Jones, D. S., Woolfson, A. D., Djokic, J., & Coulter, W. A. (1996). Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. *Pharmaceutical Research*, 13(11), 1734–1738.
- Jones, D. S., Woolfson, A. D., & Brown, A. F. (1997). Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 223–233.
- Jones, D. S., Irwin, C. R., Woolfson, A. D., Djokic, J., & Adams, V. (1999). Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy

- of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(6), 592–598.
- Jones, D. S., Woolfson, A. D., Brown, A. F., Coulter, W. A., McClelland, C., & Irwin, C. R. (2000). Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*, 67, 357–368.
- Kashi, S. D., & Lee, V. H. L. (1986). Enkephalin hydrolysis in homogenates of various absorptive mucosa of the albino rabbit: similarities in rates and involvement of aminopeptidases. *Life Sciences*, 38, 2019–2028.
- Kockisch, S., Rees, G. D., Young, S. A., Tsiouklis, J., & Smart, J. S. (2001). A direct-staining method to evaluate the mucoadhesion of polymers from aqueous dispersion. *Journal of Controlled Release*, 77, 1–6.
- Kohda, Y., Kobayashi, H., Baba, Y., Yuasa, H., Ozeki, T., Kanaya, Y., & Sagara, E. (1997). Controlled release of lidocaine hydrochloride from buccal mucosa-adhesive films with solid dispersion. *International Journal of Pharmacy*, 158, 147–155.
- Langoth, N., Kalbe, J., & Bernkop-Schnürch, A. (2003). Development of buccal drug delivery systems based on a thiolated polymer. *International Journal of Pharmaceutics*, 252, 141–148.
- Lara, E. H. G., Garcia, A. L., & Panzeri, H. (1998). Estudos de sistemas acrílicos bioadesivos para liberação sustentada in vitro de fluoreto. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, 12(3), 287–291.
- Lee, V. H. L., & Yamamoto, A. (1990). Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 4, 171–207.
- Lehr, C. M. (1996). From stick stuff to sweet receptors—achievements, limits and novel approaches to bioadhesion. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21(2), 139–148.
- Li, C., Bhatt, P. P., & Johnston, T. P. (1998). Evaluation of a mucoadhesive buccal patch for delivery of peptides: in vitro screening of bioadhesion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(10), 919–926.
- Martin, L., Wilson, C. G., Koosha, F., & Uchegbu, I. F. (2003). Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy*, 55, 35–45.
- Matsuda, S., Iwata, H., Se, N., & Ikada, Y. (1999). Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45, 20–27.
- McGinity, J. W., Zhang, F., Repka, M. A., & Koleng, J. J. (2001). Hot-melt extrusion as a pharmaceutical process. *American Pharmaceutical Review*, 4(2), 25–36.
- Medlicott, N. J., Rathbone, M. J., Tucker, I. G., & Holborow, D. W. (1994). Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 13, 181–203.
- Minabe, M., Tamura, T., Hori, T., & Uemoto, T. (1989). Subgingival administration of tetracycline on a collagen film. *Journal of Periodontology*, 60, 552–556.
- Miyazaki, S., Kawasaki, N., Nakamura, T., Iwatsu, M., Hayashi, T., Hou, W.-M., & Attwood, D. (2000). Oral mucosal bioadhesive tablets of pectin and HPMC: in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 204, 127–132.
- Nafee, N. A., Ismail, F. A., Boraie, N. A., & Mortada, L. M. (2003). Mucoadhesive buccal patches of miconazole nitrate: in vitro/in vivo performance and effect of ageing. *International Journal of Pharmaceutics*, 264, 1–14.
- Nakada, Y., Awata, N., Nakamichi, C., & Sugimoto, I. (1987). Stability of human calcitonin in the supernatant of the rat's oral mucosa homogenate. *Yakuz*, 47, 217–223.
- Needleman, I. G. (1991). Controlled drug release in periodontics: a review of new therapies. *British Dental Journal*, 170, 405–408.
- Needleman, I. G., & Smales, F. C. (1995). In vitro assessment of bioadhesion for periodontal and buccal drug delivery. *Biomaterials*, 16, 617–624.
- Newman, H. N. (1992). Chemical agents in the management of inflammatory periodontal diseases. In H. N. Newman & D. M. Williams (Eds.), *Inflammation and Immunology in Chronic Inflammatory Periodontal Disease* (pp. 141–167). Northwood: Science Reviews.
- Park, C. R., & Munday, D. L. (2002). Development and evaluation of a biphasic buccal adhesive tablet for nicotine replacement therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 237, 215–226.
- Park, H., & Robinson, J. R. (1984). Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion. *International Journal of Pharmaceutics*, 19, 107–127.
- Patel, D., Smith, J. R., Smith, A. W., Grist, N., Barnett, P., & Smart, J. D. (2000). An atomic force microscopy investigation of bioadhesive polymer adsorption onto human buccal cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 200, 271–277.
- Peh, K. K., & Wong, C. F. (1999). Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 53–61.
- Peppas, N. A., & Sahlin, J. (1996). Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials*, 17, 1553–1561.
- Rathbone, M. J., & Tucker, I. G. (1993). Mechanisms, barriers and pathways of oral mucosal drug permeation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 12, 41–60.
- Repka, M. A., & McGinity, J. W. (2000a). Physical-mechanical, moisture absorption and bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose hot-melt extruded films. *Biomaterials*, 21(14), 1509–1517.
- Repka, M. A., & McGinity, J. W. (2000b). Influence of vitamin E TPGS on the properties of hydrophilic films produced by hot-melt extrusion. *International Journal of Pharmaceutics*, 202(1–2), 63–70.
- Repka, M. A., & McGinity, J. W. (2001a). Bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose topical films produced by hot-melt extrusion. *Journal of Controlled Release*, 70, 341–351.
- Repka, M. A., & McGinity, J. W. (2001b). Influence of chlorpheniramine maleate on topical films produced by hot-melt extrusion. *Pharmaceutical Development and Technology*, 6(3), 295–302.
- Repka, M. A., Gerding, T. G., Repka, S. L., & McGinity, J. W. (1999). Influence of plasticizers and drugs on the physical-mechanical properties of hydroxypropylcellulose films prepared by hot-melt extrusion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(5), 625–633.
- Repka, M. A., Prodduturi, S., & Stodghill, S. P. (2003). Production and characterization of hot-melt extruded films containing clotrimazole. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(7), 757–765.
- Repka, M. A., Prodduturi, S., Munjai, M., & Mididoddi, P. (2004). Matrix and reservoir-based transmucosal delivery systems: tailoring delivery solutions. *American Journal of Drug Delivery*, 2(3), 173–192.
- Rossi, S., Sandri, G., Ferrari, F., Bonferoni, M. C., & Caramella, C. (2003). Buccal delivery of acyclovir from films based on chitosan and polyacrylic acid. *Pharmaceutical Development and Technology*, 8(2), 199–208.
- Schmidgall, J., Schnetz, E., & Hensel, A. (2000). Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbs in an ex vivo bioadhesion assay on buccal membranes. *Planta Medica*, 66, 48–53.
- Senel, S., Kremer, M. J., Kas, S., Wertz, P. W., Hincal, A. A., & Squier, C. A. (2000). Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. *Biomaterials*, 21, 2067–2071.
- Shin, S. C., Burn, J. P., & Choi, J. S. (2000). Enhanced bioavailability by buccal administration of triamcinolone acetonide from the bioadhesive gels in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, 209, 37–43.

- Shojaei, A. H. (1998). Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 15–30.
- Shojaei, A. H., Paulson, J., & Honary, S. (2000). Evaluation of poly(acrylic acid-co-ethylhexyl acrylate) films for mucoadhesive transbuccal drug delivery: factors affecting the force of mucoadhesion. *Journal of Controlled Release*, 67, 223–232.
- Singh, B., & Ahuja, N. (2002). Development of controlled-release buccoadhesive hydrophilic matrices of diltiazem hydrochloride: optimization of bioadhesion, dissolution, and diffusion parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(4), 432–442.
- Song, I. S., Yoshioka, M., Erickson, R. H., Miura, S., Guan, D., & Kim, Y. S. (1986). Identification and characterization of brush-border membrane-bound neutral metalloendopeptidases from rat small intestine. *Gastroenterology*, 91, 1234–1242.
- Soskolone, W. A., & Freidman, M. F. (1996). Intra-periodontal pocket drug delivery systems. *Oral Mucosal Drug Delivery*. New York: Marcel Dekker, 359–379.
- Steinberg, D. A., Friedman, M., Soskolne, A., & Sela, M. N. (1990). A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: in vitro release study. *Journal of Periodontology*, 61(7), 393–398.
- Stephenson, S. L., & Kenny, A. J. (1988). The metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of peptides by the phosphoramidon-insensitive rat kidney enzyme 'endopeptidase-2' and rat microvillar membranes. *Biochemical Journal*, 255, 45–51.
- Tiwari, D., Sause, R., & Madan, P. L. (1999a). Evaluation of polyoxyethylene homopolymers for buccal bioadhesive drug delivery device formulations. *AAPS PharmSci*, 1(3), 1–7.
- Tiwari, D., Goldman, D., Town, C., Sause, R., & Madan, P. L. (1999b). In vitro-in vivo evaluation of a controlled release buccal bioadhesive device for oral drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 16(11), 1775–1780.
- Tsutsumi, K., Obata, Y., Nagai, T., Loftsson, T., & Takayama, K. (2002). Buccal absorption of ergotamine tartrate using the bioadhesive tablet system in guinea-pigs. *International Journal of Pharmaceutics*, 238, 161–170.
- Varshosaz, J., & Dehghan, Z. (2002). Development and characterization of buccoadhesive nifedipine tablets. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy*, 54, 135–141.
- Vinholis, A. H. C., Figueiredo, L. C., Jr., Marcantonio, E., Marcantonio, R. A. C., Salvador, S. L. S., & Goissis, G. (2001). Subgingival utilization of a 1% chlorhexidine collagen gel for the treatment of periodontal pockets. A clinical and microbiological study. *Brazilian Dental Journal*, 12(3), 209–213.
- Vivien-Castioni, N., Gurny, R., Baehni, P., & Kaltsatos, V. (2000). Salivary fluoride concentrations following applications of bioadhesive tablets and mouth rinses. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy*, 49, 27–33.
- Voorspoels, J., Remon, J. P., Eechaute, W., & De Sy, W. (1996). Buccal absorption of testosterone and its esters using a bioadhesive tablet in dogs. *Pharmaceutical Research*, 13(8), 1228–1232.
- Walker, G. F., Langoth, N., & Bernkop-Schnürch, A. (2002). Peptidase activity on the surface of the porcine buccal mucosa. *International Journal of Pharmaceutics*, 233, 141–147.
- Walton, A. G., & Rutland, R. F. (1998). Glyceryl trinitrate preparation (Suscard Buccal) causes caries and changes to the denture base material. *British Dental Journal*, 185(6), 288–289.
- Wong, C. F., Yuen, K. H., & Peh, K. K. (1999a). Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. *International Journal of Pharmaceutics*, 178, 11–22.
- Wong, C. F., Yuen, K. H., & Peh, K. K. (1999b). An in-vitro method for buccal adhesion studies: importance of instrument variables. *International Journal of Pharmaceutics*, 180, 47–57.
- Woodley, J. (2001). Bioadhesion: new possibilities for drug administration? *Clinical Pharmacokinetics*, 40(2), 77–84.
- Yamamoto, A., Hayakawa, E., & Lee, V. H. L. (1990). Insulin and proinsulin in mucosal homogenates of the albino rabbit: implications in peptide delivery from normal routes. *Life Sciences*, 47, 2465–2474.
- Zhang, H., & Robinson, J. R. (1996). Routes of drug transport across oral mucosa. In M. Rathbone (Ed.), *Oral Mucosal Drug Delivery* (pp. 51–63). New York: Marcel Dekker.

APÊNDICE C – Trabalho 3

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
vol. 42, n. 1, jan./mar., 2006

RBCF

Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal

Marcos Luciano Bruschi¹, Heitor Panzeri², Osvaldo de Freitas¹, Elza Helena Guimarães Lara¹,
Maria Palmira Daflon Gremião^{3*}

¹Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, ²Departamento de Materiais Dentários e Prótese, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, ³Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista

A doença periodontal é morbidade com alta prevalência na população mundial. É causada pelo acúmulo de componentes microbianos do biofilme dental no interior das áreas subgingivais do periodonto, desencadeando processo inflamatório que afeta as estruturas de suporte dental, resultando em formação de bolsa periodontal e perda dos dentes, se não tratada. O tratamento convencional consiste de raspagem e alisamento radicular, associado ou não ao uso de antimicrobianos de ação sistêmica, o que implica altas doses, porém com eficácia reduzida, efeitos adversos e dificuldades de adesão ao tratamento por parte do paciente. Nas últimas décadas, o tratamento tem sido otimizado pelo uso de sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal, com a vantagem de liberar o fármaco no local de ação, possibilitando prolongar e/ou controlar sua concentração. A presente revisão aborda os principais sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal, o potencial de utilização, assim como os protocolos disponíveis para a avaliação da efetividade dos mesmos na terapia periodontal.

Unitermos

- Doença periodontal
- Bolsa periodontal
- Sistemas de liberação
- Liberação intrabolsa periodontal

*Correspondência:

M. P. D. Gremião
Departamento de Fármacos e
Medicamentos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual Paulista - UNESP
Rod. Araraquara-Jaú, km 1
14801-902 - Araraquara, SP - Brasil
E-mail: pgremiao@fotafar.unesp.br

INTRODUÇÃO

Entre os vários sistemas do organismo humano, o digestório possui a importante função de mastigação, ingestão e absorção dos alimentos, e eliminação de parte dos resíduos (Erhart, 1987). Os dentes são órgãos acessórios do sistema digestório, estão implantados nos arcos alveolares da maxila e mandíbula e têm por função essencial a mastigação, cortando, moendo e misturando os alimentos ingeridos (Guyton, 1989).

A saúde bucal é muito importante para a manutenção da saúde global do organismo humano. No entanto,

vários problemas, tais como neoplasias, disfunções glandulares, cáries e doença periodontal, acometem a cavidade oral. O termo “doença periodontal” define várias doenças associadas com o periodonto (Steinberg, Friedman, 1988). Trata-se de uma morbidade que afeta as estruturas de suporte dos dentes, nomeadamente o ligamento periodontal, cemento, osso alveolar e gengiva (Seymour, Heasman, 1992). Afeta virtualmente a maioria da população mundial, sendo a maior fonte de perda de dente após os 25 anos de idade (Deasy *et al.*, 1989).

Existe evidência esmagadora de que a doença periodontal é causada por acúmulo de componentes

microbianos do biofilme dental que se acumula no interior das áreas subgengivais do periodonto (Friedman, Golomb, 1982; Listgarten, 1986; Jones *et al.*, 1996; Monbelli, 2003). O epitélio juncional dental é um tecido que não possui a barreira de permeabilidade superficial, constituindo uma via pela qual toxinas, antígenos e enzimas derivados de biofilme bacteriano, que se formam na superfície dental, podem penetrar e atingir o tecido conjuntivo subepitelial. Isto inicia um ciclo inflamatório e de injúrias teciduais, que facilitam a entrada de irritantes pelo sulco dental e exacerbam os danos (Seymour, Heasman, 1992). Eventualmente a destruição tecidual envolverá as estruturas suportes dos dentes e acarretará a perda dental (Medlicott *et al.*, 1994).

A doença periodontal pode ser classificada de acordo com o grau e a extensão do tecido envolvido. Na gengivite, estágio moderado da doença, a resposta inflamatória é restrita aos tecidos gengivais, sendo caracterizada por intumescimento, vermelhidão e sangramento da gengiva marginal (Steinberg, Friedman, 1988; Medlicott *et al.*, 1994). No caso de periodontite, um estágio mais grave da doença periodontal (Listgarten, 1986), as alterações podem se estender a tecidos mais profundos, sendo que o número de bactérias Gram-negativas pode aumentar para 70% do total da flora (Steinberg, Friedman, 1988), na maioria anaeróbias restritas ou facultativas (Tanner *et al.*, 1979; Slots, 1979, 1982; Saglie *et al.*, 1982; Loesche *et al.*, 1985; Kaplan *et al.*, 1989; Seymour, Heasman, 1992; Bolstad *et al.*, 1996; Jorgensen, Slots, 2000). Como resultado, pode ocorrer rompimento do ligamento do tecido conectivo à superfície da raiz do dente e migração apical do epitélio juncional, que podem resultar na recessão gengival e formação de bolsa, na exposição do cimento, na perda de osso alveolar e no aumento na mobilidade do dente (Seymour, Heasman, 1992).

A bolsa periodontal é um sulco aprofundado patologicamente (Steinberg, Friedman, 1988) entre a gengiva e o dente, que causa retração da gengiva marginal e o desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento na superfície da raiz do dente e na camada mais externa do cimento de bactérias anaeróbias e outros microrganismos responsáveis pela doença (Seymour, Heasman, 1992; Perioli *et al.*, 2004). Em um sulco gengival normal, o espaço entre a gengiva e o dente mede entre 1 a 3 mm de profundidade. Entretanto, durante a periodontite, a profundidade da bolsa excede 5 mm, podendo chegar a 12 mm (Medlicott *et al.*, 1994). Além disso, em sítios saudáveis do periodonto ocorre a presença de pequenas quantidades de fluido crevicular gengival (0,04 μL), com baixas taxas de fluxo (0,03 $\mu\text{L}/\text{min}$) e concentração de proteínas similar ao fluido extracelular (Hattingh, Ho, 1980). Por

outro lado, nos sítios doentes há um aumento na produção de fluido e a composição protéica é semelhante à do soro, indicando a formação de exsudato nesses locais. O volume e a taxa de fluxo depende do grau da infecção e da inflamação em cada local. Volumes de 0,5 μL e fluxos de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 0,9 $\mu\text{L}/\text{min}$ têm sido frequentemente relatados (Hattingh, Ho, 1980; Goodson, 1989; Stoltze, 1992), podendo alcançar valores de 150 $\mu\text{L}/\text{h}$ (Steinberg, Friedman, 1988).

Como a especificidade do biofilme dental em relação à infecção na doença periodontal é fato evidente (Gabarra, 2002), o combate às bactérias, a adequação do meio e a prevenção são fatores primordiais na restituição da saúde (Loesche, 1976; Slots, 1976; Addy, 1986; Greenstein *et al.*, 1986; Quee, 1989; Williams, Howell, 1993; Medlicott *et al.*, 1994; Newman, 1995). Assim, o tratamento periodontal tem por objetivo a cura do tecido inflamado, a redução do número de bactérias patogênicas e a eliminação da bolsa (Steinberg, Friedman, 1988). O tempo torna o tratamento progressivamente mais difícil, necessitando de procedimentos terapêuticos cada vez mais agressivos e complexos. Estudos evidenciaram diferenças marcantes entre as metodologias e as substâncias utilizadas para o combate da moléstia periodontal (Gabarra *et al.*, 2002). Assim, o tratamento periodontal tradicional consiste no controle do biofilme subgengival, através de um meticuloso desbridamento periódico da bolsa (curetagem), raspagem e aplainamento radicular, realizado pelo dentista, associado ao controle da placa supragengival, através de cuidados domiciliares por parte do paciente (Helldén *et al.*, 1979; Lindhe, Nyman, 1984; Holborow, 1986; Joyston-Bechal, Emslie, 1987; Ramfjord, 1987; Van Der Ouderaa, 1991).

Agentes antiinflamatórios esteróides (glicocorticóides) e não-esteróides (salicilatos, pirazolonas, derivados da pirazolona, derivados do ácido fenilpropionico, derivados do ácido antranílico e derivados do ácido fenilacético) têm sido estudados e utilizados como adjuvantes ao tratamento mecânico de limpeza realizado pelo dentista (Seymour, Heasman, 1992; Jones *et al.*, 1999). No entanto, muitas vezes o objetivo desse tratamento não é alcançado por problemas anatômicos e/ou técnicos, como a formação de nichos de microrganismos entre as raízes dentais e a capacidade de alguns destes em adentrarem nos tecidos conjuntivos, dificultando e/ou impossibilitando o acesso durante os procedimentos mecânicos de limpeza e raspagem radicular (Okuda *et al.*, 1992; Kinane, Radvar 1999). Quando a eliminação da bolsa não é alcançada por estes métodos, a cirurgia é utilizada para remover o tecido necrótico e reduzir a profundidade da bolsa (Steinberg,

Friedman, 1988). Essas limitações da terapêutica permitem que bolsas refratárias ao tratamento se reativem, fato que tem levado cientistas a procurarem solução alternativa com o tratamento medicamentoso com repetidas administrações de agentes antimicrobianos com ação sistêmica ou local (Loesche, 1976; 1979; Deasy *et al.*, 1989; Turnbull, 1989; Friedman, Steinberg, 1990; Ainamo *et al.*, 1992; Giordano *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1992; Thomson *et al.*, 1992; Rethman *et al.*, 1995; Kinane, Radvar, 1999; Jorgensen, Slots, 2000).

Vários autores têm descrito o uso de antimicrobianos na doença periodontal (Genco, 1981; Joyston-Beechal, Emslie, 1987; Turnbull, 1989; Seymour, Heasman, 1992; Baakilini *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1998; Eley, 1999; Gebara, 1999; Manara *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 2000; Hirasawa *et al.*, 2002; Sastravaha *et al.*, 2003), com a obtenção de efeitos clínicos e microbiológicos importantes (Norkiewicz *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2002; Pavia *et al.*, 2003, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004). Esses fármacos quando administrados no local ou sistemicamente, são eficazes em reduzir a patogenicidade da microbiota subgingival, melhorando a resposta clínica do tratamento periodontal (Seymour, Heasman, 1992).

A administração de antimicrobianos de ação sistêmica demonstrou que concentrações terapêuticas são alcançadas no sítio da infecção por curtos períodos de tempo após uma dose simples (Medlicott *et al.*, 1994). No entanto, ela não pode ser utilizada por um longo período de tempo. Muitos efeitos colaterais indesejáveis podem surgir, tais como náuseas, vômito, diarreia, gastrite, úlceras, outros transtornos digestivos, alergias e desenvolvimento de resistência pelos microrganismos (Friedman, Golomb, 1982; Addy, Langeroudi, 1984; Brook, Van Noort, 1984; Addy, 1986; Joyston-Beechal, Emslie, 1987; Friedman, Steinberg, 1990; Greenstein, 1995; Tinoco *et al.*, 1998), diminuindo a razão risco/benefício para um ponto no qual este tipo de tratamento não pode ser aceitável (Steinberg, Friedman, 1988; Ciancio, 1996). Assim, a liberação de fármaco intrabolsa periodontal, uma categoria especial de liberação local na cavidade oral (Medlicott *et al.*, 1994), é geralmente utilizada no tratamento de doenças periodontais (Sokolone, Friedman, 1996). A administração do fármaco no interior da bolsa periodontal é uma alternativa para minimizar a distribuição deste no organismo e, por conseguinte, aumentar a sua concentração no local a ser tratado e diminuir os efeitos adversos indesejáveis (Steinberg, Friedman, 1988; Perioli *et al.*, 2004).

Bochechos, irrigações e jatos pulsáteis não penetram além de 1 a 2 mm abaixo da margem gengival (Ito *et al.*, 1980; Pitcher *et al.*, 1980; Badersten *et al.*, 1981;

Friedman, Golomb, 1982; Yeung *et al.*, 1983). O tempo de permanência de soluções de agentes antibacterianos diretamente no interior da bolsa periodontal é curto, mesmo utilizando dispositivos de irrigação adequados (Greenstein, 1987), portanto, administrações freqüentes são requeridas para a manutenção das concentrações na bolsa periodontal (Medlicott *et al.*, 1994). Dessa maneira, a aderência ao tratamento por parte do paciente é um fator limitante para assegurar a eficácia clínica do tratamento. Devido a todos esses problemas, atenção tem sido dada no desenvolvimento de verdadeiros sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal (SLIBP) (Ranadive, Bhat, 1998; Kinane, 2000). Assim, o objetivo do presente trabalho é revisar a literatura relacionada com esses sistemas.

VANTAGENS E DESVANTAGENS

A bolsa periodontal é um reservatório natural que permite a inserção de um dispositivo de liberação, sendo que os benefícios que podem ser adquiridos baseiam-se na liberação do agente terapêutico no local a ser tratado e a manutenção dos níveis adequados de fármaco por um período estabelecido de tempo (Steinberg, Friedman, 1988). Goodson *et al.* (1979) foram os primeiros a desenvolver um SLIBP, sugerindo que a utilização de um supositório de liberação controlada de um fármaco colocado na bolsa poderia ser altamente efetiva para a administração de agentes antibacterianos na terapia periodontal.

Desde então, número crescente de sistemas biodegradáveis ou não tem sido desenvolvido com o objetivo de proporcionar liberação prolongada e/ou controlada de antimicrobianos, em concentração adequada, no interior da bolsa periodontal.

Quando os objetivos acima são alcançados, o SLIBP oferece muitas vantagens (Steinberg, Friedman, 1988; Sokolone, Friedman, 1996):

- possibilita o controle e monitoramento dos níveis de fármaco no sítio de aplicação;
- é um meio útil de liberar na cavidade oral um fármaco que não é absorvido no sistema gastrointestinal (por exemplo, clorexidina);
- possibilita a obtenção de altas concentrações de fármaco no local a ser tratado, quando comparadas com os níveis plasmáticos após a administração oral;
- pode mascarar o sabor e odor desagradável de determinados fármacos e evitar o aparecimento de manchas nos dentes.

Por outro lado, deve ser considerada, a dificuldade (impossibilidade) de interrupção rápida da ação farmacológica, em caso de irritação ou intolerância. Além

disso, existem outras desvantagens (Ansel *et al.*, 2000; Soskolone, Freidman, 1996):

- a reprodutibilidade da ação depende da taxa do fluxo crevicular gengival e das condições anatomopatológicas da bolsa periodontal;
- a cinética de liberação depende da integridade da forma farmacêutica;
- o tamanho da preparação às vezes é muito grande;
- a biodisponibilidade reduzida, devido ao baixo fluxo;
- os custos mais elevados que os das formas farmacêuticas convencionais.

PROPRIEDADES

No desenvolvimento de SLIBP devem ser consideradas as características anatomo-fisiológicas da bolsa periodontal, pois ela é naturalmente irrigada pelo fluido crevicular gengival. Em pessoas com doença periodontal a taxa média de fluxo do fluido crevicular em sítios individuais está aumentada. Geralmente, um fluxo alto resultará em uma difusão mais rápida do fármaco do dispositivo de liberação, enquanto que um fluxo mais baixo retarda essa depleção. Assim, a taxa de liberação deve ser mais alta no estágio inicial da liberação, para que seja atingido o nível terapêutico o mais rápido possível, mantendo-se durante todo o período de tratamento (Steinberg, Friedman, 1988).

Um outro parâmetro a ser considerado é a absorção do fármaco. Um fármaco com baixa capacidade de penetração através dos tecidos da mucosa pode alcançar altas concentrações e prolongar esses níveis elevados no interior da bolsa (Steinberg, Friedman, 1988).

O tamanho e a profundidade da bolsa são importantes na formulação do sistema. Desde que a profundidade média de uma bolsa é de 5 a 12 mm (Medlicott *et al.*, 1994), o sistema não pode ser grande. Assim, é necessário que a dose do agente ativo contida no mesmo seja altamente efetiva, e que este seja altamente específico, evitando, por exemplo, recidivas e o aparecimento de cepas resistentes (Steinberg, Friedman, 1988).

Além disso, o dispositivo (Steinberg, Friedman, 1988; Medlicott *et al.*, 1994; Soskolone, Freidman, 1996):

- deve ser de fácil aplicação por parte do profissional (dentista);
- não deve ser volumoso e nem causar desconforto ou irritação;
- deve possuir características físicas que facilitem a inserção rápida dentro da bolsa, causando o mínimo de dor ao paciente;
- não pode ser exposto além da margem gengival;

- não deve causar interferência na higiene oral diária normal do paciente, a qual inclui escova e fio dental;
- não pode gerar problema no padrão de dieta normal do paciente;
- deve ser prontamente aceito pelo paciente.

CLASSIFICAÇÃO

Um SLIBP pode ser classificado em biodegradável e não-biodegradável, dependendo do material envolvido na sua concepção (Soskolone, Freidman, 1996). Dispositivos que não são biodegradáveis possuem a vantagem de permitir o controle do tempo de exposição do ambiente da bolsa ao fármaco. Entretanto, a principal limitação desse tipo de dispositivo é a necessidade de remoção do mesmo após o período de tratamento e vários problemas têm sido associados a esse procedimento (Medlicott *et al.*, 1994). Normalmente é necessária competência técnica para assegurar a retirada completa do dispositivo vazio, devido à possibilidade do aparecimento de efeitos indesejáveis, tais como inflamação do tecido local, resultantes do reconhecimento pelo sistema imune de um corpo estranho (fragmentos). Além disso, a remoção do dispositivo é acompanhada por um rápido declínio na concentração antibacteriana (Tonetti *et al.*, 1990), o qual está frequentemente associado com recolonização da bolsa periodontal. Por outro lado, os dispositivos biodegradáveis possuem a grande vantagem do paciente necessitar de apenas uma visita ao dentista para a inserção do dispositivo, que não precisa ser retirado, havendo diminuição das visitas clínicas e assegurando melhor adesão do paciente ao tratamento (Steinberg, Friedman, 1988; Bromberg *et al.*, 2001).

A partir das últimas três décadas do século passado até os dias de hoje, vários sistemas reservatórios ou matriciais foram investigados (Medlicott *et al.*, 1994). Sistemas do tipo reservatório são constituídos por um núcleo contendo o fármaco no estado sólido ou líquido, revestido por uma membrana ou parede permeável. Já em um sistema de liberação matricial o fármaco é distribuído através do polímero ou mistura de polímeros, de natureza química e propriedades variáveis, sendo que a liberação ocorre através da difusão e/ou dissolução ou erosão da matriz (Ansel, 2000). Os dispositivos nos quais a liberação ocorre apenas por difusão, são preparados utilizando-se polímero ou mistura de polímeros insolúveis em água e não-biodegradáveis (Addy *et al.*, 1982; Goodson *et al.*, 1983; Friedman, Golomb, 1982). Por outro lado, os dispositivos matriciais em que a liberação do fármaco ocorre por difusão e erosão ou disso-

lução da matriz são compostos por polímeros hidrossolúveis ou biodegradáveis (Medlicott *et al.*, 1994).

Quanto à forma, além dos tubos ocos de acetato de celulose, também chamados de fibras, os SLIBP podem ser classificados em filmes, dispositivos injetáveis e híbridos (Medlicott *et al.*, 1994; Soskolone, Freidman, 1996).

Fibras

Fibras são dispositivos semelhantes a uma linha e foram introduzidas por Goodson *et al.* (1979), com a utilização de tubos de diálise para a liberação de tetraciclina no interior da bolsa periodontal. Apesar do sistema demonstrar efeitos clínicos importantes (Lindhe *et al.*, 1979), não prolongava os níveis terapêuticos do fármaco pelo tempo suficiente para ser útil clinicamente (Goodson *et al.*, 1985). Estudos similares utilizando fibras para a liberação de gluconato de clorexidina (Coventry, Newman, 1982) e de metronidazol (Wan Yusof *et al.*, 1984) resultaram em conclusões similares.

Por outro lado, fibras de silicone contendo metronidazol foram eficazes, prolongando a liberação do fármaco intrabolsa periodontal por mais de dez dias (Feres Filho *et al.*, 1990).

Vários outros estudos foram realizados (Goodson *et al.*, 1979; 1985; Lindhe *et al.*, 1979; Coventry, Newman, 1982; Wan Yusof *et al.*, 1984), os quais demonstraram a eficiência das fibras em reduzir a profundidade das bolsas periodontais e o sangramento, com um significativo aumento do nível de adesão do epitélio (Newman *et al.*, 1984; Tonetti *et al.*, 1990). Estes levaram ao desenvolvimento de um sistema de liberação disponível comercialmente (Actisite®, Alza Corporation), baseado em uma fibra monolítica de acetato de etilenovinila para a liberação de tetraciclina (Soskolone, Freidman, 1996). A fibra é inserida ao redor da circunferência do dente, aprofundando-a na bolsa periodontal (fundo), através de várias voltas para preencher completamente a bolsa. Trata-se de um processo demorado (7 a 10 minutos por dente), necessitando de artifícios, como a cola de cianoacrilato, para reter o dispositivo dentro da bolsa pelo período do tratamento.

Por não serem biodegradáveis, estas fibras possuem como desvantagem a necessidade de, pelo menos, duas visitas ao dentista, uma para inserção e outra para a remoção do dispositivo (Soskolone, Freidman, 1996; Minabe *et al.*, 2000). No entanto, nos últimos anos a utilização de fibras tem sido alvo de estudos. Ahuja *et al.* (2003) prepararam fibras de acetato de etilenovinila carregadas com amoxicilina trihidratada utilizando a técnica de *melt spinning*.

Essas foram efetivas no controle de liberação de amoxicilina. Fibras carregadas com tetraciclina foram avaliadas clinicamente, demonstrando o melhor desempenho da resposta clínica à raspagem e aplainamento radicular em pacientes com periodontite agressiva (Friesen *et al.*, 2002; Sakellari *et al.*, 2003; Aimetti *et al.*, 2004).

Filmes

A forma farmacêutica mais utilizada para os sistemas de liberação intrabolsa é a de filme, que possui propriedades físicas vantajosas para a utilização no interior da bolsa periodontal (Soskolone, Freidman, 1996):

- a dimensão e formato podem ser facilmente controlados para corresponderem às dimensões da bolsa a ser tratada;
- pode ser inserido rapidamente na bolsa com o mínimo desconforto ao paciente;
- pode ser inserido na base da bolsa, ficando totalmente submerso;
- se a espessura do filme não exceder 400 µm, e se possuir adesividade suficiente, ele permanecerá submerso, não interferindo nos hábitos alimentares e de higiene oral do paciente.

Os filmes podem ser constituídos por polímeros biodegradáveis ou não.

Filmes não-biodegradáveis

Um estudo comparativo entre filme de polietilmetacrilato, um polímero não-biodegradável, e tubos de diálise foi realizado, usando como agentes ativos clorexidina, metronidazol e tetraciclina (Addy *et al.*, 1982). As investigações foram conduzidas tanto *in vitro* como *in vivo*. Os filmes foram obtidos por moldagem sob alta pressão e cortados em tamanhos adequados. Várias quantidades de agentes ativos foram acrescentadas ao filme de polietilmetacrilato, enquanto que os tubos de diálise foram preenchidos apenas com clorexidina. Nos ensaios *in vitro*, cada filme de acrílico e cada tubo de diálise foram colocados, separadamente, em tubos de ensaio, ficando imersos em 1 mL de água destilada, sendo incubados a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, o dispositivo era transferido para um novo tubo com o mesmo volume de água destilada (1 mL), o qual era novamente incubado. O fármaco liberado foi quantificado por espectrofotometria na região do ultravioleta. Esse protocolo foi repetido diariamente durante 14 dias. No estudo *in vivo*, os dispositivos foram inseridos em bolsas periodontais

selecionadas de 4 voluntários portadores de periodontite avançada, retirados a cada 5 dias e colocados em placas de ágar-sangue semeado com amostras do biofilme subgengival coletado dos próprios pacientes no início do tratamento, para verificação do halo de inibição. Concluíram que os tubos de diálise liberavam muito rapidamente o fármaco e que as tiras de acrílico, com 30, 40 e 50% de fármaco, são mais indicadas para esse tipo de tratamento produzindo halos de inibição e liberação por 14 dias.

Investigações clínicas e microbiológicas de filmes contendo 30% (p/p) de fármaco demonstraram que os filmes com metronidazol eram mais efetivos (Yeung *et al.*, 1983; Addy, Langeroudi, 1984; Addy *et al.*, 1988). Essas evidências foram confirmadas por Newman *et al.* (1984), mas esse sistema não foi desenvolvido para a utilização clínica (Soskolone, Freidman, 1996).

Posteriormente, Friedman e Golomb (1982) avaliaram filmes de etilcelulose quanto à capacidade de liberação lenta de clorexidina. Os filmes de etilcelulose foram obtidos por evaporação do solvente, sem e com polietilenoglicol, utilizando-se clorofórmio ou etanol, acrescentados lentamente ao polímero e agitando até sua completa dissolução, quando então era acrescentada a clorexidina. Para se avaliar a liberação do fármaco, os filmes foram cortados em pequenos círculos, presos a uma película de parafina e colocados em um reservatório com um volume pré-determinado de água, aquecida a 37 °C. Periodicamente a solução era substituída e a quantidade de clorexidina liberada foi determinada por espectrofotometria na região do ultravioleta. Em 205 dias, os dispositivos contendo 5, 10 e 20% de clorexidina liberaram, 20, 30 e 60% da carga, respectivamente. No entanto nas membranas contendo aditivos, a maior parte de fármaco liberado (95%) ocorreu nos primeiros 10 dias. Portanto, a adição de polietilenoglicol, etanol ou clorofórmio à etilcelulose provocou aumento na porosidade da matriz e na liberação de clorexidina. Os autores concluíram que o dispositivo poderia ser útil no controle do biofilme, forrando bases de próteses e aparelhos ortodônticos removíveis. Outra utilidade seria liberação do medicamento dentro de bolsas periodontais.

Filmes contendo clorexidina (Friedman, Golomb, 1982; Stabholz *et al.*, 1986; 1991), metronidazol (Golomb *et al.*, 1984), minociclina (Elkayan *et al.*, 1988) e tetraciclina (Stabholz *et al.*, 1989) foram desenvolvidos e testados. A liberação do agente terapêutico a partir desses filmes foi dependente do solvente utilizado, da presença de plastificante, da natureza e concentração de fármaco e das dimensões físicas do filme.

Filmes biodegradáveis

Vários dispositivos na forma de filmes, preparados a base de polímeros biodegradáveis, têm sido avaliados experimentalmente (Soskolone, Freidman, 1996). Dispositivos reabsorvíveis de hidroxietilpropilcelulose para a liberação de tetraciclina e clorexidina (Noguchi *et al.*, 1984) e de ofloxacino (Higashi *et al.*, 1990; Kimura *et al.*, 1991) foram testados clinicamente, obtendo-se bons resultados.

Noguchi *et al.* (1984) foram os primeiros a desenvolver um SLIBP biodegradável. Utilizando-se filmes de hidroxipropilcelulose, eles conseguiram liberação rápida *in vitro* dos fármacos (2 horas), com máximo de dissolução do filme em três horas. *In vivo*, observou-se retenção de tetraciclina nas bolsas por período de 24 horas. Modificando os sistemas, através da incorporação de partículas levemente solúveis de copolímero do ácido metacrílico no filme de hidroxipropilcelulose, a liberação do ofloxacino foi prolongada, com liberação *in vitro* de 70% do mesmo em oito horas. *In vivo*, níveis acima de 2 µg/mL de ofloxacino foram mantidos por sete dias depois do tratamento com o dispositivo. Duas aplicações semanais desse dispositivo resultaram em reduções significativas no número de espiroquetas e organismos com motilidade na bolsa periodontal, quando comparado ao placebo. Um novo tratamento dessas mesmas bolsas com os filmes após procedimento clínico demonstrou maior redução na flora microbiana, mas as alterações não foram significativamente diferentes do controle.

Deasy *et al.* (1989), usando filmes biodegradáveis à base de ácido polidroxibutírico contendo tetraciclina ou metronidazol, demonstraram, *in vitro*, que aumentando a concentração do fármaco no dispositivo, ocorre aumento proporcional do fármaco liberado, sendo que a tetraciclina foi liberada mais lentamente que o metronidazol. Após os primeiros 5 dias, os filmes tornaram-se bastante frágeis. *In vivo*, o índice de placa, a inflamação e a profundidade de sondagem diminuíram em todos os grupos tratados. Entretanto, houve tendência à recidiva após aproximadamente dois meses do término do tratamento. Nas bolsas tratadas com metronidazol, o número de espiroquetas se manteve baixo por mais tempo que o grupo tratado com aplainamento radicular. Os autores concluíram que o tratamento com dispositivos de liberação lenta, usando tetraciclina ou metronidazol, se mostrou efetivo como coadjuvante no tratamento das periodontites e que, no futuro, poderão ser utilizados rotineiramente pelos dentistas.

A partir desse momento, vários polímeros biodegradáveis começaram a ser testados como filmes para a

QUADRO 1- Filmes biodegradáveis estudados para a utilização com sistemas intrabolsa na doença periodontal

Material	Fármaco	Referência
Poli(ε-caprolactona)	Clorexidina	Goodson <i>et al.</i> , 1983; Dunn, Perkins, Goodson, 1983
Hidrolisado de gelatina de origem bovina (proteína Byco) reticulada com formaldeído (Periochip®)	Clorexidina	Steinberg <i>et al.</i> , 1990; Soskolone <i>et al.</i> , 1998
Atelocolágeno	Tetraciclina	Minabe <i>et al.</i> , 1989a,b,c
Poli(ε-caprolactona)	Clorexidina	Medlicott <i>et al.</i> , 1992
Teflon	Clorexidina	Kozlovsky <i>et al.</i> , 1992
Colágeno	Metronidazol	Hitzig <i>et al.</i> , 1994
Teflon	Cloreto de cetilpiridínio	Kozlovsky <i>et al.</i> , 1994
Poli(ε-caprolactona) e segmentos éter-amida	Metronidazol	Quaglia <i>et al.</i> , 2002

liberação prolongada de fármaco na bolsa periodontal (Quadro 1).

Sistemas injetáveis

A possibilidade de injeção de um SLIBP é muito vantajosa (Soskolone, Freidman, 1996). Trata-se de um procedimento relativamente simples com pouco ou nenhum desconforto associado com a inserção da forma farmacêutica (Needleman, 1991). A natureza fluida inicial das formulações, a qual é necessária para a sua utilização com uma seringa, permite que a formulação tenha acesso a toda região no interior da bolsa. Para ser retida na bolsa, a formulação deve sofrer um aumento de viscosidade, evitando que a mesma seja lavada pelo fluxo do fluido crevicular gengival e pela saliva (Medlicott *et al.*, 1994).

Pomadas

As primeiras investigações realizadas na tentativa de desenvolvimento de um SLIBP utilizavam pomadas lipofílicas, principalmente de vaselina, contendo tetraciclina (Eckles *et al.*, 1990) ou minociclina (Nakagawa *et al.*, 1991; Van Steenberghe, *et al.*, 1993). Os resultados constataram diminuição significativa na proporção do número de microrganismos periodontopatogênicos, da profundidade das bolsas e uma vantajosa associação do dispositivo aos procedimentos clínicos de limpeza e aplainamento radicular.

No entanto, as pomadas mostraram propriedades de liberação prolongada de fármaco (Soskolone, Freidman, 1996). Roskos *et al.* (1995) desenvolveram um gel

hidrofóbico, passível de bioabsorção (poli orto-éster), enriquecido com 0,5% de hidróxido de magnésio para retardar a liberação do fármaco tetraciclina. O início da liberação *in vitro* ocorreu após 24 horas e a adição de hidróxido de magnésio prolongou o tempo de liberação, melhorando o desempenho do produto para uso clínico, tendo sido considerado um dispositivo promissor.

Géis hidrofílicos

O mesmo problema de liberação rápida do fármaco foi citado para os dispositivos na forma de géis hidrofílicos (Needleman, 1991). Apesar disso, o número de investigações utilizando esse tipo de dispositivo cresceu rapidamente (Quadro 2).

Precursores de fase cristalina líquida

Quando o sistema é facilmente aplicado no interior da bolsa periodontal, adere à mucosa e, ao entrar em contato com o fluido crevicular ou saliva, se transforma em um estado cristalino líquido (consistência semi-sólida), esses sistemas são denominados de precursores de fase cristalina líquida. Este sistema foi muito estudado e está disponível comercialmente no mercado mundial sob o nome de Elyzol® (Dumex, Copenhagen, Dinamarca) (Dumex, 2003). A concentração de benzoato de metronidazol na formulação é de 40% (p/p), equivalente a 25% de metronidazol. A solubilidade do fármaco e sua concentração influenciam o perfil de liberação. Concentrações de 103 a 1297 µg/mL de metronidazol foram observadas em bolsas inflamadas tratadas com este dispositivo, com do-

QUADRO 2- Géis hidrofílicos estudados para a utilização como SLIBP na doença periodontal

Material	Fármaco	Referência
Ácido poli(D,L-lático-co-glicólico)	Tetraciclina	Maze <i>et al.</i> , 1996
Poloxamer 407 com polivinilpirrolidona, metilcelulose ou hidroxipropilmetil celulose	Melanotan-1®	Bhardwaj, Blanchard, 1996
Poloxamer	Tetraciclina	Esposito <i>et al.</i> , 1996
Hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e policarbofil	Tetraciclina	Jones <i>et al.</i> , 1996
Hidroxietilcelulose e Carbopol®	Metronidazol	Jones <i>et al.</i> , 1997
Alcool polivinílico	Metronidazol	Mallapragada <i>et al.</i> , 1997
Copolímero bioerodível	Tetraciclina	Needleman <i>et al.</i> , 1998
Gelatina, ácido poliglutâmico e uréia	-	Otani <i>et al.</i> , 1998
Poloxamer, hidroxipropilmetil celulose, carboximetilcelulose ou dextrano	Lidocaina ou ibuprofeno	Paavola <i>et al.</i> , 1998
Hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e policarbofil	Flurbiprofeno	Jones <i>et al.</i> , 1999
Poloxamer 188 e 407	Prilocaina e lidocaina	Scherlund <i>et al.</i> , 2000
Hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e policarbofil	Tetraciclina	Jones <i>et al.</i> , 2000, 2001
Ácido poli(D,L-lático-co-glicólico), etilcelulose, carboximetilcelulose, carbopol 971®, nitrato de prata e amido de milho	Benzilpenicilina, tetraciclina, sulfadiazina de prata	Bromberg <i>et al.</i> , 2001
Colágeno	Clorexidina	Vinholis <i>et al.</i> , 2001
Hidroxipropilmetilcelulose, Carbopol 940®, Carbopol 971®, policarbofil, hidroxipropilmetilcelulose K4M e K15M	Metronidazol	Perioli <i>et al.</i> , 2004
Gel livre de amina	Doxiciclina	Kim <i>et al.</i> , 2002
Poli (orto éster)	Tetraciclina	Schwach-Abdellaoui <i>et al.</i> , 2002
Poloxamer 407	Tetraciclina	Kelly <i>et al.</i> , 2004

ses efetivas sendo mantidas por 24 a 36 horas (Stoltze, 1992). Níveis sistêmicos de metronidazol entre 0,2 e 1,3 µg/mL foram observados depois da administração de 29 a 103 mg equivalentes de metronidazol (Stoltze, Stellfeld, 1992), concluindo-se que o sistema aplicado localmente atingiu altas concentrações nas bolsas periodontais e foi significativamente menos tóxico quando comparado à via sistêmica. A terapia recomendada é de duas aplicações em cada bolsa, com intervalo de uma semana (Klinge *et al.*, 1992). Estudos clínicos compararam essa abordagem terapêutica isoladamente e com a raspagem e aplainamento radicular, indicando que esse dispositivo com metronidazol resultou na redução da profundidade da bolsa e do sangramento na sondagem, o que não foi significativamente diferente dos resultados obtidos apenas com a limpeza e aplainamento radicular (Pedrazzoli *et al.*, 1992; Ainamo *et al.*, 1992).

Os efeitos dos usos sistêmico (Flagyl®) e local (Elyzol®) de metronidazol foram comparados (Noyan *et al.*,

1997). Pacientes foram tratados com o desbridamento mecânico associado ou não com quimioterápico, por 10 dias e posteriormente monitorados por 42 dias. Todas as modalidades de tratamento apresentaram melhora clínica e redução do número de bactérias anaeróbias. Entretanto, o grupo tratado com desbridamento associado ao dispositivo de liberação prolongada mostrou-se mais prático e com menos efeitos colaterais, portanto, mais efetivo. Assim, os autores recomendaram para o tratamento de bolsas periodontais profundas o desbridamento mecânico seguido de antibioticoterapia com Elyzol®.

O comportamento clínico e a reinfestação microbológica em pacientes tratados com raspagem subgingival isolada ou associada à aplicação de Elyzol® também foi avaliada (Stelzel, Fiores-de-Jacoby, 1997). Os resultados demonstraram redução significativa dos microrganismos anaeróbios, principalmente no grupo tratado com antibiótico, melhora clínica e diminuição da profundidade da bolsa, durante os 24 meses de acompanhamento. O tratamen-

to associado com antibiótico apresentou melhora mais rápida. Contudo, as duas modalidades de tratamento, quando bem realizadas, podem oferecer bons resultados, pois em longo prazo, não houve diferenças significativas entre os grupos tratados. Outros autores também concluíram que a utilização de tetraciclina ou metronidazol aplicados através do precursor de fase cristalina líquida, quando associados à raspagem e alisamento radicular, pode ser de grande valia na terapia periodontal (Awartani, Zulqarnain, 1998; Lie *et al.*, 1998).

Norling *et al.* (1992) desenvolveram um sistema de liberação prolongada desse tipo contendo metronidazol. Trata-se de um sistema líquido composto por mistura de monoleato de glicerina e benzoato de metronidazol isenta de água, na qual um triglicerídeo, óleo de sésamo (gergelim), foi adicionado para diminuir o ponto de fusão, melhorando as características de fluxo do sistema na seringa.

Híbridos

Esses sistemas combinam as propriedades de mais de uma classe de dispositivos (Needleman, 1991). Dessa maneira, há o potencial de se poderem selecionar as características de diferentes grupos, combinando-os dentro de um único sistema.

Partículas poliméricas de copolímeros do ácido láctico e ácido glicólico, de aproximadamente 0,2 mm de diâmetro, foram preparadas para a liberação de tetraciclina e de minociclina intrabolsa (Medlicott *et al.*, 1994; Vandekerckhove *et al.*, 1998). As microcápsulas contendo tetraciclina foram suspensas em um gel termossensível de poloxamer 407, o qual gelifica à temperatura corporal retendo as microcápsulas na bolsa periodontal durante todo o período de tratamento. Em animais, foi observado que o sistema manteve a concentração de tetraciclina no fluido crevicular gengival por 3 a 4 dias. Em contraste, microcápsulas de minociclina no estado seco foram administradas em bolsas periodontais de cães beagle, demonstrando que concentração efetiva de minociclina foi mantida por quatorze dias (Medlicott *et al.*, 1994).

UTILIZAÇÃO DE SISTEMAS BIOADESIVOS

Os SLIBP podem ser bioadesivos, os quais interagem com a mucina que reveste o epitélio ou a superfície dos dentes pelos princípios da bio/mucoadesão, prolongando o tempo de retenção da formulação dentro da bolsa (Jones *et al.*, 2000). Além disso, podem promover um íntimo contato entre a forma farmacêutica e o tecido de absorção, o qual resulta em alta concentração em uma

área localizada e também, um alto fluxo de fármaco (Guo, Cooklock, 1996; Ahuja, Khar, Ali, 1997).

Os atributos desejáveis para um sistema adesivo oral para a liberação prolongada são a alta capacidade de carregamento com fármaco, boa mucoadesão, não ser irritante, ser confortável, sem sabor ou de sabor agradável e liberar o fármaco por um tempo prolongado (Martin *et al.*, 2003). Nos anos recentes, foram sugeridas formas farmacêuticas mucoadesivas para liberação oral, tais como comprimidos, *patches* e sistemas semi-sólidos. Dentre elas, alguns SLIBP foram investigados.

Patches bioadesivos envolvem os sistemas mais simples como os filmes erodíveis e não-erodíveis e os mais sofisticados, que são projetados para proporcionar liberação unidirecional ou bidirecional de fármaco (Degrande *et al.*, 1996; Guo, Cremer, 1999; Peh, Wong, 1999; Fowler *et al.*, 2001). No entanto, os *patches* mais sofisticados não são adequados para a liberação de agentes ativos no interior da bolsa periodontal. A utilização de polímeros não-biodegradáveis implica a necessidade de remoção ao final da terapia, a baixa flexibilidade e elasticidade, reações imunológicas potenciais, sensibilização de tecido e dificuldade de aplicação na bolsa limitam o emprego dos mesmos (Jones *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1999). Assim, os filmes poliméricos mucoadesivos têm sido mais estudados (Friedman, Golomb, 1982; Minabe *et al.*, 1989a,b,c; Steinberg *et al.*, 1990; Jones; Medlicott, 1995; Matsuda *et al.*, 1999; Peh; Wong, 1999).

Os sistemas semi-sólidos bioadesivos baseados em hidrogéis também são formas farmacêuticas altamente atrativas para a liberação intrabolsa, com a possibilidade de prolongar o tempo de residência do dispositivo e melhorar a biodisponibilidade (Chidambaram, Srivatsava, 1995; Jones *et al.*, 1996). Vários materiais têm sido utilizados no desenvolvimento desses sistemas, tais como hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona e policarbofil (Jones *et al.*, 1996, 1999, 2000); carboximetilcelulose, metilcelulose, hidroxietilcelulose, polivinilpirrolidona, Carbopol® (Varshosaz *et al.*, 2002) e quitosana (Ikinci *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2004). Lipossomas preparados com fosfatidilcolina de ovo, colesterol e estearoilamina foram revestidos com lectina (Concavalina-A) (Vyas *et al.*, 2001). Esses lipossomas mantiveram a afinidade e a especificidade da lectina, possibilitando ação sítio-específica para o glicocálix do biofilme bacteriano.

A principal propriedade da bioadesão é a força de adesão da forma farmacêutica ao tecido biológico (Wong, 1999). Assim, vários métodos têm sido reportados na literatura para avaliar a mucoadesão na cavidade oral, estudar seus mecanismos, além de assegurar a compatibilidade,

estabilidade física e força bioadesiva, durante o desenvolvimento dos sistemas (Bouckaert, 1993).

Um polímero bioadesivo ideal para um SLIBP deve possuir as seguintes características:

- o polímero e seus produtos de degradação devem ser atóxicos e não-absorvíveis através do tecido da bolsa;
- não deve ser irritante ou causar inflamação;
- preferencialmente formar ligação não-covalente com a mucina das superfícies epiteliais;
- deve aderir rapidamente no tecido úmido e possuir alguma especificidade local;
- deve permitir a fácil incorporação do fármaco e não oferecer impedimento à sua liberação;
- deve permitir a flexibilidade da forma farmacêutica, facilitando a inserção na bolsa com o menor desconforto possível;
- deve ser estável durante o seu tempo de estocagem ou da forma farmacêutica;
- o custo do polímero não deve ser alto, permitindo a produção de dispositivos viáveis economicamente.

Além disso, muitos polímeros mucoadesivos são capazes de inibir enzimas proteolíticas e/ou modular a permeabilidade tecidual (Lehr, 1996), podendo ser úteis no desenvolvimento de novos SLIBP.

AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

Existem vários protocolos que têm sido empregados na avaliação da efetividade da terapia periodontal com SLIBP. Geralmente, os efeitos dos tratamentos são avaliados pela melhora clínica e alterações da microflora subgingival (Medlicott *et al.*, 1994). A melhora clínica é avaliada por índices que refletem o grau de inflamação e de acúmulo de placas, tais como o índice de placa, índice gengival, grau de hemorragia à sondagem, profundidade da bolsa, medida do nível de adesão do epitélio juncional, medida da taxa de fluido crevicular (Seymour, Heasman, 1992). Outra avaliação importante é a microbiológica, que envolve a determinação das alterações na microflora subgingival. As bactérias coletadas são identificadas ou classificadas de acordo com sua morfologia, coloração Gram, motilidade e requerimentos de oxigênio. As proporções são calculadas para cada espécie ou grupo e alterações de populações patogênicas para não-patogênicas são observadas durante o tratamento (Medlicott *et al.*, 1994).

Assim, o fluido crevicular gengival possui grande importância na avaliação clínica da doença periodontal e da efetividade dos sistemas de liberação de fármaco intrabolsa. Goodson (1989) calculou a taxa de renovação do fluido gengival em 40 vezes por hora e sugeriu que esta

contribui para a rápida diminuição da quantidade de agente antibacteriano e pequena duração de ação do mesmo observada com o tratamento por irrigação.

A análise da concentração de fármaco no fluido crevicular gengival é o melhor método para se determinar a efetividade de um sistema de liberação. O maior problema tem sido o desenvolvimento de ensaios com limite de detecção que permita a quantificação de agentes antibacterianos presentes em volumes pequenos (0,5 µL) de fluido crevicular gengival (Medlicott *et al.*, 1994). Assim, vários autores têm desenvolvido ensaios microbiológicos (Gordon *et al.*, 1980; Goodson *et al.*, 1983; Freeman *et al.*, 1992; Higashi *et al.*, 1991; Notten *et al.*, 1982) e de cromatografia líquida de alta eficiência (Holborow *et al.*, 1988; Higashi *et al.*, 1989; Britt, Pohlod, 1986; Stoltze, 1992) para quantificação de alguns agentes terapêuticos liberados no fluido crevicular gengival a partir de SLIBP.

CONCLUSÕES

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos ou o aprimoramento dos já existentes é um dos desafios do século, em especial, aqueles destinados ao tratamento da bolsa periodontal devido às restrições impostas pela anatomofisiologia do local e a dificuldade da avaliação precisa de sua eficácia. Neste contexto, os filmes flexíveis e as preparações semi-sólidas bioadesivas, compostas por polímeros biodegradáveis, apresentam maior potencial de eficácia e aplicação prática.

ABSTRACT

Periodontal pocket drug delivery systems

Periodontal disease is very common in the world population. It is caused by the accumulation of microbial components of the dental biofilm inside the subgingival areas, producing an inflammatory process that affects the supporting structures of tooth, periodontal pockets and loss of the teeth, if not treated. The conventional treatment consists of tooth surface mechanical cleaning and root planning, associated or not to the systemic use of high concentrations of antibiotics, but with reduced effectiveness, and adverse effects. The patient compliance to the therapeutic is committed too. In the last decades, the treatment has been optimized for the use of drug delivery systems to the periodontal pocket, with the advantage of delivering the drug in the specific site, sustaining and/or controlling the drug concentration. Recently, the use of new drug delivery systems has been receiving great interest. This review approaches the main

delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket, their usefulness, as well as the available protocols for the evaluation of these systems effectiveness in the periodontal therapy.

UNITERMS: Periodontal diseases. Periodontal pocket. Delivery systems. Periodontal pocket delivery.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDY, M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J. Clin. Periodontol.*, v. 13, p. 957-964, 1986.
- ADDY, M.; HASSAN, H.; MORAN, J.; WADE, W.; NEWCOMBERT, R. Use of antimicrobial containing acrylic strips in the treatment of chronic periodontal disease. *J. Periodontol.*, v. 59, n. 9, p. 557-564, 1988.
- ADDY, M.; LANGEROUDI, M. Comparison of the immediate effects on the subgingival microflora of acrylic strips containing 40% chlorhexidine, metronidazole or tetracycline. *J. Clin. Periodontol.*, v. 11, n. 6, p. 379-386, 1984.
- ADDY, M.; RAWLE, L.; HANDLEY, R.; NEWMAN, H. N.; COVENTRY, J. F. The development and *in vitro* evaluation of acrylic strips and dialysis tubing for local drug delivery. *J. Periodontol.*, v. 53, n. 11, p. 693-699, 1982.
- AHUJA, A.; ALI, J.; SARKAR, R.; SHAREEF, A.; KHAR, R. K. Targeted retentive device for oro-dental infections: formulation and development. *Int. J. Pharm.*, v. 259, p. 47-55, 2003.
- AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 23, n. 5, p. 489-515, 1997.
- AIMETTI, M.; ROMANO, F.; TORTA, I.; CIRILLO, D.; CAPOSIO, P.; ROMAGNOLI, R. Debridement and local application of tetracycline-loaded fibres in the management of persistent periodontitis: results after 12 months. *J. Clin. Periodontol.*, v. 31, p. 166-172, 2004.
- AINAMO, J.; LIE, T.; ELLINGSEN, B. H.; HANSEN, B. F.; JOHANSSON, L. A.; KARRING, T.; KISCH, J.; PAUNIO, K.; STOLTZ, K. Clinical responses to subgingival application of a metronidazole 25% gel compared to the effect of subgingival scaling in adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 19, n. 9, p. 723-729, 1992.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568p.
- AWARTANI, F. A.; ZULQARNAIN, B. J. Comparison of the clinical effects of subgingival application of metronidazole 25% gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. *Periodontics*, v. 29, p. 41-48, 1998.
- BAAKILINI, M. F.; LARA, E. H. G.; PANZERI, H. Adición de própolis en formulaciones de dentífricos. Evaluación de sus propiedades y estabilidad. *Rev.Fola/Oral*, n. 6, p. 130-132, 1996.
- BADERSTEN, A. NILVÉUS, R.; EGELBERG, J. Effect of nonsurgical periodontal therapy I. Moderately advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 8, p. 57-72, 1981.
- BHARDWAJ, R.; BLANCHARD, J. Controlled-release delivery system for the α -MSH analog melanotan-I using poloxamer 407. *J. Pharm. Sci.*, v. 85, n. 9, p. 915-919, 1996.
- BOLSTAD, A. I.; JENSEN, H. B.; BAKKEN, V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 9, n. 1, p. 55-71, 1996.
- BOUCKAERT, S.; LEFEBVRE, R. A.; REMON, J. P. In vitro/in vivo correlation of the bioadhesive properties of a buccal bioadhesive miconazole slow-release tablet. *Pharm. Res.*, v. 10, n. 6, p. 853-856, 1993.
- BRITT, M. R.; POHLOD, D. J. Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. *J. Periodontol.*, v. 57, p. 104-107, 1986.
- BROMBERG, L. E.; BUXTON, D. K.; FRIDEN, P. M. Novel periodontal drug delivery system for treatment of periodontitis. *J. Control. Rel.*, v. 71, p. 251-259, 2001.

- BROOK, I. M.; VAN NOORT, R. Controlled delivery of drugs. *Br. Dent. J.*, v. 157, n. 11, p. 11-15, 1984.
- CHIDAMBARAM, N.; SRIVATSAVA, A. K. Buccal drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 21, n. 9, p. 1009-1036, 1995.
- CIANCIO, S.G. Medication as risk factors for periodontal disease. *J. Periodontol.*, v. 67, n. 10S, p. 1055-1059, 1996.
- COVENTRY, J.; NEWMAN, H. N. Experimental use of a slow release device employing chlorhexidine gluconate in areas of acute periodontal inflammation. *J. Clin. Periodontol.*, v. 9, n. 2, p. 129-133, 1982.
- DEASY, P. B.; COLLINS, A. E. M.; MACCARTHY, D. J.; RUSSEL, R. J. Use of strips containing tetracycline hydrochloride or metronidazole for treatment of advanced periodontal disease. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 41, n. 10, p. 694-699, 1989.
- DEGRANDE, G.; BENES, L.; HORRIÈRE, F.; KARSENTY, H.; LACOSTE, C.; MCQUINN, R.; GUO, J. H.; SCHERRER, R. Specialized oral mucosal drug delivery systems: patches. In: RATHBONE, M. J. (Ed.). *Oral mucosal drug delivery*. New York: Marcel Dekker, 1996, v. 74, p. 285-317.
- DUMEX ORAL HEALTH CARE. *Elyzol dental gel*. 2003. 48 p. Monografia internacional de produto - Dumex, ALPHARMA.
- DUNN, R. L.; PERKINS, B. H.; GOODSON, J. M. Controlled release of tetracycline from biodegradable fibres. *J. Dent. Res.*, v. 62, p. 289, 1983.
- ECKLES, T. A.; REINHARDT, R. A.; DYER, J. K.; TUSSING, G. J.; SZYDLOWSKI, W. M.; DUBOIS, L. M. Intracrevicular application of tetracycline in white petrolatum for the treatment of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 17, n. 7, p. 454-462, 1990.
- ELEY, B. M. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque - a review. *Br. Dent. J.*, v. 186, p. 286-296, 1999.
- ELKAYAM, R.; FRIEDMAN, M.; STABHOLZ, A.; SOSKOLNE, A. W.; SELA, M. N.; GOLUB, L. Sustained release device containing minocycline for local treatment of periodontal disease. *J. Control. Rel.*, v. 7, p. 231-236, 1988.
- ERHART, E. A. *Elementos de anatomia humana*. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 1987. 272p.
- ESPOSITO, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and bio-pharmaceutical properties. *Biomaterials*, v. 17, p. 2009-2020, 1996.
- FERES FILHO, E. J.; CHEVITARESE, O.; ZEBRAL, A. A.; VILLORIA, G. E. Desenvolvimento de um dispositivo de liberação prolongada contendo metronidazol para terapia periodontal tópica. *RBO*, v. XLVII, n. 2, p. 44-45, 1990.
- FOWLER, E. B.; BREAU, L. G.; BRYANT, J. B. Site-specific chlorhexidine: a periodontal alternative. *Gen. Dent.*, v. 49, n. 1, p. 84-88, 2001.
- FRANK, R. M. Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J. Periodontal Res.*, v. 15, n. 6, p. 563-573, 1980.
- FREEMAN, E.; ELLEN, R. P.; THOMPSON, G.; WEINBERG, S. E.; SONG, M.; LAZARUS, R. H. Gingival crevicular fluid concentration and side effects of minocycline: a comparison of two regimens. *J. Periodontol.*, v. 63, p. 13-18, 1992.
- FRIEDMAN, M.; GOLOMB, G. New sustained release dosage form of chlorhexidine for dental use. I- development and kinetics of release. *J. Periodontal Res.*, v. 17, n. 3, p. 323-328, 1982.
- FRIEDMAN, M.; STEINBERG, D. Sustained release delivery systems for treatment of dental diseases. *Pharm. Res.*, v. 7, n. 4, p. 313-317, 1990.
- FRIESEN, L. R.; WILLIAMS, K. B.; KRAUSE, L. S.; KILLOY, W. J. Controlled local delivery of tetracycline with polymer strips in the treatment of periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 73, n. 1, p. 13-19, 2002.
- GABARRA, F. R. *Dispositivo mimetizador de bolsa periodontal para estudos in vitro de liberação de fármaco*. 2002. 197 f. [Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo].
- GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz. J. Microbiol.*, v. 33, p. 365-369, 2002.

- GENCO, R. J. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. *J. Periodontol.*, v. 52, p. 545-558, 1981.
- GIORDANO, J.; LOESCHE, W. J.; WALSH, L.; AMALFITANO, J. Effect of local delivery of metronidazole or chlorhexidine in periodontitis patients. *J. Dent. Res.*, v. 71, p. 319, 1992.
- GOLOMB, G.; FRIEDMAN, M.; SOSKOLONE, W. A.; STABHOLZ, A.; SELA, M. N. Sustained release device containing metronidazole for periodontal use. *J. Dent. Res.*, v. 63, n. 9, p. 1149-1153, 1984.
- GOODSON, J. M. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J. Dent. Res.*, v. 68, p. 1625-1632, 1989.
- GOODSON, J. M.; HAFFAJEE, A.; SOCRANSKY, S. S. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. *J. Clin. Periodontol.*, v. 6, n. 2, p. 83-92, 1979.
- GOODSON, J. M.; HOLBOROW, D.; DUNN, R. L.; HOGAN, P.; DUNHAM, S. Monolithic tetracycline-containing fibres for controlled delivery to periodontal pockets. *J. Periodontol.*, v. 54, p. 575-579, 1983.
- GOODSON, J. M.; OFFENBACHER, S.; FARR, D. H.; HOGAN, P. E. Periodontal disease treatment by local drug delivery. *J. Periodontol.*, v. 56, p. 265-272, 1985.
- GORDON, J. M.; WALKER, C. B.; GOODSON, J. M.; SOCRANSKY, S. S. Sensitive assay for measuring tetracycline levels in gingival crevice fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 17, p. 193-198, 1980.
- GREENSTEIN, G. Clinical significance of bacterial resistance to tetracyclines in the treatment of periodontal diseases. *J. Periodontol.*, v. 66, n. 11, p. 925-932, 1995.
- GREENSTEIN, G. Effects of subgingival irrigation on periodontal status. *J. Periodontol.*, v. 58, p. 827-836, 1987.
- GREENSTEIN, G.; BERMANT, C.; JAFFINT, R. Chlorhexidine, an adjunct to periodontal therapy. *J. Periodontol.*, v. 57, n. 6, p. 370-376, 1986.
- GUO, J. H.; COOKLOCK, K. M. The effects of backing materials and multilayered systems on the characteristics of bioadhesive buccal patches. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 48, p. 255-257, 1996.
- GUO, J. H.; CREMER, K. Development of bioadhesive buccal patches. In: Mathiowitz, E.; Chickering, D. E.; Lehr, C. M. (Ed.), *Bioadhesive drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker, v. 98, p. 541-562, 1999.
- GUYTON, A. C. *Tratado de fisiologia médica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 830p.
- HATTINGH, J.; HO, E. The concentration of proteins in human gingival crevicular fluid. *J. Periodontol. Res.*, v. 15, p. 90-95, 1980.
- HELLDÉN, L. B.; LISTGARTEN, M. A.; LINDHE, J. The effect of tetracycline and/or scaling on human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 6, p. 222-230, 1979.
- HIGASHI, K.; MATSUSHITA, M.; MORISAKI, K.; HAYASHI, S.; MAYUMI, T. Local drug delivery systems for the treatment of periodontal disease. *J. Pharmacobio-Dyn.*, v. 14, p. 72-81, 1991.
- HIGASHI, K.; MORISAKI, K.; HAYASHI, S.; KITAMURA, M.; FUJIMOTO, N.; KIMURA, S.; EBISU, S.; OKADA, H. Local ofloxacin delivery using a controlled-release insert in the human periodontal pocket. *J. Periodontal Res.*, V. 25, n. 1, p. 1-5, 1990.
- HIGASHI, K.; SEIKE, M.; MITANI, Y.; MORISAKI, K.; HAYASHI, S.; KITAMURA, M.; FUJIMOTO, N.; KIMURA, S.; EBISU, S.; OKADA, H. Concentration of ofloxacin in human gingival crevicular fluid after oral administration of Tarivid®. *J. Periodontal Res.*, v. 24, p. 409-411, 1989.
- HIRASAWA, M.; TAKADA, K.; MAKIMURA, M.; OTAKE, S. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. *J. Periodont. Res.*, v. 37, p. 433-438, 2002.
- HITZIG, C.; CHARBIT, Y.; BITTON, C.; FOSSE, T.; TEBOUL, M.; HANNOUN, L.; VARONNE, R. Topical metronidazole as an adjunct to subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 21, p. 146-151, 1994.
- HOLBOROW, D. W. Local delivery of antibacterial agents in the treatment of periodontal disease. *New Zealand Dental J.*, v. 82, p. 119-121, 1986.
- HOLBOROW, D. W.; GAUDIE, W.; HUNG, T.; GOODSON, J. M. Periodontal pocket concentration of tetracycline by local delivery. *J. Dent. Res.*, Abstracts, p. 25, 1988.

- IKINCI, G.; SENEL, S.; AKINCIBAY, H.; KAS, S.; ERCIS, S.; WILSON, C. G.; HINCAL, A. A. Effect of chitosan on a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Int. J. Pharm.*, v. 235, p. 121-127, 2002.
- ITO, I. Y.; ALONSO VERRI, R.; RIBAS, J. P.; MARQUES DE LIMA, S. N.; PALAMIN, R. V.; MAIA CAMPOS, G. Efeitos do cloreto de cetilpiridínio na inibição da placa dental. *Odont. Moderno*, p. 8-23, 1980.
- JONES, A.; WOOD, R.; NEWBOLD, D.; MANWELL, M.; KORMAN, K. Clinical effects of subgingival minocycline in periodontitis. *J. Dent. Res.*, v. 17, p. 245, 1992.
- JONES, D. S.; IRWIN, C. R.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J.; ADAMS, V. Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis. *J. Pharm. Sci.*, v. 88, n. 6, p. 592-598, 1999.
- JONES, D. S.; MEDLICOTT, N. J. Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation. *Int. J. Pharm.*, v. 114, p. 257-261, 1995.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. *Int. J. Pharm.*, v. 151, p. 223-233, 1997.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; BROWN, A. F.; COULTER, W. A.; MCCLELLAND, C.; IRWIN, C. R. Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease. *J. Control. Rel.*, v. 67, p. 357-368, 2000.
- JONES, D. S.; WOOLFSON, A. D.; DJOKIC, J.; COULTER, W. A. Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. *Pharm. Res.*, v. 13, n. 11, p. 1734-1738, 1996.
- JONES, D. S.; BROWN, A. F.; WOOLFSON, A. D. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolids designed for the treatment of periodontal diseases: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. *J. Pharm. Sci.*, v. 90, n. 12, p. 1978-1990, 2001.
- JORGENSEN, M. G.; SLOTS, J. Responsible use of antimicrobials in periodontics. *J. Calif. Dental Assoc.*, p. 1-12, 2000.
- JOYSTON-BECHAL, S.; EMSLIE, R. D. Topical and systemic antimicrobial agents in the treatment of chronic gingivitis and periodontitis. *Int. Dent. J.*, v. 37, p. 52-62, 1987.
- KAPLAN, A. H.; WEBER, D. J.; ODDONE, E. Z.; PERFECT, J. R. Infection due *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: 15 cases and review. *Rev. Infect. Dis.*, v. 11, n. 1, p. 46-63, 1989.
- KELLY, H. M.; DEASY, P. B.; ZIAKA, E.; CLAFFEY, N. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. *Int. J. Pharm.*, v. 274, p. 167-183, 2004.
- KIM, T. S.; BURKLIN, T.; SCHACHER, B.; RATKA-KRUGER, P.; SCHAECKEN, M. T.; RENGGLI, H. H.; FIEHN, W.; EICKHOLZ, P. Pharmacokinetic profile of a locally administered doxycycline gel in crevicular fluid, blood, and saliva. *J. Periodontol.*, v. 73, n. 11, p. 1285-1291, 2002.
- KIMURA, S.; TODA, H.; SHIMABUKURO, Y.; KITAMURA, M.; FUJIMOTO, N.; MIKI, Y.; OKADA, H. Topical chemotherapy in human periodontitis using a new controlled-release insert containing ofloxacin. I. Microbiological observation. *J. Periodontal Res.*, v. 26, n. 1, p. 33-41, 1991.
- KINANE, D. F. Local antimicrobial therapies in periodontal disease. *Ann. R. Australas. Coll. dent. Surg.*, v. 15, p. 57-60, 2000.
- KINANE, D. F.; RADVAR, M. A six-month comparison of three periodontal local antimicrobial therapies in persistent periodontal pockets. *J. Periodontol.*, v. 70, n. 1, p. 1-7, 1999.
- KOO, H.; GOMES, B. P. F. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M. B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch. Oral Biol.*, v. 45, p. 141-148, 2000.
- KOSLOVSKY, A.; SINTOV, A.; MOLDOVAN, M.; TAL, H. Inhibition of plaque formation by local application of a degradable controlled release system containing Cetylpyridinium chloride. *J. Clin. Periodontol.*, v. 21, n. 1, p. 32-37, 1994.

- KOSLOVSKY, A.; SINTOV, A.; ZUBERY, Y.; TAL, H. Inhibition of plaque formation and gingivitis in beagle dogs by topical use of a degradable controlled release system containing chlorhexidine. *J. Dent. Res.*, v. 71, n. 9, p. 1577-1581, 1992.
- LEHR, C. M. From sticky stuff to sweet receptors - achievements, limits and novel approaches to bioadhesion. *European J. Drug Metabol. Pharmacokinetics*, v. 21, n. 2, p. 139-148, 1996.
- LIE, T.; BRUUN, G.; BÖE, E. Effects of topical metronidazole and tetracycline in treatment of adult periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 69, n. 7, p. 819-827, 1998.
- LINDHE, J.; HEIJL, L.; GOODSON, J. M.; SOCRANSKY, S. S. Local delivery using fiber devices in periodontal therapy. *J. Clin. Periodontol.*, v. 6, p. 141-149, 1979.
- LINDHE, J.; NYMAN, S. Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 11, p. 504-514, 1984.
- LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 13, p. 418-425, 1986.
- LOESCHE, W. J. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci. Rev.*, v. 9, p. 65-107, 1976.
- LOESCHE, W. J. Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J. Dent. Res.*, v. 58, n. 12, p. 2404-2412, 1979.
- LOESCHE, W. J.; SYED, S. A.; SCHMIDT, E.; MORRISON, E. C. Bacterial profiles of subgingival plaque in periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 56, p. 447-456, 1985.
- LOPEZ, N. J.; SMITH, P. C.; GUTIERREZ, J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. *J. Periodontol.*, v. 73, n. 8, p. 911-924, 2002.
- MALLAPRAGADA, S. K.; PEPPAS, N. A.; COLOMBO, P. Crystal dissolution-controlled release systems II. Metronidazole release from semicrystalline poly (vinyl alcohol) systems. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 36, n. 1, p. 125-130, 1997.
- MANARA, L. R. B.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W. A. Utilização da própolis em odontologia. *Rev. FOB*, v. 7, n. 3/4, p. 15-20, 1999.
- MARTIN, L.; WILSON, C. G.; KOOSHA, F.; UCHEGBU, I. F. Sustained buccal delivery of the hydrophobic drug denbufylline using physically cross-linked palmitoyl glycol chitosan hydrogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 55, p. 35-45, 2003.
- MATSUDA, S.; IWATA, H.; SE, N.; IKADA, Y. Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 45, p. 20-27, 1999.
- MAZE, G. I.; REINHART, R. A.; PAYNE, J. B.; MAZE, C.; BAKER, R. A.; BOUWSMA, O. J.; DAMANI, N. C.; FITZGERALD, J. H.; HAMLIN, J. C.; GERLACH, R. W. Gingival fluid tetracycline release from bioerodible gels. *J. Clin. Periodontol.*, v. 23, p. 1133-1136, 1996.
- MEDLICOTT, N. J.; JONES, D. S.; TUCKER, I. G.; HOLBOROW, D. W. Preliminary release studies of chlorhexidine (base and diacetate) from poly(μ -caprolactone) films prepared by solvent evaporation. *Int. J. Pharm.*, v. 84, p. 85-89, 1992.
- MEDLICOTT, N. J.; RATHBONE, M. J.; TUCKER, I. G.; HOLBOROW, D. W. Delivery systems for the administration of drugs to the periodontal pocket. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 13, p. 181-203, 1994.
- MINABE, M.; SUZUKI, F.; UMEMOTO, T. Intra-pocket antibiotic therapy using resorbable and non-resorbable slow-release devices containing tetracycline. *Periodontol. Clin. Investig.*, v. 22, n. 1, p. 14-21, 2000.
- MINABE, M.; TAAKEUCHI, K.; TOMOMATSU, E.; HORI, T.; UMEMOTO, T. Clinical effects of local application of collagen film-immobilized tetracycline. *J. Clin. Periodontol.*, v. 16, p. 291-294, 1989a.
- MINABE, M.; TAMURA, T.; HORI, T.; UMEMOTO, T. Subgingival administration of tetracycline on a collagen film. *J. Periodontol.*, v. 60, p. 552-556, 1989b.
- MINABE, M.; UEMATSU, A.; NISHIJIMA, K.; TOMOMATSU, E.; TAMURA, T.; HORI, T.; UMEMOTO, T.; HINO, T. Application of a local drug delivery system to periodontal therapy: I development of collagen preparations with immobilized tetracycline. *J. Periodontol.*, v. 60, n. 2, p. 113-117, 1989c.

- MONBELLI, A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral Dis.*, v. 9, sup. 6, p. 6-10, 2003.
- MURRAY, M. C.; WORTHINGTON, H. V.; BLINKHORN, A. A study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. *J. Clin. Periodontol.*, v. 24, n. 11, p. 796-798, 1997.
- NAKAGAWA, T.; YAMADA, S.; OOSUKA, Y.; SAITO, A.; HOSAKA, Y.; ISHIKAWA, T.; OKUDA, K. Clinical and microbiological study of local minocycline delivery (Periocrine) following scaling and root planning in recurrent periodontal pockets. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, v. 32, n. 2, p. 63-70, 1991.
- NEEDLEMAN, I. G. Controlled drug release in periodontics: a review of new therapies. *Br. Dent. J.*, v. 170, n. 11, p. 405-408, 1991.
- NEEDLEMAN, I. G.; MARTIN, G. P.; SMALES, F. C. Characterization of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J. Clin. Periodontol.*, v. 25, n. 1, p. 74-82, 1998.
- NEWMAN, H. N.; YEUNG, F. I. S.; WAN YUSOF, W. A. Z. B.; ADDY, M. Slow release metronidazole and a simplified mechanical oral hygiene regimen in the control of chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 11, p. 576-582, 1984.
- NEWMAN, M. G. Current concepts of the pathogenesis of periodontal disease – microbiology emphasis. *J. Periodontol.*, v. 56, n. 12, p. 734-739, 1995.
- NOGUCHI, T.; IZUMIZAWA, K.; FUKUDA, M.; KITAMURA, S.; SUZUKI, Y.; IKURA, H. New method for local drug delivery using resorbable base material in periodontal therapy. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, v. 31, p. 145-153, 1984.
- NORKIEWICZ, D. S.; BREAU, L. G.; WONDERLICH, S. T.; MALONE, K. H. The use of chemotherapeutic agents in localized periodontal pockets. *Mil. Med.*, v. 166, n. 11, p. 940-946, 2001.
- NORLING, T.; LADING, P.; ENGSTRÖM, S.; LARSSON, K.; KROG, N.; MISSEN, S. S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 19, p. 687-692, 1992.
- NOTTEN, F.; KOEK-VAN OOSTEN, A.; MIKX, F. Capillary agar diffusion assay for measuring metronidazole in human gingival crevice fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 21, p. 836-837, 1982.
- NOYAN, U.; YILMAZ, S.; KURU, B.; KADIR, T.; ACAR, O.; BUĞET, E. A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, v. 24, n. 3, p. 158-165, 1997.
- OKUDA, K.; WOLFF, L.; OLIVER, R.; OSBORN, J.; STOLTENBERG, J.; BEREUTER, J.; ANDERSON, L.; FOSTER, P.; HARDIE, N.; AEPPLI, D.; HARA, K. Mynocline slow-release formulation effect on subgingival bacteria. *J. Periodontol.*, v. 63, n. 2, p. 73-79, 1992.
- OTANI, Y.; TABATA, Y.; IKADA, Y. Effect of additives on gelation and tissue adhesion of gelatin-poly (L-glutamic acid) mixture. *Biomaterials*, v. 19, p. 2167-2173, 1998.
- PAAVOLA, A.; YLIRUUSI, J.; ROSENBERG, P. Controlled release and dura mater permeability of lidocaine and ibuprofen from injectable poloxamer-based gels. *J. Control. Rel.*, v. 52, p. 169-178, 1998.
- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; ABREU, J. A. S.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.*, v. 36, p. 24-28, 1998.
- PAVIA, M.; NOBILE, C. G.; ANGELILLO, I. F. meta-analysis of local tetracycline in treating chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 74, n. 6, p. 916-932, 2003.
- PAVIA, M.; NOBILE, C. G.; BIANCO, A.; ANGELILLO, I. F. Meta-analysis of local metronidazole in the treatment of chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 45, n. 6, p. 830-838, 2004.
- PEDRAZZOLI, V.; KILIAN, M.; KARRING, T. Comparative clinical and microbiological affects of topical subgingival application of metronidazole 25% dental gel and scaling in the treatment of adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 19, p. 715-722, 1992.
- PEH, K. K.; WONG, C. F. Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, v. 2, n. 2, p. 53-61, 1999.

- PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; RUBINI, D.; GIOVAGNOLI, S.; RICCI, M.; BLASI, P.; ROSSI, C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *J. Control. Rel.*, v. 95, p. 521-533, 2004.
- PITCHER, G. R.; NEWMAN, H. N.; STRAHAN, J. D. Access to subgingival plaque by disclosing agents using mouthrinsing and direct irrigation. *J. Clin. Periodontol.*, v. 7, p. 300-308, 1980.
- QUAGLIA, F.; VIGNOLA, M. C.; DE ROSA, G.; LA ROTONDA, M. I.; MAGLIO, G.; PALUMBO, R. New segmented copolymers containing poly(μ -caprolactone) and etheramide segments for the controlled release of bioactive compounds. *J. Control. Rel.*, v. 83, p. 263-271, 2002.
- QUEE, T. C. The role of systemic antibiotics in periodontal therapy. *J. Can. Dent. Assoc.*, v. 55, n. 12, p. 967-969, 1989.
- RAMFJORD, S. P. maintenance care for treated periodontitis patients. *J. Clin. Periodontol.*, v. 14, p. 433-437, 1987.
- RANADIVE, K. S.; BHAT, K. M. Local antimicrobial delivery in periodontal therapy. *Indian J. Dent. Res.*, v. 9, n. 4, p. 124-130, 1998.
- RETHMAN, J.; RETHMAN, M.; SUZUKI, J. Controlled release periodontal chemotherapy: the evolution of antimicrobial delivery systems. *Pract. Periodontics Aesthet. Dent.*, p. 1-8, supplement, 1995.
- RODRIGUES, R. M. J.; GONÇALVES, C.; SOUTO, R.; FERES-FILHO, E. J.; UZEDA, M.; COLOMBO, A. P. V. Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J. Clin. Periodontol.*, v. 31, p. 420-427, 2004.
- ROSKOS, K. V.; FRITZINGER, B. K.; RAO, S. S.; ARMITAGE, G. C.; HELLER, J. Development of a drug delivery system for the treatment of periodontal disease based on bioerodible poly (ortho esters). *Biomaterials*, v. 16, n. 4, p. 313-317, 1995.
- SAGLIE, R.; NEWMAN, M. G.; CARRANZA JR, F. A.; PATTISON, G. L. Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. *J. Periodontol.*, v. 53, n. 4, p. 217-222, 1982.
- SAKELLARI, D.; VOUIROS, I.; KONSTANTINIDIS, A. The use of tetracycline fibres in the treatment of generalised aggressive periodontitis: clinical and microbiological findings. *J. Int. Acad. periodontol.*, v. 5, n. 2, p. 52-60, 2003.
- SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A. F.; UZEDÂ, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A. Antibacterial activity of propolis produced in Brazil against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* spp. and bacteria from *Bacteroides fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. *Anaerobe*, v. 5, p. 479-481, 1999.
- SASTRAVAHA, G.; YOTNUENGNI, P.; BOONCONG, P.; SANGTHERAPITIKUL, P. Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts. A preliminary study. *J. Int. Acad. periodontol.*, v. 5, n. 4, p. 106-115, 2003.
- SCHERLUND, M.; MALMSTEN, M.; HOLMQVIST, P.; BRODIN, A. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. *Int. J. Pharm.*, v. 194, p. 103-116, 2000.
- SCHWACH-ABDELLAOUI, K.; LOUP, P. J.; VIVIEN-CASTIONI, N.; MONBELLI, A.; BAEHNI, P.; BARR, J.; HELLER, J.; GURNY, R. Bioerodible injectable poly(ortho ester) for tetracycline controlled delivery to periodontal pockets: preliminary trial in humans. *AAPS Pharm. Sci.*, v. 4, n. 4, p. 1-7, 2002.
- SEYMOUR, R. A.; HEASMAN, P. A. *Drugs, diseases, and the periodontium*. New York: Oxford Medical Publications, Oxford University Press, 1992. 206p.
- SLOTS, J. Selective medium of isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 15, n. 4, p. 606-609, 1982.
- SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 6, p. 351-382, 1979.
- SLOTS, J. The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.*, v. 84, n. 1, 1976.
- SOSKOLONE, W. A.; CHAJEK, T.; FLASHNER, M.; LANDAU, I.; STABHOLTZ, A.; KOLATCH, B.; LERNER, E. I. An in vivo study of the chlorhexidine release profile of the PerioChipTM in the gingival crevicular fluid, plasma and urine. *J. Clin. Periodontol.*, v. 25, p. 1017-1021, 1998.

- SOSKOLONE, W. A.; FREIDMAN, M. F. Intra-periodontal pocket drug delivery systems. In: RATHBONE, M. J. (Ed.). *Oral mucosal drug delivery*. New York: Marcel Dekker, 1996. v. 74, p. 359-379.
- STABHOLZ, A.; NICHOLAS, A. A.; ZIMMERMAN, G. J.; WIKESJO, U. M. Clinical and antimicrobial effects of a single episode of subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine in deep periodontal pockets. *J. Clin. Periodontol.*, v. 25, n. 10, p. 794-800, 1998.
- STABHOLZ, A.; SELA, M. N.; FRIEDMAN, M.; GOLOMB, G.; SOSKOLONE, W. A. Clinical and microbiological effects of sustained release chlorhexidine in periodontal pockets. *J. Clin. Periodontol.*, v. 13, n. 8, p. 783-788, 1986.
- STABHOLZ, A.; SOSKOLONE, W. A.; FRIEDMAN, M.; SELA, M. N. The use of sustained release delivery of chlorhexidine for the maintenance of periodontal pockets: 2-year clinical trial. *J. Periodontol.*, v. 62, n. 7, p. 429-433, 1991.
- STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M.; SOSKOLONE, A.; SELA, M. N. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: *in vitro* release study. *J. Periodontol.*, v. 61, n. 7, p. 393-398, 1990.
- STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M. Sustained release drug delivery devices for local treatment of dental diseases. In: TYLE, P. (ed.). *Drug Delivery Devices*. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 491-515.
- STELZEL, M.; FLORES-DE-JACOBY. Topical metronidazole application in recall patients. *J. Clin. Periodontol.*, v. 24, p. 914-919, 1997.
- STOLTZE, K. Concentration of metronidazole in periodontal pockets after application of a metronidazole 25% dental gel. *J. Clin. Periodontol.*, v. 19, p. 698-701, 1992.
- STOLTZE, K.; STELLFED, M. Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel. *J. Clin. Periodontol.*, v. 19, p. 693, 1992.
- TANNER, A. C. R.; HAFFER, C.; BRATTHAIL, G. T.; VISCONTI, R. A.; SOCRANSKY, S. S. A study of bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Microbiol.*, v. 6, p. 278-307, 1979.
- THOMSON, S. J.; GRAHAM, G. S.; FANCHER, J. P.; BROOME, J. C.; CAUDIL, R. F. Periodontal effects of local tetracycline delivery by two biodegradable vehicles. *J. Dent. Res.* v. 71, p. 295, 1992.
- TINOCO, E. M. B.; BELDI, M. I.; CAMPEDELLI, F.; LANA, M.; LOUREIRO, C. A.; BELLINI, H. T.; RAMS, T. E.; TINOCO, P. G.; PREUS, H. R.; Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. *J. Periodontol.*, v. 69, n. 12, p. 1355-1363, 1998.
- TONETTI, M.; CUGINI, M. A.; GOODSON, J. M. Zero-order delivery with periodontal placement of tetracycline-loaded ethylene vinyl acetate fibres. *J. Periodont. Res.*, v. 25, p. 243-249, 1990.
- TURNBULL, R. S. Chemotherapeutic control of plaque and gingivitis. *J. Can. Dent. Assoc.*, v. 55, n. 12, p. 965-966, 1989.
- VAN DER OUDERAA, F. J. G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, v. 18, p. 447-454, 1991.
- VAN STEENBERGHE, D.; BERCY, P.; KOHL, J.; DE BOEVER, J.; ADRIAENS, P.; VANDERFAELLIE, A.; ANDRIAENSSEN, C.; ROMPEN, E.; DE VREE, H.; MCCARTHY, F.; VANDENHOVEN, G. Subgingival minocycline hydrochloride ointment in moderate to severe chronic adult type periodontitis: a randomized, double blind, vehicle-controlled, multicenter study. *J. Periodont.*, v. 64, p. 637, 1993.
- VANDERKERCKHOVE, B. N. A.; QUIRYNEN, M.; STEENBERGHE, D. The use of locally-delivered minocycline in the treatment of chronic periodontitis. A review of the literature. *J. Clin. Periodontol.*, v. 25, p. 964-968, 1998.
- VARSHOSAZ, J.; DEGHAN, Z. Development and characterization of buccoadhesive nifedipine tablets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 54, p. 135-141, 2002.
- VINHOLIS, A. H. C.; FIGUEIREDO, L. C.; MARCANTONIO JUNIOR, E.; MARCANTONIO, R. A. C.; SALVADOR, S. L. S.; GOISSIS, G. Subgingival utilization of a 1% chlorhexidine collagen gel for the treatment of periodontal pockets. A clinical and microbiological study. *Braz. Dent. J.*, v. 12, n. 3, p. 209-213, 2001.

- VYAS, S. P.; SIHORKAR, V.; DUBEY, P. K. Preparation, characterization and in vivo antimicrobial activity of metronidazole bearing lectinized liposomes for intra-periodontal pocket delivery. *Pharmazie*, v. 56, n. 7, p. 554-560, 2001.
- WAN YUOSOF, W. Z. A.; NEWMAN, H. N.; STRAHAN, J. D.; COVENTRY, J. F. Subgingival metronidazole in dialysis tubing and subgingival chlorhexidine irrigation in the control of chronic inflammatory periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* v. 11, n. 166-175, 1984.
- WILLIAMS, R. C.; HOWELL, T. H. New technologies for the diagnosis of periodontal disease. *J. Prothet. Detn.*, v. 69, n.6, p. 551-557, 1993.
- WONG, C. F.; YUEN, K. H.; PEH, K. K. Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. *Int. J. Pharm.*, v. 178, p. 11-22, 1999.
- YEUNG, F. I. S.; NEWMAN, H. N.; ADDY, M. Subgingival metronidazole in acrylic resin vs chlorhexidine irrigation in the control of chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, v. 54, n. 11, p. 651-657, 1983.
- Recebido para publicação em 20 de dezembro de 2004.
Aceito para publicação em 08 de fevereiro de 2006.

APÊNDICE D – Trabalho 4

Drug Development and Industrial Pharmacy, 32:229–238, 2006

Copyright © Taylor & Francis Group, LLC

ISSN: 0363-9045 print / 1520-5762 online

DOI: 10.1080/03639040500466312

Preparation and Antimicrobial Activity of Gelatin Microparticles Containing Propolis Against Oral Pathogens

M. L. Bruschi and

E. H. G. Lara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, FCFRP-USP, Av. Zeferino Vaz, s/n, CEP 1404-0903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

C. H. G. Martins and

A. H. C. Vinholis

Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada, Universidade de Franca, Av. Dr. Armando Salles Oliveira, 201, CEP 14404-600, Franca, SP, Brazil

L. A. Casemiro and H. Panzeri

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Av. Zeferino Vaz, s/n, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

M. P. D. Gremião

Departamento de Fármacos e Medicamentos, FCFAR- UNESP, Rod. Araraquara-Jaú, km 1, CEP 14802-902, Araraquara, SP, Brazil

Address correspondence to M. L. Bruschi, FCFRP-USP, Av. Zeferino Vaz, s/n CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil; Tel: +55-16-602-4289; Fax: +55-16-602-4289; E-mail: bruschiml@yahoo.com.br

ABSTRACT Gelatin microparticles containing propolis ethanolic extractive solution were prepared by spray-drying technique. Particles with regular morphology, mean diameter ranging of 2.27 μm to 2.48 μm , and good entrapment efficiency for propolis were obtained. The in vitro antimicrobial activity of microparticles was evaluated against microorganisms of oral importance (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Candida albicans*, and *Lactobacillus casei*). The utilized techniques were diffusion in agar and determination of minimum inhibitory concentration. The choice of the method to evaluate the antimicrobial activity of microparticles showed be very important. The microparticles displayed activity against all tested strains of similar way to the propolis, showing greater activity against the strains of *E. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, and *C. albicans*.

KEYWORDS Propolis, Gelatin microparticles containing propolis, Antimicrobial activity, Oral pathogens

INTRODUCTION

Propolis (bee glue) is a strongly adhesive resinous bee hive product collected by honeybees from leaf buds and cracks in the bark of various plants (Burdock, 1998). Bees masticate this resin, salivary enzymes are added (mainly β -glucosidase), and the partially digested material is mixed with beeswax and used in the hives to exclude draught, to protect against external invaders, and to mummify their carcasses (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995; Pietta et al., 2002). With complex chemical composition, typically consisting of waxes, resins, water, inorganics, phenolics, and essential oils, the exact composition of propolis is dependent upon the source plant(s) (Bankova et al., 1992; Marcucci, 1995; Markham et al., 1996; Burdock, 1998).

Propolis has been used extensively in folk medicine for many years, at least 300 BC (Ghisalberti, 1979), and also has been reported to posses various

biological activities, namely antimicrobial (Tosi et al., 1996; Moreno et al., 1999; Koo et al., 2000; Sforzin et al., 2000; Banskota et al., 2001; Santos et al., 2002a; Kartal et al., 2003; Melliou & Chinou, 2004), fungicidal (Kujumgiev et al., 1999; Ota et al., 2001; Murad et al., 2002; Sawaya et al., 2002), antiviral (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995; Kujumgiev et al., 1999), anti-ulcer (Burdock 1998), immunostimulating (Burdock, 1998), hypotensive (Marcucci, 1995; Burdock, 1998), anti-inflammatory (Burdock, 1998; Song et al., 2002a, b), antioxidant (Moreno et al., 2000; Isla et al., 2001; Nagai et al., 2001; Simões et al., 2004), and cytostatic (Banskota et al., 2001; 2002) activities.

Alone or incorporated in another dosage form propolis ethanolic extractive solution is commonly utilized on therapeutics, namely wound healing, tissue regeneration, treatment of burns, neurodermatitis, leg ulcers, psoriasis, herpes simplex and genitalis, rheumatism and sprains, candidiasis, cheilitis, stomatitis, influenza, and cold (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998). Propolis ethanolic extracts have demonstrated activity against oral pathogens (Park et al., 1998; Azevedo et al., 1999; Koo et al., 2000) and have been used in dentistry (Manara et al., 1999) mainly to treat periodontal diseases (Santos et al., 1999, 2002a,b; Gebara et al., 2002), and in mouthwashes and toothpaste to prevent caries and to treat stomatitis (Lu et al., 2004).

Some disadvantages of propolis ethanolic extracts are the strong and unpleasant taste, aromatic odor, and high ethanol concentration (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998). These disadvantages result in difficulties on packing, transport, and incorporation in oral dosage forms like lozenges, troches, gels, oral rinses, or mouthwashes. The patient compliance to the therapeutics is committed too. Bruschi et al. (2003a) showed that is possible, the production of gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique using propolis ethanolic extractive solution. These microparticles do not have the propolis ethanolic extract strong and unpleasant taste, aromatic odor, and high ethanol concentration.

Despite these discoveries and the increasing use of propolis in dentistry (Manara et al., 1999; Bruschi et al., 2003a), no studies have been carried out to determine the inhibitory effect of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. Within this context, the objective of this study was to evaluate in vitro the antimicrobial activity of the gelatin microparticles containing propolis against some microorganism

of oral importance, namely *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Candida albicans*, and *Lactobacillus casei*.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Two samples of propolis were collected from an experimental apiary located on the farm of Universidade Estadual de Maringá (Paraná State, Brazil). The first propolis sample (P1) was collected in the dry season and another (P2) was collected in humid season. Type A gelatin, Royal (São Paulo, Brazil), was used without further purification. For the high-performance liquid chromatography (HPLC) mobile phase separation, HPLC grade methanol and acetonitrile were used (purchased from Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA), and water filtered through a Milli-Q apparatus, Millipore (Bedford, MA, USA). Pharmaceutical grade standard chrysin was purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA) and it was used as an external standard. Analytical grade acetone, ethyl acetate, methanol, acetic acid, dimethyl sulfoxide, and aluminium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Pharmaceutical grade mannitol and ethyl alcohol (96°GL), were also purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Chlorhexidine gluconate aqueous solution (Periogard) was purchased from Colgate-Palmolive (São Paulo, Brazil). Penicillin, miconazole, resazurin, and tri-phenyl tetrazolium chloride were purchased from Sigma (Saint Louis, USA). Furthermore, Mueller Hinton culture medium (MH), Brain-Heart Infusion (BHI) medium, and Tryptic Soy Broth (TSB) medium were also purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Preparation and Characterization of the Propolis Extractive Solution (PES)

Propolis ethanolic extractive solution (PES) of each sample was prepared with propolis/ethanol ratio of 30/70 (w/w) by turbo extraction (List & Schmidt, 1989), at 3500 rpm for three times at 15 min with two intervals of 5 min. Each PES was filtered through Whatman grade 3 filter paper (Maidstone, UK) and was made up to the total initial weight with the ethanol, replacing the amount of solvent that evaporated

during the process. Exactly weighted 10 g of each PES were concentrated on water bath (100°C) with eventual shake. The concentrated material was dried on the Ohaus-MB 200 infrared analytical balance (Pine Brook, NJ, USA) at 110°C and the result was presented as “dryness residue” value (DR). Six replicates were carried out to estimate the inherent variability of each the determination.

The total flavonoids drift of each PES was obtained using the technique according Bruschi et al. (2003a). Three milliliters of distilled water, 3.0 mL of acetone, and 3.0 mL of PES were added in a separation funnel. This mixture was three times extracted with 15 mL of ethyl acetate. Ethyl acetate was added to 50.0 mL, rendering S1. Exactly 1.0 mL of aluminium chloride ethanolic solution (2%, w/v) and methanolic solution of acetic acid (5%, v/v) was added into 10.0 mL of S1 to 25.0 mL, rendering S2. At the time, methanolic solution of acetic acid (5%, v/v) was added into 10.0 mL of S1 to 25.0 mL, to be used as compensatory solution. After 30 min, S2 was analyzed by Beckman coulter DU-640 spectrophotometer (Fullerton, CA, USA) at wavelength (λ) of 425 nm. Six replicates were carried out to estimate the inherent variability of the determination and the total flavonoids drift of each PES was calculated in grams of quercetin (specific absorptivity = 500) obtained in 100 g of dried propolis.

Each PES was also analyzed by HPLC, according to Bruschi et al. (2003b). An analytical aliquot of 1.0 mL of PES was extracted with 25 mL of ethyl acetate. The acetate fraction was dried using a water bath (40°C) and the residue was dissolved in 10.0 mL of methanol. This solution was filtered through a modified PTFE membrane filter with pore size of 0.45 μ m (Millipore, Bedford, MA, USA) and an aliquot (50 μ L) of the filtrate was diluted with 10.0 mL of methanol, obtaining the solution for analysis. A 100 μ L aliquot of this solution was injected in a fixed loop injector (Rheodyne VS 7125, 100 μ L), which was utilized to carry the sample into the reversed phase Chromsep RP C18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., particle size 5 μ m, Varian). The column temperature was maintained at 30 $\pm$

0.1°C. Furthermore, the HPLC system consisted of LC-10AD two pumps, an automatic controller of flow, a SPD-M10A Ultraviolet-Visible Photo Diode Array spectrophotometric detector module, column oven, and an integrator system (Shimadzu, Kyoto, Japan). The mobile phase was methanol (A) and acetonitrile/water (2.5/97.5, v/v) (B), previously filtrated through a 0.45 μ m PALL-Gelman membrane filter (East Hills, NY, USA) and degassed by ultrasound. The gradient elution system changed as the time, thus, at 0 min, 50% A and 50% B; 47 min, 80% A and 20% B; 50 min, 100% A and 0% B; 58 min, 100% A and 0% B; 62 min, 47% A and 53% B; 67 min, 47% A and 53% B. The flow-rate was 1.0 mL/min and the absorbance of the eluate at 310 nm was monitored. The propolis concentration in the solution was determined quantifying the three major peaks (markers) of the obtained chromatogram in relation to chrysin.

Preparation and Characterization of Propolis Microparticles (PM)

Each propolis extractive solution was dispersed in a gelatin solution at 25°C through the dripping technique using a syringe of 10 mL, and with magnetic agitation by 30 min (Bruschi et al., 2003a). The quantity of gelatin utilized was a function of the PES DR (Table 1). The final dispersions were spray-dried in a BÜCHI Mini Spray Dryer model B-191 (Büchi, Flawil, Switzerland) through the nozzle, using the conditions illustrated in Table 1. The resultant dried products were collected and kept away from rehydration until further tests.

The spray-dried products were coated under argon atmosphere with gold/palladium and examined under a Jeol JSM-T330A scanning electron microscope (Tokyo, Japan). The scanning electron photomicrographs (SEM) were evaluated. Moreover, the samples of PM were subjected to particle analysis by a Leica DMRXA optical microscopy (Wetzlar, Germany) with Leica *Qwin Image Analysis System*. Particles were placed on a glass slide and the size measurements of

TABLE 1 Microparticles Spray-Drying Conditions

Inlet temperature (°C)	Gelatin/PESDR % ratio (w/w)	Feed rate (%)	Aspiration (%)	Pressure (%)	Mannitol (%)
160	6/1	6	80	3	20

microparticles were performed using Feret's diameter as parameter. One thousand microparticles were measured and the particle size distribution was estimated.

The amount of propolis in the microparticles was determined by spectrophotometric and HPLC techniques (Bruschi et al, 2003a,b). For the spectrophotometric determination, 3.0 g of PM, 3.0 mL of acetone, and 3.0 mL of distilled water were added in a separation funnel. This mixture was extracted three times with 15 mL of ethyl acetate. Ethyl acetate was added to 50.0 mL, rendering M1. Exactly 1.0 mL of aluminum chloride ethanolic solution (2%, w/v) and methanolic solution of acetic acid (5%, v/v) was added into 10.0 mL of M1 to 25.0 mL, rendering M2. At the time, methanolic solution of acetic acid (5%, v/v) was added into 10.0 mL of M1 to 25.0 mL, to be used as compensatory solution. After 30 min, M2 was analyzed by Beckman coulter DU-640 spectrophotometer (Fullerton, CA, USA) at wavelength (λ) of 425 nm. Six replicates were carried out to estimate the inherent variability of the determination and the total flavonoids drift of each PES was calculated in grams of quercetin (specific absorptivity = 500) obtained in 100 g of dried PM. For the HPLC, a 15 mg sample of each PM was added in acetonitrile to 25.0 mL and sonicated for 5 min. The dispersion was filtered through a modified PTFE membrane filter with pore size of 0.45 μ m (Millipore, Bedford, USA) and the propolis concentration in the filtered dispersion was determined by quantifying the three major peaks (markers) of the obtained chromatogram. The HPLC analysis conditions and equipments were the same than those utilized to HPLC analyses of PES. The entrapment efficiency for propolis of the PM was calculated comparing the results obtained from the PES with the PM.

Microorganisms

A total of eight microbial strains, obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA), were tested: *Enterococcus faecalis* ATCC 4082, *Streptococcus salivarius* ATCC 25975, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478, *Candida albicans* ATCC 28366, and *Lactobacillus casei* ATCC 11578. All strains were kept in laboratory and cryopreserved at -86°C . Before the experiments, the cultures were Gram-stained to determine purity.

M. L. Bruschi et al.

Antimicrobial Activity Assay by Agar Diffusion

The antimicrobial activity of the samples was determined by agar diffusion (AD) by the well technique using the double layer agar system (Grove & Randall, 1955). The strains were suspended in 2.5 mL of the sterile Brain-Heart Infusion (BHI) medium. The standardization of each microorganism suspension was carried out using spectrophotometer (Femto, São Paulo, Brazil) at wavelength (λ) of 800 nm to match the transmittance of 90, equivalent to 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL), except for the *C. albicans* strain suspension which was adjusted to have transmittance of 80, equivalent to 1.0 McFarland scale (3.0×10^8 CFU/mL). A 12.5 mL portion of the BHI agar (50°C) and 2.5 mL of each test suspension was gently mixed and poured on to a previously set layer of 25 mL BHI agar (125×25 mm Petri plate). After the solidification, the seed layer was perforated with a sterilized stainless-steel cylinder (inside diameter 4 mm) to form the wells, which were located 25 mm of the plate border and 40 mm halfway to each other. The PM, propolis (dissolved in dimethyl sulfoxide to 300 mg/mL), PES, ethanolic alcohol or dimethyl sulfoxide (negative controls), and aqueous solution of chlorhexidine gluconate (0.12%, w/w) as positive control, were applied inside the wells. The plates were kept for 2 h at room temperature to allow the diffusion of the agents through the agar. Afterwards, all the plates were incubated at 37°C in an appropriate gaseous condition and for 24–48 h in a CO_2 incubator (10% CO_2). Zones of inhibition of microbial growth around the wells containing the test samples were measured (mm) and recorded after the incubation time (Möller, 1966; Koo et al., 2000). Three replicates were made for each microorganism.

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC determination of the propolis, PES, and PM were performed by the microplate dilution method (Andrews, 2001). Individual 24 h colonies from BHI agar plates were suspended in 10.0 mL of sterile TSB. The standardization of each microorganism suspension was carried out using spectrophotometer (Femto, São Paulo, Brazil) at wavelength (λ) of 800 nm to match the transmittance of 90, equivalent to

232

0.5 McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL), except for the *C. albicans* strain suspension which was adjusted to have transmittance of 80, equivalent to 1.0 McFarland scale (3.0×10^8 CFU/mL). In a sterilized microplate were poured 100 μ L of TSB, microbial suspension, and the test sample (concentrations ranging from 0.078 to 300 μ g/mL). Penicillin or miconazole were used as positive control and, without antibiotic addition, wells were used as negative control. After 37°C/24 h incubation 30 μ L of 0.01% resazurin aqueous solution was poured in each microplate reservoir (for bacteria). The red color presence was interpreted as positive growth and the blue color presence as negative growth. In each microplate reservoir for the yeast, 40 μ L of 0.5% tri-phenyl tetrazolium aqueous solution was poured. After 30 min more of incubation, the red color presence was interpreted as positive growth. The results were expressed as MIC, i.e., the minimum concentration which prevented visible growth of microorganisms (blue color or color absence). Three replicates were made for each microorganism.

RESULTS AND DISCUSSION

Characteristics of the PES and the PM

The two samples of propolis were collected in different seasons and resulted extractive solutions with different characteristics (Table 2).

The propolis extractive solution prepared from propolis P1 (PES1) displayed greater dryness residue than propolis extractive solution prepared from propolis P2 (PES2). In addition, the total flavonoids drift of PES1 was greater than PES2. Then, P1 had a greater amount of substances to be extracted by the ethanol, including flavonoids, than P2. The flavonoids constitute a very important class of polyphenols, widely present in propolis (Bankova et al., 1992), to which are attributed the great part of propolis biological activities (Burdock et al., 1998). Thus, the propolis collected in the dry season originated a PES with better qualities.

TABLE 2 Characteristics of Propolis Ethanolic Extractive Solution

Parameters	PES1 ^a	PES2 ^b
Dryness residue (%)	18.32 $\pm$ 0.41	17.57 $\pm$ 0.16
Total flavonoids drift (%)	2.53 $\pm$ 0.04	1.83 $\pm$ 0.02

^aFrom propolis sample P1 (dry season).

^bFrom propolis sample P2 (humid season).

Propolis extraction solution (PES) characteristics, composition of dispersion, and spray-drying conditions gave propolis microparticles with a very smooth and uniform surface, and spherical shape (Fig. 1). A low number of coalesced microparticles and low agglomeration were observed both in propolis microparticles prepared from PES1 (PM1) and propolis microparticles prepared from PES2 (PM2), according to Bruschi et al. (2003a, 2004).

The typical size distribution graphs are presented in Fig. 2. The microparticles had a mean diameter of

(a)

(b)

FIGURE 1 SEM Micrographs of Spray-dried Propolis Microparticles Showing the Outer Topology: (a) PM1 (Original Magnification $\times$ 3500); (b) PM2 (Original Magnification $\times$ 2000).

FIGURE 2 Size Distribution of PM1 (a) and PM2 (b) Propolis Microparticles: Size Frequency Distribution (Bars) and Size Cumulative Frequency Distribution (Line). The Particle Size Class Interval Is 1.0 μm .

2.27 μm (PM1) and 2.48 μm (PM2). These results confirm that obtained structures are microparticles.

To calculate the trapping efficiency for propolis of the microparticles, PES and PM were quantified by spectrophotometric and HPLC methods (Table 3).

The chromatograms of PES showed three major peaks that were used as markers (Fig. 3). These peaks are substances that correspond to the flavonoids (Bruschi et al., 2003b) and for each one, the propolis trapping efficiency was calculated (Table 3).

These PM characteristics are useful for development of propolis oral dosage form without the PES strong and unpleasant taste, aromatic odor, and high ethanol concentration.

Antimicrobial Activity Evaluation

The combination of temperature, small space, and humidity provide the beehives with good conditions for microbial growth. Nevertheless, this does not occur because of the antimicrobial activity of propolis (Ota et al., 2001). The antibacterial and antifungal activities are the most popular of the propolis, being between its biological actions more extensively investigated (Marcucci, 1995). Thus, antimicrobial activity of propolis, PES, and PM were evaluated by two different techniques (AD and MIC) against microorganism strains of American Type Culture Collection (ATCC) that have importance in oral diseases (Gibbons, 1984; Loesche, 1986; Seymour & Heasman, 1992; Azevedo et al., 1999; Koo et al., 2000).

The agar diffusion (AD) technique is very similar to that used to determine the sensitivity of bacteria to the drugs. Both the propolis and PES showed activity against the tested strains (Table 4). The PES obtained from P1 (PES1) and the PES obtained from P2 (PES2) showed inhibition zones from 2.74% to 46.15% and from 16.64% to 56.77% bigger than P1 and P2, respectively. However, the inhibition zones of propolis and their respective PES were similar against *C. albicans* and *L. casei*. The PES inhibition zones were more similar than those of chlorhexidine to some strains (*S. mitis*, *E. faecalis*, *S. sanguinis*, and *S. sobrinus*), indicating a good antimicrobial activity against these microorganisms. In addition, ethanolic alcohol (used to prepare PES) and dimethyl sulfoxide (used to dissolve the propolis) did not display a zone of microbial growth inhibition, indicating that they are not responsible for the propolis and PES antimicrobial activity observed.

TABLE 3 Propolis Trapping Efficiency

Propolis microparticles	Drug trapping efficiency (%)			
	HPLC method			Spectrophotometric method
	Marker 1	Marker 2	Marker 3	
PM1	32.46	61.67	41.87	86.44
PM2	27.03	67.23	67.85	73.90

FIGURE 3 HPLC Chromatograms of the Extractive Solutions: (a) PES2 and (b) PES1.

In contrast, the PM did not show activity against the tested strains (Table 4). The use of microparticles could improve or enhance the therapeutic effect of biomedical materials or drugs (Baras et al., 2000). Thus, the expected result would be a major size of PM inhibition zones than its respective PES, but inhibition was not observed when PM was tested. The inhibition zone size is the consequence of the microbial sensibility, solubility, and delivered amount of drug in the first hours after its use. The PM possesses substances with varied polarities (Kosonocka, 1991; Sforcin et al., 2000), many of which have little or no solubility in hydrophilic medium (agar), committing the liberation and diffusion of the extract substances with antimicrobial properties. In addition, Bruschi

et al. (2004) showed that less polar compounds, as the marker 3, possess slower in water release and that the PM structure could hinder the exit of the markers, increasing the release time of them. In an agar medium, with low amount of free water, the PM substances release was probably prejudiced.

Those deductions were confirmed by the results obtained with the determination of the MIC (Table 5) where the propolis, PES, and PM showed activity against all the tested strains.

This result can be explained by the fact of the MIC technique to use TSB medium (and not agar), providing a larger amount of free water, facilitating the delivery and diffusion of the active substances. Considering that the propolis always presented activity, even with the variability of chemical composition in the different geographical areas, owed the different vegetables sources (Markham et al., 1996; Kujumgiev et al., 1999), similar problems obtained in this study were observed when it was verified that some authors reported propolis activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* (Grange & Davey, 1990; Woisky et al., 1994; Tosi et al., 1996; Sforcin et al., 2000; De Vargas et al., 2004) and others did not (Kujumgiev et al., 1999; Nieva-Moreno et al., 1999). Bruschi et al. (2003a) reported the antibacterial activity of gelatin microparticles containing propolis against *S. aureus* using Mueller Hinton medium (broth). Analyzing the methodologies used in all those studies, it is observed that the techniques that facilitated the dissolution and/or diffusion of the extract and/or active substances in the medium were more adequate.

The MICs of the propolis samples were equal or lower than 200 µg/mL, showing good antimicrobial activity against the tested strains. The propolis were

TABLE 4 Mean Diameter (in mm) of the Zones of Microbial Growth Inhibition Provided by Propolis, PES, Gelatin Microparticles Containing Propolis, and Chlorhexidine Gluconate

Microorganism	Propolis		PES		PM		Chlorhexidine
	1	2	1	2	1	2	
<i>E. faecalis</i> (ATCC 4082)	9.68 ± 1.16	10.00 ± 1.00	13.00 ± 0.00	13.67 ± 1.53	0	0	14.33 ± 0.58
<i>E. salivarius</i> (ATCC 25975)	11.68 ± 2.31	11.33 ± 2.31	12.00 ± 1.00	16.33 ± 0.58	0	0	19.00 ± 1.00
<i>S. sanguinis</i> (ATCC 10556)	12.00 ± 0.00	14.00 ± 1.00	16.68 ± 1.16	16.33 ± 1.16	0	0	17.68 ± 0.58
<i>S. mitis</i> (ATCC 494560)	16.33 ± 1.16	15.33 ± 0.58	18.00 ± 2.00	17.68 ± 1.16	0	0	16.67 ± 1.52
<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	13.68 ± 2.10	13.68 ± 1.16	15.00 ± 1.00	16.33 ± 1.53	0	0	24.67 ± 1.53
<i>S. sobrinus</i> (ATCC 33478)	13.00 ± 2.00	12.33 ± 1.16	19.00 ± 1.00	19.33 ± 1.53	0	0	21.00 ± 0.00
<i>C. albicans</i> (ATCC 28366)	10.00 ± 0.00	10.33 ± 0.58	9.00 ± 1.00	9.00 ± 0.00	0	0	16.00 ± 0.00
<i>L. casei</i> (ATCC 11578)	12.00 ± 2.65	10.67 ± 2.89	11.00 ± 2.00	11.33 ± 1.16	0	0	22.33 ± 2.52

TABLE 5 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Propolis (P), PES, Gelatin Microparticles Containing Propolis (PM)

Microorganism	MIC µg/mL						Controls ^a
	P1	P2	PES1	PES2	PM1	PM2	
<i>E. faecalis</i> (ATCC 4082)	200	200	200	200	200	200	2.95 (P)
<i>E. salivarius</i> (ATCC 25975)	100	90	200	200	90	90	0.3688 (P)
<i>S. sanguinis</i> (ATCC 10556)	30	30	100	80	50	50	0.1844 (P)
<i>S. mitis</i> (ATCC 49456)	20	20	20	20	50	50	0.0461 (P)
<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	200	200	200	200	200	200	0.0922 (P)
<i>S. sobrinus</i> (ATCC 33478)	200	200	200	200	200	200	0.0922 (P)
<i>C. albicans</i> (ATCC 28366)	90	90	200	200	80	90	5.9 (M)
<i>L. casei</i> (ATCC 11578)	200	200	300	200	200	200	5.9 (P)

^aP = penicillin and M = miconazole.

more effective against *S. sanguinis* and *S. mitis*, this late one being more susceptible to them. Similar results were observed to the extractive solutions, but showed bigger MICs against *E. salivarius*, *S. sanguinis*, *C. albicans*, and *L. casei* than its respective propolis. The lowest susceptibility to the PES was showed by *L. casei* strain, heading 300 µg/mL of PES1 to inhibit its growth. Moreover, the PES2 showed better results for *S. sanguinis* and *L. casei* than PES1.

Similar results were observed to the MIC of microparticles. But, considering the PES dryness residue (Table 2), the PES amount added to prepare the microparticles (Table 1), and the drug trapping efficiency of PM, that was not greater than 86.44% (Table 3), the PM activity was greater than the respective PES to some microorganisms. The MIC of microparticles was from 37.5% to 60% lower than the MIC of the respective PES, to *E. salivarius*, *S. sanguinis*, and *C. albicans*. In addition, the MIC results of PM were very similar to the propolis MIC values, except to *S. mitis* which was more susceptible to the propolis than to the PM.

Controls (penicillin and miconazole) displayed MIC values much lower than those of propolis, PES, and PM. However, the antimicrobial activity of extracts of natural products is very interesting at concentrations below 100 µg/mL (Ríos & Recio, 2005), as was obtained in this study against *E. salivarius* (propolis and PM), *S. sanguinis* (propolis, PES, and PM), *S. mitis* (propolis, PES, and PM), and *C. albicans* (propolis and PM). Moreover, the propolis can display antimicrobial synergism when administrated together with some antimycotic drugs (Holderna & Kedzia, 1987).

M. L. Bruschi et al.

CONCLUSIONS

Propolis and PES showed in vitro antimicrobial activity against all the tested microorganism strains. Regarding the necessity of free water presence and the slow release of substances from gelatin microparticles containing propolis, the choice of the method to evaluate their antimicrobial activity is very important. In addition, considering that the applied technology can modify the biological activity of the drugs (Baras et al., 2000; Santoyo et al., 2002), the results indicated that the tested strains of different microorganisms of oral importance could be inhibited by gelatin microparticles containing propolis of similar way to the propolis and PES. The determination of the MIC results showed that the strains of *E. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, and *C. albicans* were more susceptible to the propolis. Otherwise, considering that in vitro cannot be directly extrapolated to in vivo effects (Azevedo et al., 1999), further studies are necessary to evaluate the in vivo antimicrobial activity of the gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the financial support of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) of Brazil.

REFERENCES

- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, s, 1, 5–16.
- Azevedo, R. V. P., Komesu, M. C., Candido, R. C., Salvetti, C., & Rezende, F. H. C. (1999). *Candida* sp in the oral cavity with and

- without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and Perigard. *Revista de Microbiologia*, 30, 335–341.
- Bankova, V. S., Dylugov, A., Popov, S. S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., & Zanjansan, Z. (1992). Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, 23, 79–85.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15, 561–571.
- Banskota, A. H., Nagaoka, T., Sumioka, L. Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., & Kadota, S. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 67–73.
- Baras, B., Benoit, M. A., Poulain-Godefroy, O., Schacht, A. M., Capron, A., Gillard, J., & Riveau, G. (2000). Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers. *Vaccine*, 18, 1495–1505.
- Bruschi, M. L., Cardoso, M. L. C., Lucchesi, M. B., & Gremião, M. P. (2003a). Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 264, 45–55.
- Bruschi, M. L., Franco, S. L., & Gremião, M. P. D. (2003b). Application of an HPLC method for analysis of propolis extract. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 26(14), 2381–2391.
- Bruschi, M. L., Lopes, R. S., Franco, S. L., & Gremião, M. P. D. (2004). In vitro release of propolis from gelatin microparticles prepared by spray-drying technique. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, 25(2), 79–84.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chemical Toxicology*, 36, 347–363.
- De Vargas, A. C., Loguercio, A. P., Witt, N. M., Da Costa, M. M., Sá E Silva, M., & Viana, L. R. (2004). Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis. *Revista Ciência Rural*, 34(1), 1–7.
- Gebara, E. C. E., Lima, L. A., & Mayer, M. P. A. (2002). Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 365–369.
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee World*, 60, 59–80.
- Gibbons, R. J. (1984). Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *Journal of Dentistry Research*, 63(3), 378–385.
- Grange, J. M., & Davey, R. W. (1990). Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal Sociedade Médica*, 83, 159–160.
- Grove, D. C., & Randall, W. A. (1955). *Assay Method of Antibiotics*. (pp. 188–196) New York: Medical Encyclopedia Inc.
- Holderna, E., & Kedzia, B. (1987). Investigations upon the combined action of propolis and antimycotic drugs on *Candida albicans*. *Herba Polonica*, 33(2), 145–151.
- Isla, M. I., Moreno, M. I. N., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 76, 165–170.
- Kartal, M., Yildiz, S., Kaya, S., Kurucu, S., & Topçu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 69–73.
- Koo, H., Gomes, B. P. F. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Park, Y. K., & Cury, J. A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Archives of Oral Biology*, 45, 141–148.
- Kosonocka, L. (1991). Própolis fortalece o sistema imunológico. *Revista Brasileira de Apicultura, set/out*, 2, 2–24.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 235–240.
- List, P. H., & Schmidt, P. C. (1989). *Phytopharmaceutical Technology*. (pp. 112–115) Heyden & Son: London.
- Loesch, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353–380.
- Lu, Y., Wu, C., & Yuan, Z. (2004). Determination of hesperetin, cinnamic acid, and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. *Fitoterapia*, 75(3–4), 267–276.
- Manara, L. R. B., Gromatzky, A., Conde, M. C., & Bretz, W. A. (1999). Utilização da própolis em odontologia. *Revista FOB*, 7(3/4), 15–20.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83–99.
- Markham, K. R., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., & Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42(1), 205–211.
- Melliou, E., & Chinou, I. (2004). Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Medica*, 70(6), 515–9.
- Möller, A. J. (1966). Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth Methodological studies. *Odontologisk Tidskrift*, 74(s1) 380.
- Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Cudmani, N. G., Vattuone, M. A., & Sampietro, A. R. (1999). Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 97–102.
- Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1–2), 109–14.
- Murad, J. M., Calvi, S. A., Soares, A. M. V. C., Bankova, V., & Sforzin, J. M. (2002). Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on antibacterial activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 331–334.
- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., & Suzuki, N. (2001). Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75, 237–240.
- Nieva Moreno, M. I., Isla, M. I., Cudmani, N. G., Vattuone, M. A., & Sampietro, A. R. et al. (1999). Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 97–102.
- Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 44, 375–378.
- Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A. S., Ikegaki, M., Cury, J. A., & Rosalen, P. L. (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*, 36, 24–28.
- Pietta, P. G., Gardana, C., & Pietta, A. M. (2002). Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, 73(S1), 7–20.
- Rios, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 100, 80–84.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A. F., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., & Moreira, E. S. A. (1999). Antibacterial activity of propolis produced in Brazil against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* spp. and bacteria from *Bacteroides fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. *Anaerobe*, 5, 479–481.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Rodrigues, P. H., Uzeda, M., De, Carvalho, M. A. R., De, Farias, L. M., & Moreira, E. S. A. (2002a). Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. *Anaerobe*, 8, 9–15.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A., & Braga, F. C. (2002b). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharmacol.*, 80, 1–7.
- Santoyo, S., Ga de Jalón, E., Ygartua, P., Renedo, M. J., & Blanco-Prieto, M. J. (2002). Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 107–113.
- Sawaya, A. C. H. F., Palma, A. M., Caetano, F. M., Marcucci, M. C., Da Silva Cunha, I. B., Araujo, C. E. P., & Shimizu, M. T. (2002). Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, v, 35, 203–207.

- Seymour, R. A., & Heasman, P. A. (1992). *Drugs, diseases, and the periodontium*. New York: Oxford Medical Publications, Oxford University Press.
- Sforzin, J. M., Fernandes, Jr, A., Lopes, C. A. M., Bankova, V., & Funari, S. R. C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 243–249.
- Simões, L. M., Gregório, L. E., Da Silva Filho, A. A., De Souza, M. L., Azzolini, A. E., Bastos, J. K., & Lucisano-Valim, Y. M. (2004). Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 59–65.
- Song, Y. S., Park, E., Hur, G. M., Ryu, Y. S., Lee, Y. S., Lee, J. Y., Kim, Y. M., & Jin, C. (2002a). Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Cancer Letters*, 175, 53–61.
- Song, Y. S., Park, E., Hur, G. M., Ryu, Y. S., Kim, Y. M., & Jin, C. (2002b). Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, 155–161.
- Tosi, B., Domini, A., Romagnoli, C., & Bruni, A. (1996). Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy Research*, 10, 335–336.
- Woisky, R. G., Giesbrecht, A. M., & Salatino, A. (1994). Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. *Revista de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo*, 30(1), 19–21.