

UNICESUMAR – CENTRO UNIVERSITÁRIO CESUMAR
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM PROMOÇÃO DA SAÚDE

**ANÁLISE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PARA
POSSÍVEL APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES DE ENXAGUANTES BUCAIS PARA
AÇÃO ANTI-CÁRIE**

JULIANA OLIVA STEVANATO

ORIENTADOR: JOSÉ EDUARDO GONÇALVES

CO-RIENTADORA: MIRIAN UEDA YAMAGUCHI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARINGÁ

2013

UNICESUMAR – CENTRO UNIVERSITÁRIO CESUMAR
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTU SENSU EM PROMOÇÃO DA SAÚDE

**ANÁLISE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PARA
POSSÍVEL APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES DE ENXAGUANTES BUCAIS PARA
AÇÃO ANTI-CÁRIE**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro
Universitário Cesumar (Unicesumar), como
requisito à obtenção do título de Mestre em
Promoção da Saúde.**

MARINGÁ-PR
OUTUBRO DE 2013

Stevanato, Juliana Oliva

Análise Química e Microbiológica de Extratos de Própolis Para Possível Aplicação Em Formulações de Enxaguantes Bucais para Ação Anti-Cárie, Maringá Paraná/ Juliana Oliva Stevanato

Maringá, 2013
78 p.

Dissertação (Mestrado)- UNICESUMAR-Centro Universitário de Maringá
Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof^o Dr^o José Eduardo Gonçalves
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Mirian Ueda Yamaguchi

1. Escolar; 2. Educação em Saúde Bucal; Programas de Promoção em Saúde; Antissépticos Bucais; Própolis.

Dedico este trabalho à minha família.

Agradecimentos

Aos meus pais, meus irmãos, pelo carinho, apoio e força, muito obrigada;

Ao meu filho João Pedro, ao meu esposo Claudenir, pelo amor, paciência, muito obrigada;

Ao Professor, Orientador Dr. José Eduardo Gonçalves, sempre zeloso, dedicado e muito paciente, obrigada pela contribuição, colaboração e todo conhecimento para o alcance desta etapa;

À Professora, a co-orientadora, Dra. Mirian Ueda Yamaguchi, pela colaboração e disponibilidade;

A todos os Professores do Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Promoção da Saúde, em especial a Coordenadora, Professora Dra. Sônia Cristina Vermelho, muito obrigada;

Aos Membros da Banca de Defesa da Dissertação, Professores Doutores, José Eduardo Gonçalves, Diógenes Aparício Garcia Cortez e Eduardo Jorge Pilau, muito obrigada;

À Professora Dra. Selma Lucy Franco, pela imensa colaboração, Funcionários e Estagiários do Laboratório de Desenvolvimento de Fitoterápicos e Apiterápicos da UEM, obrigada;

À Graduanda do Curso de Biomedicina do UNICESUMAR, Jéssica Cristina Stefanutto, pela ajuda, desprendimento, dinamismo e muita colaboração durante todas as etapas do experimento, muito obrigada;

Aos funcionários do Programa do Mestrado em Promoção da Saúde, dos Laboratórios e Clínica dos Cursos de Farmácia, Biomedicina e Odontologia do UNICESUMAR, obrigada;

A todos os meus colegas de Mestrado, pelo companheirismo e bons momentos juntos.

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------|----|
| CAPÍTULO I | 1 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 2 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA | 11 |
| 1.3 OBJETIVOS..... | 12 |
| 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 13 |
| CAPÍTULO II | 23 |
| 2.1 INTRODUÇÃO | 26 |
| 2.2 METODOLOGIA | 27 |
| 2.3 RESULTADOS e DISCUSSÃO | 32 |
| 2.4 CONCLUSÃO | 48 |
| 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |
| CAPÍTULO III | 57 |
| 3.1 CONCLUSÃO | 58 |
| 3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS | 58 |
| 3.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa e transmissível, que resulta da colonização da superfície do esmalte por microrganismos, especialmente os *Streptococcus mutans* que, metabolizando carboidratos fermentáveis (sacarose), produzem ácidos. Esta acidez localizada, provocada pela disponibilidade de açúcar, leva à dissolução do fosfato de cálcio das camadas superficiais da estrutura do esmalte dentário, liberando fosfato e cálcio para o meio bucal, havendo perda mineral e formação da desmineralização e destruição do esmalte dentário. Tem sido descrita como doença de etiologia multifatorial que necessita da interação entre fatores do hospedeiro, dieta e placa bacteriana ou biofilme dental. O processo cariioso não se desenvolve na ausência da placa dental ou de carboidratos fermentáveis oriundos da dieta sendo considerada uma doença dieta-bacteriana (BUISCH, 2000; MALTZ, 2000).

Na prevenção da cárie necessita-se de condutas direcionadas a minimizar o desafio cariogênico e aumentar a resistência da superfície dentária. Isto pode ser alcançado através do controle do biofilme dental mecânica ou quimicamente (STOOKEY, 1998).

A remoção mecânica do biofilme ou da placa bacteriana é um fator importante na prevenção da cárie e igualmente da doença periodontal. Frente a limitações dos métodos mecânicos, recomenda-se lançar mão de agentes químicos visando o controle do biofilme. Dessa forma, os agentes químicos têm sido empregados com a finalidade de reduzir a população de microrganismos, em particular bactérias cariogênicas. Dentre os microrganismos encontrados no biofilme dentário, os *S. mutans* podem contribuir de forma expressiva no processo cariioso (ZERO, 1999).

A cárie dentária continua sendo, na Odontologia, um dos principais problemas de saúde pública. Apesar dos índices apresentarem uma diminuição, um declínio nas últimas décadas, sendo ainda prevalente para alguns grupos, deve-se ao fato de que, em escala global, somente uma parcela da população se beneficia dos métodos de prevenção e controle (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001; FEATHERSTONE, 1999).

Desde a década de 60, a cárie é considerada uma doença induzida pela presença de placa bacteriana, fator crítico para o seu desenvolvimento em humanos. Estudos iniciais indicaram especificidade bacteriana envolvida nesse processo, relacionando os *Streptococcus mutans* e a sua

etiopatogenia (IKEDA et al., 1973; LOESCHE; STRAFON, 1979) e os *Lactobacilos* à sua progressão (LOESCHE, 1986).

A evolução dos experimentos evidenciou que o desenvolvimento da cárie é relacionado a uma multiplicidade de fatores que são capazes de modificar o ecossistema oral, concedendo aos microrganismos odontopatógenos a oportunidade de dominar a microbiota nos sítios que favoreçam tal situação. Por esse parâmetro, a cárie dentária poderia ser entendida não somente como uma doença infecciosa e multifatorial, mas como um evento essencialmente oportunista (LANG et al., 1987; BUISCH et al., 1989).

Destacaram-se vários estudos, nos anos 90, que propuseram a evidência de que eventos ecológicos referentes à placa bacteriana dentária ou ao biofilme dental implicariam maior ou menor cariogenicidade deste, o que ficou conhecido como Hipótese da Placa Ecológica (MARSH, 1991; MARSH, 1994). Desta forma, o excesso de açúcar oriundo da dieta poderia levar à produção de ácidos causando uma mudança no ambiente bucal, de um pH neutro para um pH ácido, situação que incita trocas ecológicas na microbiota residente dominada por *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus orallis*, relacionados ao processo de remineralização – RE, por outra em que predominam os *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Lactobacilos*, que são acidúricos e acidogênicos e, portanto, cariogênicos, os quais favorecem o processo de desmineralização – DES, levando aos estágios iniciais e de desenvolvimento da doença cárie, respectivamente, se não controlados.

Quando o controle mecânico do biofilme é falho, favorecendo o acúmulo deste em sítios de estagnação, a formação de um biofilme potencialmente cariogênico é favorecida, e as espécies microbianas como os *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* são ecologicamente selecionadas, passando a dominar o microambiente bucal (MARSH, 1991), fato que expõe o indivíduo a uma situação de risco de cárie exacerbado (desafio cariogênico), implicando o surgimento de manchas brancas ativas na superfície do esmalte, as quais são o primeiro sinal clínico da doença, cujos controle e inativação são possíveis de serem executados (BACKER – DIRKS, 1966; MALTZ et al., 2003).

Os fluoretos e a clorexidina foram muito utilizados como antimicrobianos para o controle químico do biofilme dental. Entretanto, com o crescente interesse de produtos naturais desde a década de 90, a própolis passou a ser objeto de estudos, principalmente devido a sua capacidade antimicrobiana (BRUMFITT et al., 1990; WOISKY et al., 1994).

A utilização de extratos etanólicos de própolis (EEPs) no campo da Cariologia tornou-se realidade quando estudos relataram sua atividade sobre a inibição de agentes, microrganismos relacionados à cárie dentária (KOO et al., 2003; KOO et al., 2005; ALMEIDA et al. 2006) e sobre o processo de formação do biofilme cariogênico / fatores de virulência bacteriana que influenciam na cariogenicidade deste (PARK et al., 1998; KOO et al., 2000; KOO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2006).

O fluoreto de sódio (NaF) tem sido demonstrado como eficaz no processo de remineralização de lesões de cárie incipiente (FEATHERSTONE, 1999; CURY; TENUTA, 2009; FEATHERSTONE, 2009). Diante disso, pensou-se na hipótese de combinar os EEPs ao NaF para verificação da possibilidade da utilização dessa associação na dinâmica do processo de desmineralização-remineralização do esmalte dentário (processo DES-RE).

As associações de extratos de própolis e combinações com os fluoretos foi verificado quanto ao efeito entre eles, isoladamente ou associados ao fluoreto de sódio sobre a recuperação da microdureza superficial do esmalte (ZÁRATE-PEREIRA, 2003) e na remineralização de manchas brancas (ZÁRATE-PEREIRA, 2003; DE CARLI, 2007), tendo em vista a sinergia entre um comprovado agente remineralizador, o fluoreto de sódio e um potente composto antibacteriano de origem natural e sem relato de toxicidade, o extrato etanólico de própolis.

Todos esses resultados direcionam para a possibilidade do uso do extrato de própolis etanólico no tratamento de cárie. Porém, frente ao alto desafio cariogênico, o fluoreto de sódio pode não ser suficiente para controlar a doença cárie; sendo necessário o desenvolvimento de agentes químicos para controlar a formação da placa bacteriana dentária ou do biofilme dental que sejam seguros para o uso e cuja ação seja sinérgica ou complementar à do fluoreto (OGAARD et al., 1994; FEATHERSTONE, 2009).

Dentre os agentes empregados com potencial antimicrobiano, a clorexidina parece ser a substância que vem apresentando as melhores características em função de suas particularidades, (VINHOLIS et al, 1996). Os efeitos benéficos advindos do seu uso são documentados na literatura, onde vários estudos demonstraram o seu potencial antimicrobiano, inibindo o acúmulo de biofilme e o aparecimento da doença periodontal, além do efeito antimicrobiano seletivo, especialmente sobre *S. mutans* (PETERLINI et al, 1998; ZANELA et al, 1997; BIJELLA; ROSA, 2002).

Por outro lado, seus efeitos colaterais não são poucos, podendo causar pigmentação dos dentes, interferência gustativa, descamação da mucosa e resistência de germes quando do uso diário prolongado além de possuir sabor amargo (BARROS; FIORINI, 2000; CURY et al., 2000).

Na Odontologia atual, produtos à base de extratos naturais vêm sendo empregados com propósito terapêutico *in vivo* (PEREIRA, 2002). Grande parte dos produtos de origem vegetal apresenta em sua composição substâncias com atividade anticariogênica que podem suprimir o crescimento de bactérias presentes na cavidade bucal, além de inibir a síntese de glucano a partir da sacarose pela glicosiltransferase.

A própolis é uma substância natural, resinosa elaborada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* através da coleta de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (KOO et al., 2002; MANARA et al., 1999). É encontrada nas colméias, onde é responsável pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento anti-séptico (SANTOS, 1999).

Várias substâncias químicas têm sido isoladas da própolis, sendo os flavonóides considerados o composto biologicamente ativo (KOO et al 2002).

Tem sido relatada atuação antimicrobiana expressiva do extrato de própolis contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (FERREIRA; VALENTE; BARBOSA, 1996; WOISKY; GIESBRECHT; SALATINO, 1994), e especificamente contra bactérias colonizadoras do biofilme, (GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996), além do efeito inibitório sobre a síntese de glucano (KOO et al, 2000) somado ao fato de sua capacidade de inibir o desenvolvimento da lesão cariiosa em animais (IKENO; MIYAZAWA, 1991; KOO et al., 1999).

Sua incorporação em produtos de higiene oral tem sido estimulada pelos resultados promissores obtidos tanto na formulação de dentifrícios (BAAKILINI; LARA; PANZERI, 1996; PANZERI et al., 1999) como no emprego em soluções de bochecho, reduzindo os níveis de *S. mutans* (MORAES et al, 1996, STEINBERG; KAINE; GEDALLIA, 1996; ZÁRATE-PEREIRA, 1999), o acúmulo de biofilme (KOO et al., 2002; MURRAY; WORTHINGTON; BLINKHORN, 1997) e a doença gengival (DUARTE; KFOURI, 1999; MOTA, 2000).

A solução para bochecho de própolis a 6,25% reduziu significamente os níveis de *S. mutans*, atuou sobre as condições de doença gengival e acúmulo de biofilme, demonstrando comportamento semelhante ao da clorexidina, podendo ser indicado como agente químico terapêutico (ALMEIDA et al., 2006).

A própolis é usada como um remédio popular e está disponível na forma de cápsulas, como um extrato (hidroalcoólico ou glicólico), como enxaguatório bucal, na forma de pó, entre outras (CAPASSO & CASTALDO, 2002; SOARES et al., 2006).

A maioria dos produtos à base de própolis comercializados no Brasil possuem registro no Ministério da Agricultura, que preconizam os limites para fixação de identidade e qualidade da própolis na Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Os produtos que contêm própolis e que apresentem indicações terapêuticas podem ser registrados como medicamentos específicos segundo a Resolução-RDC nº 132, de 29 de maio de 2003, D.O.U. de 02/10/2003, sendo classificados como opoterápicos (BRASIL, 2003). A comprovação de segurança e eficácia segue a nota técnica da Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos (CATEF, 2005). O consumo de própolis no mundo é estimado em cerca de 700-800 toneladas / ano (DA SILVA et al., 2006). Faltam estatísticas oficiais sobre o volume de própolis produzido anualmente no Brasil, o que é exportado e o que é consumido pelo mercado interno. Existem apenas avaliações de produtores e exportadores que situam a produção brasileira entre 49 e 150 toneladas anuais. O cálculo de 150 toneladas pode estar superestimado, mas é mais realista. O consenso é que o Brasil é o segundo maior produtor mundial, logo atrás da China (LIMA, 2006). Nas últimas décadas, foi observado um aumento, em todo o mundo, no uso de produtos naturais (HAYACIBARA et al., 2005). Entretanto, apesar desse aumento e do fato de existir uma considerável quantidade de informações disponíveis no que concerne aos aspectos químicos e biológicos da própolis, sua aplicação terapêutica ainda pode ser considerada incipiente (FUNARI & FERRO, 2006).

Atualmente, inúmeros trabalhos demonstram as atividades biológicas da própolis bem como suas aplicações terapêuticas. Essas virtudes conduzem a própolis a um verdadeiro modismo. Porém, é preciso estabelecer alguns pontos importantes. Apesar de ser aceita por órgãos regulatórios como produto com finalidade terapêutica, a própolis precisa ser padronizada quimicamente para garantir sua qualidade, eficácia e segurança. O que não é fácil, pois, como já foi visto vários fatores podem interferir na sua composição química. Também são necessários estudos que relacionem a composição química com a atividade biológica, pois assim seria possível correlacionar o tipo de própolis com a sua aplicação terapêutica. Isso é uma tarefa imprescindível para um mercado cada vez mais exigente em todo o mundo.

A própolis e seus componentes químicos isolados são substâncias que apresentam ações antiinflamatória (PAULINO et al., 2003; CHIRUMBOLO et al., 2011; BARROSO et al., 2011) antifúngica (QUINTERO-MORA et al., 2008), antibacteriana (FERNANDES JÚNIOR et al., 2005), antioxidante (PADMAVATHI et al., 2006; ISLA et al., 2009) e anticarcinogênica (KIMOTO et al., 2000; ORSOLÍĆ et al., 2005).

Os flavonóides, componentes químicos da própolis, são compostos fenólicos com um radical hidroxila diretamente ligado ao anel aromático, que favorecem o sequestro de radicais livres (BOSIO et al., 2000; PADMAVATHI et al., 2006). Além dos flavonóides, outros compostos ativos são comumente encontrados em amostras de própolis, como os derivados do ácido cafeico, que possuem atividade imunomoduladora (BOSIO et al., 2000; CASTALDO; CAPASSO, 2002).

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas *Apis mellifera* a partir de resinas vegetais com objetivo de impermeabilização e proteção da colméia contra fungos e bactérias (BANKOVA, 2005; DUAILIBE et al., 2007). Além disso, a própolis é utilizada para compor a parede dos favos de mel e embalsamar os insetos invasores mortos, o que evita a decomposição dos mesmos (BANKOVA, 2005).

O conceito e a função da própolis estão de acordo com a etimologia da palavra, uma vez que no grego, *pro* = em favor de; *polis* = cidade, ou seja, proteção à cidade das abelhas (FERREIRA et al. 2010). Atualmente, há mais de 300 compostos químicos identificados em amostras de própolis de diferentes origens geográficas (KHALIL, 2006), como os alcoóis, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavononas, flavonóides, ésteres de hidrocarboidratos, ácidos graxos, cetonas, terpenóides e derivados, esteróides, açúcares e compostos inorgânicos. As variações sazonais influenciam na composição e nas propriedades biológicas da própolis (NUNES et al., 2009; KHALIL, 2006; LI et al., 2010).

A Odontologia é uma das áreas da saúde onde a própolis vem sendo muito utilizada e encontram-se na literatura numerosos artigos que descrevem suas aplicações nessa área. KOO e colaboradores realizaram testes microbiológicos contra a bactéria *Streptococcus mutans*. Essa bactéria é responsável pela formação da placa bacteriana e está envolvida no processo de dissolução do dente, causado quando o pH da boca se torna ácido, formando a cárie. Para esses estudos, os pesquisadores utilizaram três tipos de amostras de própolis oriundos de regiões

diferentes do Brasil: da Bahia, de Minas Gerais e do Rio Grande do Sul. A própolis da Bahia mostrou melhor eficácia quando comparada com as outras (KOO et al, 2002.; KOO et al, 2000).

KOO e colaboradores continuaram seus estudos com a bactéria *Streptococcus mutans*, em testes contra a cárie dentária. Utilizaram amostras de própolis provenientes dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo. Os testes foram realizados *in vivo* em ratos e humanos voluntários. Nos primeiros, houve a redução de 60 a 70% da placa bacteriana e nos últimos de 40%. Embora a própolis, substância natural, reduza apenas 40% da placa bacteriana em humanos, não produz efeito colateral ao contrário da clorexidina, substância química que reduz 70%, porém pode causar efeitos colaterais (KOO et al, 2002).

PARK e colaboradores classificaram as amostras de própolis, coletadas de diferentes regiões do Brasil, em doze grupos, de acordo com suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Verificaram que as amostras de própolis obtidas desses doze grupos possuíam atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e contra *Staphylococcus aureus*. Constataram que alguns tipos de própolis possuem atividade contra tais bactérias, enquanto que outros não, dependendo de sua região de origem e concluíram que para o combate da bactéria *Streptococcus mutans* é interessante utilizar a própolis proveniente da Bahia e/ou do Paraná e para a bactéria *Staphylococcus aureus* é mais indicado utilizar a resina produzida na Bahia, pois esta inibiu fortemente a bactéria. Assim, é necessário utilizar a própolis específica para o combate das bactérias em questão (PARK, et al, 2000).

Dentre os ácidos fenólicos a ação antibactericida está relacionada aos ácidos ferúlico, cafeico, derivados do ácido cinâmico (RUSSO, et al, 2004; FUNARI, et al, 2006).

Constata-se então, que o mecanismo da atividade antimicrobiana é complexo e pode ser atribuída ao sinergismo entre alguns componentes químicos, principalmente os flavonóides e ácidos fenólicos (MARCUCCI, et al, 1996; SFORCIN, et al, 2005).

Apesar da classificação das própolis brasileiras, há estudos relatando que a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade regional, o que poderá influenciar o seu potencial (SFORCIN *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2007). Estudiosos afirmam que as própolis de regiões temperadas (oeste da Ásia, Europa e América do Norte) possuem composição química semelhante entre si, porém são diferentes quando comparadas as própolis de regiões tropicais devido a diferença na vegetação (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2007).

Os fatores que influenciam a preferência das abelhas por uma determinada fonte vegetal não são conhecidos, sabe-se apenas que elas são seletivas na coleta (SALATINO *et al.*, 2005). Uma vez que, utilizam a própolis como anti-séptico, possivelmente a escolha da planta está relacionada com a atividade antimicrobiana da resina (SHAINLER & KAFTANOGLU, 2005).

Os flavonóides são separados em diversas classes a depender das características químicas e biossintéticas: flavonas, flavanol, flavonona, isoflavona, antocianidinas (OLDONI, 2007).

Os isoflavonóides são metabólitos secundários de plantas com múltiplos efeitos biológicos e farmacológicos (OLDONI *et al.*, 2011). A presença destes era conhecida apenas em amostras de própolis cubana, porém identificaram em amostras de própolis vermelha de Alagoas. Isso demonstra a similaridade entre a própolis vermelha do Brasil e de Cuba (PICCINELLI *et al.*, 2005; DAUGSH, 2007). Entretanto, a presença de isoflavonóides ainda não foi identificada em outras amostras de própolis brasileira (OLDONI *et al.*, 2011).

A formononetina, um isoflavonóide com atividade estrogênica, antiradical e antifúngica foi encontrado em maior quantidade em amostras de própolis vermelha da Paraíba. Essa isoflavona, quando consumida por mamíferos, é metabolizada em daidzeína que é um isoflavonóide presente na soja usado no tratamento de câncer de mama e próstata (MORAES, 2009). Estudos sobre a composição química da própolis podem ajudar a estabelecer critérios para o controle de qualidade das amostras de própolis (HERNANDEZ *et al.*, 2010).

No Brasil, a qualidade da própolis é verificada utilizando parâmetros normatizados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), onde o teor de flavonóides, bem como a composição centesimal da mesma devem ser avaliados. As propriedades biológicas da própolis estão ligadas diretamente a sua composição química. A maioria dos flavonóides e fenólicos identificados na própolis já possuem atividade biológica comprovada. Dentre as propriedades estão às atividades: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (PARK *et al.*, 2002). Alguns estudos também evidenciam a ação da própolis como antiparasitária (STARZYK *et al.*, 1997), inseticida (GAREDEW *et al.*, 2002), anti-herpes (AMOROS *et al.*, 1992), anti-hepática (SUGIMOTO *et al.*, 1999), cicatrizante (ALBUQUERQUE JUNIOR *et al.*, 2009). e ação hormonal (SONG *et al.*, 2002).

Estudiosos afirmam que a própolis apresenta atividade antimicrobiana independente da sua origem, devido ao efeito bactericida e fungicida imprescindível para preservar a vida na

colméia. A atividade biológica da própolis é atribuída às substâncias derivadas das plantas coletadas para a sua produção (BURIOL, *et al.*, 2009).

Hernandez *et al.*, (2010), inferem que duas ou mais espécies vegetais contribuem para a produção da própolis cubana. Por isso, embora seja um produto de origem animal, alguns compostos químicos da própolis são derivados da fonte botânica utilizada pelas abelhas, principalmente aqueles com ação biológica (SALATINO *et al.*, 2005).

A composição química da própolis inclui flavonóides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (HU *et al.*, 2005; HAYACIBARA *et al.*, 2005; OZKUL *et al.*, 2004; MATSUDA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2003).

Há também na sua constituição elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (MARCUCCI, 1996). De todos esses grupos de compostos, certamente o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos flavonóides (LIMA, 2006). A eles, bem como aos ácidos fenólicos, são atribuídas as propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (VOLPI & BERGONZINI, 2006).

1.2 JUSTIFICATIVA

Vários estudos já foram realizados e embora o extrato etanólico de própolis tenha sido avaliado, há ainda necessidade de mais estudos para confirmar os resultados, fazendo várias comparações com extrato de própolis não alcoólico, ainda pouco avaliado sobre este aspecto, alcoólico entre outras associações, justificando a realização dessa pesquisa. A presente temática foi escolhida a partir da observação sobre a problemática da doença cárie dentária que se apresenta como um problema de saúde pública, que embora tenham muitos programas de prevenção em saúde bucal, ainda a Odontologia continua estudando para encontrar resolutividade para a doença.

Considerando que a Saúde tem um papel relevante na atenção integral do indivíduo, esta pesquisa justificou-se, pelo seu perfil preventivo e de promoção da saúde, podendo contribuir com programas de saúde pública para melhorar a qualidade de vida das pessoas.

Quando o controle mecânico do biofilme não ocorre, há o acúmulo da placa bacteriana que é potencialmente cariogênica, e as espécies microbianas como os *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* são ecologicamente selecionadas, passando a dominar a cavidade bucal, fato que expõe o indivíduo a uma situação de risco da doença cárie dentária de forma que podem ter o surgimento de manchas brancas ativas na superfície do esmalte dentário, as quais são o primeiro sinal clínico da doença, cujo controle e inativação são possíveis de serem executados através de controle mecânico e químico da placa bacteriana através das técnicas de higiene oral e aplicação de fluoretos bem como o uso de antissépticos bucais. Os fluoretos e a clorexidina são muito utilizados como coadjuvantes no processo do controle químico do biofilme dental. Portanto, com o crescente interesse de produtos naturais, a própolis vem sendo muito pesquisada, principalmente devido a suas diversas propriedades e perfil anti-bacteriano.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi analisar quimicamente e microbiologicamente os efeitos dos extratos de própolis que foram realizados em laboratório com amostras obtidas de regiões do Estado do Paraná, sobre a microbiota da doença cárie dentária, com a intencionalidade futura de desenvolvimento de antisséptico bucal à base de própolis.

Objetivos Específicos

Avaliar o perfil químico de todas as própolis: por cromatografia líquida de alta eficiência;

Avaliar a quantidade inibitória mínima da própolis com relação às bactérias: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*;

Comparar o perfil químico da própolis com a capacidade inibitória mínima;

Avaliar o perfil de oxidação das amostras de própolis e comparar o melhor perfil para o desenvolvimento do enxaguante bucal.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J.A.; REIS, F. P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M.A.G. ; CARDOSO, J. C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology* (Print). 2009, 27, 1105-1110.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMAN, J. PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*. 2005. 25(4), 909-915.

ALMEIDA, R.V.D.; CASTRO, R.D.; PEREIRA, M.S.V.; PAULO, M. Q.; SANTOS, J. P.; PADILHA, W. W. N. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.* 2006; (1): 87-92.

AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L. E.; CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 1992. 23, 231-240.

BAAKILINI, M. F.; LARA, E. H. G; PANZERI, H. Adición de própolis em formulaciones de dentifricios. Evaluación de SUS propriedade y estabilidad. *Ver Fola Oral*, São Paulo, v.2, n.6, p.130-133, dez.1996.

BACKER-DIRKS, O. Post-eruptive changes in dental enamel. *J. Dent Rev.* 1966; 3(suppl): 503-11.

BANKOVA, V. Chemical diversity of própolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, Limerick, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, Aug-2005.

BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; JORGE, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm.* 2009, 22(3), 318-22.

BARROSO, P.R. et al. Effect of própolis on mast cells in wound healing. *Inflammopharmacology*, Basel, Dec. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Publicado no DOU de 23/01/2001, Seção 1, p.18, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº132 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. In: *site* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BIJELLA, M. F. ZANELA, N. L. M.; T. B.; ROSA, O. P. S. The influence of muothrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesq Odontol Bras*, São Paulo, v.16, n.2, p. 101-106, abr./jun. 2002.

BOSIO, K. AVANZINI, C. DAVOLIO, A. OZINO, O. SAVOIA, D. In vitro activity of própolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in applied microbiology*, oxford, v. 31, n. 2, p. 147-174, aug, 2000.

BUISCHI, Y.; AXELSSON, P.; BARBOSA, M. F. Z.; MAYER, M. P. A.; PRADO, M. C. Q. B.; OLIVEIRA, L. B. Salivary streptococcus mutans and caries prevalence in Brazilian Schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17: 28-30.

BUISCHI, Y. P. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHIMDT, E.M.; SANTOS, M.T.; ROSA, M.R.; QUINAIA, S.P.; TORRES, Y.R.; SANTA, H.S.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, P.M.P.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Quimica Nova*. 2009, 32(2), 296-302.

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1.Própolis. *Micróbios*, 1990;62:19-22.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, Milano, v. 73, suppl. 1, p. S1-S6, Nov. 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J.A; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e Nordeste do Brasil: influencia da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quimica Nova*. 2007, 30(7), 1512-1516.

CATEF - Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos.

Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis. 2005, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>, consultado em: 10/01/2011.

CUESTA-RUBIO, O., PICCINELLI, A.L., FERNANDEZ, M.C., HERNANDEZ, I.M., ROSADO, A. RASTRELLI, L. Chemical characterization of Cuban própolis by HPLC-PDA,

HPLC-MS, and NMR: the brown, red and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 7502-7509.

CHIRUMBOLO, S. Propólis as anti-inflammatory and allergic compounds: which role for flavonoids? *International immunopharmacology*, Amsterdam, v. 11, n. 9, p. 1386-1387, sept. 2011.

CURY, J. A.; ROCHA, E. P.; KOO, H.; FRANCISCO, S. B.; CURY, A. A. D. B. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. *Braz Dent J*, Ribeirão Preto, v. 11, n.1, p.29-34, jan./junh. 2000.

CURY, J. A. TENUTA, L. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res*, 2009; 23(1): 23-30.

DA SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; VIDAL, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem* 99: 431-435. 2006.

DAUGSCH, A. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. 2007.

DE CARLI, A. D. Capacidade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* associada ao fluoreto de sódio no controle do biofilme dental [Dissertação]. Campo Grande: Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2007.

DUAILIBE, S. A.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F.J. Effect of a própolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. *Journal of applied oral science*, Bauru. V. 15, n. 5, p. 420-423, oct, 2007.

DUARTE, C. A.; KFOURI, L. S. Ação da própolis sob a forma de bochechos na formação da placa bacteriana e gengivite. *RGO*, Porto Alegre, v.47, n.2, p.82-84, abr./jun. 1999.

FEATHERSTONE, J. D. B. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*, 1999; 27:31-40.

FEATHERSTONE, J.D.B. Remineralization, the natural caries repair process-the need for new approaches. *Adv. Dent. Res*, 2009; 21:4-7.

FERNANDES JUNIOR, A. et al. Própolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. v. 100, n. 5, p. 563-566, Aug, 2005.

FERREIRA, A. B. H.; ANJOS, M.; FERREIRA, M. B. *Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa*. 5. ed. Curitiba: Positivo, 2010. 2220 p.

FERREIRA, R. C. V.; VALENTE, P. H. M.; BARBOSA, A. D. Atividade antibacteriana da própolis. *LECTA USF, Bragança Paulista*, v.14, n.2, p. 65-93, jul./dez. 1996.

FUNARI, C. S.; FERRO, O. Análise de própolis. *Ciênc.Tecnol. Aliment.* 26(1), 171-178.2006.

GAREDEW, A.; SCHMOLG, E.; SCHRICKER, B. E.; LAMPRECHET, I. Microcalorimetric investigation of the action of propolis on *Varroa destructor* mites. *Thermochimica Acta*, 2002. 382, 211-220.

GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C. G. D. C.; MAYER, M. P. A. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ São Paulo, SP*, v. 10, n. 4, p.251-256, out/dez. 1996.

HAYACIBARA MF, KOO H, ROSALEN PL, DUARTE S, FRANCO EM, BROWEN WH, IKEGAKI M, CURY JA 2005. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol* 101: 110-115.

HERNANDEZ, I. M., CUESTA-RUBIO, O., FERNANDEZ, M. C., PEREZ, A.R., PORTO, R.M.O. PICCINELLI, A.L., RASTRELLI, L. Studies on the constituents of yellow Cuban própolis: CG-MS determination of triterpenoids and flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58, 4725-4730.

HU F, HEPBURN HR, LI Y, CHEN M, RADLOFF SE, DAYA S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute infl ammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 100: 276-283. 2005.

IKEDA, T.; SANDHAM, H. J.; BRADLEY, E. L. Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caíres in Negro children. *Arch Oral Biol*, 1973; 18: 555-66.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res*, Basel, v. 25, n. 5, p. 347-351, 1991.

ISLA, M.I. et al. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. *Journal of medicinal food*, Larchmont, v. 12, n. 6, p. 1334-1342, Dec. 2009.

KHALIL, M. L. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, Bangkok, v.7, n.1, p.22-31, jan-mar, 2006.

KIMOTO, T. et al. Renal carcionogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C. *Pathology international*, Carlton South, v. 50, n. 9, p. 679-689, sept. 2000.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A. Effect de *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res*, Basel, v. 33, n. 5, p. 393-400, Sep./Oct. 1999.

KOO, H.; GOMES, B. P.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 45, n. 2, p. 141-148, Feb.2000.

KOO, H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res*, Basel, v. 36, n. 6, p. 445-448, Nov./Dec. 2002.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, May. 2002.

KOO, H.; PEARSON, S. K.; SOOTT-ANNE, K.; ABRANCHES, J. CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y. K.; MARQUIS, R. E.; BOWEN, W. H. Effects of apigenin and tt-farsenol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol*, 2003; 17: 337-43.

KOO, H.; SCHOBEL, B.; SCOTT-ANNE, K.; WATSON, G.; BOWEN, W. H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y.K. Apigenin and tt-farnesol with fluorid on *s. mutans* biofilm and dental caries. *J. Dent Rest*. 2005; 84 (11): 1016-1020.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; KNEZEVIC, S.V. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharma*, 2005. 55, 423–430.

LANG, N.P.; HOTZ, P.R.; GUSBERTI, F.A.; JOSS, A. Longitudinal clinical and microbiological study on the relation ship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in humans. *Oral Microbiol Immunol*, 1987; 2: 39-47.

LI, F. et al. Cytotoxicity of constituents from Mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines. *Natural product communications*, Westerville, v. 5, n. 10, p. 1601-1606, Oct. 2010.

LIMA, M. G. A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, 2006.

LOESCHE, W. J.; STRAFFON, L.H. Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect Immun*, 1979; 26(2): 498-507.

LOESCHE, W. J. Role of *streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev*. 1986; 50(4): 353-80.

MALTZ, M. Cárie dental: Fatores relacionados. In: PINTO, V. G. Saúde bucal coletiva. São Paulo: Santos, 2000. P. 319-339.

MALTZ, M.; BARBACHAN E SILVA, B.; CARVALHO, D. Q.; VOLKWEIS, A. Results after two years of non-operative treatment of occlusal surface in children with high caries prevalence. *Braz Dent J*, 2003; 14(1): 48-54.

MANARA, L. R. B.; ANCONI, S. I.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W. A. Utilização da própolis em Odontologia. *Ver FOB*, 1999; 7(3/4):15-20.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 1996. 19, 529-535.

MARSH, P. D. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc. Finn. Dent. Soc.* 1991; 87: 515-25.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Rev.* 1994; 8(2):263-71.

MATSUDA AH, MACHADO LB, MASTRO NL. Thermal analysis applied to irradiated propolis. *Radiat Phys Chem* 63:353-355, 2002.

MORAES, E.; OTA, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T. Influência da própolis na contagem de estreptococcus do grupo mutans. In: Reunião Anual da SBPqO, 13, 1996, São Paulo: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 1996. p. 111.

MORAES, C.S. Isolamento e identificação de formononetina da própolis de João Pessoa-PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. São Paulo, SP, Brasil, 2009.

MOTA, H. C. N. Avaliação clínica da própolis sobre a placa bacteriana e gengivite. 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia Preventiva). Natal: Faculdade de Odontologia da UFRN; 2000.

MURRAY, M.C.; WORTHINGTON, H. V.; BLINKHORN, A.S. A study to investigate the effect of a propoliscontaining mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. *J Clin. Periodiol*, 1997; 24: 796-798.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Diagnosis and management of dental caries throughout life. NIH Consensus Statement, 2001; 18: 1-30.

NUNES, L.C.C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A.S.O.; RUFINO, D.A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITO, A. M. G. L.; ROLIM NETO, P.J. Variabilidade sazonal dos constituintes

da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009. 19(2B), 524-529.

OOGARD, B.; SEPPA, L. ROLLA, G. Professional topical fluoride applications-clinical efficacy and mechanism of action. *Adv. Dent. Res* 1994; 8(2): 190-201.

OLDONI, T. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. Dissertação de mestrado, Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

OLDONI, T. L.C.; CABRAL, I.C.R.; D'ARCEA, M.A.B.R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology*. 2011, 77, 208–213.

ORSOLIĆ, N. et al. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biological & pharmaceutical bulletin*, Tokyo, v. 28, n. 10, p. 1928-1933, Oct. 2005.

OTA, C, VALENTE, P. Atividade da própolis sobre as bactérias isoladas da cavidade bucal. *Lecta-UFS*. 16: 73-77, 1998.

OZKUL Y, SILICI S, ERÖGLU E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* 12: 742-747. 2004.

PADMAVATHI, R.; SENTHILNATHAN, P.; SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*, New York, v. 143, n. 3, p. 349-354, July 2006.

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, fev./mar. 1999.

PARK, Y. K. ; KOO, M. H.; ABREU, J.A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol* 1998; 36: 24-8.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*. 2000. 58, 3-7.

PARK, Y.K, ALENCAR, S.M, AGUIAR, C.L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. .50, 2502-2506.

PAULINO, N. et al. Bulgarian própolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *Journal of pharmacological sciences*, Kyoto, v. 93,n.3, p. 307-313, Nov. 2003.

PEREIRA AS, SEIXAS FRMS, AQUINO Neto FR 2002. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova* 25: 321-326.

PEREIRA, J. V. Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental. 88f. Tese (Doutorado em Estomatologia), João Pessoa: UFPB/UFBA, 2002.

PETERLINI, C.; ELMADJAN NETO, M.; VALLE, P. D.; ROMERO, S. S. Efeitos adversos da clorexidina. *Rev Odontol Univ Santo Amaro, São Paulo*, v. 3, n. 1, p. 32-34, jan./jun. 1998.

PICINELLI, A.L; CAMPO, M.; CUESTA-RUBIO,O.; MARQUEZ, I.; DE SIMONE, F. RASTRELLI, L. Isoflavonoids isolated from cuban própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 9010-9016.

QUINTERO-MORA, M. L. et al. Effect of Mexican própolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. *Revista Iberoamericana de micologia*. Madrid. V.25, n.1, p. 22-26, Mar. 2008.

ROCHA L, DOS SANTOS LR, ARCENIO F, CARVALHO ES, LUCIO EMRA, ARAUJO GL, TEIXEIRA LA, SHARAPIN N 2003. Otimização do processo de extração de própolis através da verifi- cação da atividade antimicrobiana. *Rev Bras Farmacogn* 13: 71-74.

RUSSO, A.; LONGO, R. E.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2004. 73, 21-29.

SANTOS, V. R. Própolis: antibiótico natural alternativo em Odontologia (revisão de literatura). *Rev CROMG*, Belo Horizonte, v. 5, n. 3, p. 192-195, set./dez. 1999.

SFORCIN, J.M, FERNANDES J.R.A, LOPES, C.A.M., BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*. 2000.73, 243-249.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, A.; Jr. LOPES, C.A.M.; FUNARI, S.R.C.; BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 2001. 7, 139-144.

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and it source plant on antibody production. *J Ethnopharmacol*, 2005; 98: 301-305.

SONG, Y.S.; JIN, C.B.; JUNG, K.J.; PARK, E.H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002. 82, 89-95.

SUGIMOTO, Y.; TARUMI, T.; KANEKO, Y.; ISAYAMA, S.; KAWAI, N.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H. E.; KAMEI, C. Effect of propolis extract on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 1999. 22, 1237-1239.

STEINBERG, D.; KAINE, G.; GEDALLA, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am J Dentistry*, San Antonio, v. 9, n.6, p. 236-239, Dec. 1996.

STARZYK, J.; SCHELLER, S.; SZAFLAVISKI, J.; MOSKWA, M. E.; STOJKO, A. Biological properties and clinical application of propolis II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneimittel-Forschung*, 1997. 27, 1198-1199.

STOOKEY, G. K. Caries prevention. *J. Dent Educ*, 1998; 62:803-11

SAHINLER, N. & KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. *Natural Product Research*. 2005. 19(2), 183-188.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRIL, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. 2^o ed, Cambridge: Oxford University Press. 2005, 33-38.

SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Rev Bras Farmacogn*. 2006.16, 447-454.

TRUSHIVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMONA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *e CAM*. 2006. 3, 249-254.

VINHOLIS, A. H. C. et al. Mecanismo de ação da clorexidina. *Rev Periodontia*, São Paulo, v.5, n.3, p.281-283, jan./jun. 1996.

VOLPIN, BERGONZINI G. Analysis of flavonoids from propolis by on line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42: 354-361, 2006.

WOISKY, R. G.; GIESBRECHT, M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera*. *Rev Farm Bioquím Univ São Paulo*, SP, v.30, n.1, p. 19-21, jan./jun. 1994.

ZANELA, N. L. M. et al. Influência de bochechos com soluções de digluconato de clorexidina a 0,2%, fluoreto de sódio a 0,05% pH 3,4 e esteviosídeo a 0,1% na inibição da placa dentária “in vivo”, em crianças. *Rev Fac Odontol Bauru*, Bauru, v.5, n. 1/2, p. 71-78, jan./jun. 1997.

ZÁRATE-PEREIRA, P. Avaliação in situ da ação de própolis de *Apis mellifera* no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental. 116f. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

ZÁRATE-PEREIRA, P. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%; fluoreto de sódio 0,2% e própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% sobre níveis salivares de estreptococcus do grupo mutans em pacientes cárie-ativos. 74f. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

ZERO, D. T. Dental caries process. Dent clin North Amer, Philadelphia, v.43, p.635-663, oct.1999.

CAPÍTULO II

ANÁLISE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PARA POSSÍVEL APLICAÇÃO EM FORMULAÇÕES DE ENXAGUANTES BUCAIS PARA AÇÃO ANTI-CÁRIE

RESUMO: A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* através da coleta de brotos, flores e exsudatos de plantas. Várias substâncias químicas têm sido isoladas da própolis, sendo os flavonóides e os fenóis considerados os principais compostos biologicamente ativos, onde se destaca a expressiva atividade antimicrobiana e antioxidante, o que indica que o extrato da própolis tem potencial para ser usado como enxaguante bucal, no combate à cárie. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil químico e ação antimicrobiana do extrato etanólico da própolis de diferentes regiões do Estado do Paraná. Para isso as amostras foram submetidas a vários testes para a determinação de suas características químicas, atividade antimicrobiana, e por fim sua ação sobre o revestimento dental. As amostras de própolis mostraram para as colheitas analisadas, valores para cinzas, cera, sólidos solúveis e resíduos insolúveis dentro dos limites da legislação vigente. Dentre os compostos presentes, destacou-se em todas as amostras o Artepillin C, que tem inúmeras propriedades biológicas, em especial antimicrobiana e antioxidante que foram comprovadas pelos testes realizados. Observou-se ainda que quando imersos na solução de própolis, os dentes apresentam melhor aspecto e nitidez nos túbulos dentinários do que quando não são expostos a nenhuma substância. Estes resultados demonstram que a própolis verde tem potencial para ser usada em solução como enxaguante bucal, com a vantagem de ser um produto natural.

Palavras chave: Própolis, Análise Química, Ação Antimicrobiana, promoção em saúde bucal.

DETERMINATION OF CHEMICAL COMPOSITION AND MICROBIOLOGICAL
PROPOLIS EXTRACTS AND POSSIBLE APPLICATION OF FORMULATIONS
MOUTHWASHES ACTION ANTI-DECAY

ABSTRACT: Propolis is a resinous substance produced by bees of the species *Apis mellifera* by collecting shoots, flowers and plant exudates, in which they add salivary secretions, wax and pollen for the preparation of the final product. Several chemicals have been isolated from propolis. Flavonoids and phenols are considered the main biologically active compounds, in which highlights the significant antimicrobial and antioxidant activities, indicating that the extract of propolis has potential to be used as a mouthwash to combat caries. This study aims to evaluate the chemical profile and antimicrobial activity of the ethanol extract of propolis from different regions of the state of Paraná. For this, the samples were subjected to various tests to determine their chemical composition, antimicrobial activity, and action on dental coating. The propolis samples showed values for ash, wax, soluble solids and insoluble residues within the bounds of law. Among the present compounds, Artepillin C stood out in all the samples. It has numerous biological properties, especially antimicrobial and antioxidant, which has been proved by tests carried out. It was also observed that when immersed in the solution of propolis, the teeth have a better look and clarity in the dentinal tubules than when they are not exposed to any substance. The results show that the propolis has the potential to be used as a mouthwash solution, with the advantage of being a natural product.

Keywords: Propolis, chemical analysis, Antimicrobial action, promotion of oral health.

2.1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* através da coleta de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (KOO et al., 2002b;). É encontrada nas colméias, onde é responsável pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento anti-séptico (SANTOS, 1999).

A composição química da própolis inclui flavonóides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (Hu et al., 2005; Hayacibara et al., 2005; Ozkul et al., 2004; Matsuda et al., 2002; Rocha et al., 2003). Há também na sua constituição elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (Marcucci, 1996). De todos esses grupos de compostos, certamente o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos flavonóides (Lima, 2006). A eles, bem como aos ácidos fenólicos, são atribuídas as propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (Volpi & Bergonzini, 2006, KOO et al 2002).

A própolis tem alvo de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, etc. (Bankova, 2005; Kosalec et al., 2005; Alencar et al., 2005; Simões et al., 2008).

A literatura descreveu atuação antimicrobiana expressiva do extrato de própolis contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FERREIRA; VALENTE; BARBOSA, 1996; WOISKY; GIESBRECHT; SALATINO, 1994), e especificamente contra bactérias colonizadoras do biofilme, (GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996), além do efeito inibitório sobre a síntese de glucano (KOO et al, 2000) somado ao fato de sua capacidade de inibir o desenvolvimento da lesão cáriosa em animais (IKENO; MIYAZAWA, 1991; KOO et al., 1999).

As atividades antibacterianas e antifúngicas da própolis caracterizam as propriedades biológicas mais extensivamente estudadas (KUJUNGIEV et al., 1999). São atribuídas principalmente à flavonona pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletílico do ácido caféico, com um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição do RNA-polimerase

bacteriano (UZEL et al., 2005). Outros componentes como os flavonóides, o ácido caféico, ácido benzóico e ácido cinâmico, provavelmente agem na membrana ou parede celular do microorganismo, causando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO et al., 2005).

Sua incorporação em produtos de higiene oral tem sido estimulada pelos resultados promissores obtidos tanto na formulação de dentifrícios (BAAKILINI; LARA; PANZERI, 1996; PANZERI et al., 1999) como no emprego em soluções de bochecho, reduzindo os níveis de *S. mutans* (MORAES et al, 1996, STEINBERG; KAINE; GEDALLIA, 1996; ZÁRATE-PEREIRA, 1999), o acúmulo de biofilme (KOO et al., 2002) e a doença gengival (DUARTE; KFOURI, 1999; MOTA, 2000).

A solução para bochecho de própolis a 6,25% reduziu significativamente os níveis de *Streptococcus mutans*, atuou sobre as condições de doença gengival e acúmulo de biofilme, demonstrando comportamento semelhante ao da clorexidina, podendo ser indicado como agente químico terapêutico (ALMEIDA et al., 2006).

A utilização de extratos etanólicos de própolis (EEPs) no campo da Cariologia tornou-se realidade quando estudos relataram sua atividade sobre a inibição de agentes, microorganismos relacionados à cárie dentária (KOO et al., 2005; ALMEIDA et al. 2006) e sobre o processo de formação do biofilme cariogênico / fatores de virulência bacteriana que influenciam na cariogenicidade deste (KOO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2006). O presente estudo visa avaliar o perfil químico e a atividade antimicrobiana do extrato da própolis verde de diferentes regiões do Estado do Paraná, determinando seu potencial para uso como enxaguante bucal.

2.2 METODOLOGIA

Foram analisadas seis (6) amostras de própolis de regiões do Estado do Paraná, quanto às suas características químicas, ação antibacteriana e efeito do extrato alcoólico sobre o revestimento dental.

As própolis analisadas foram coletadas de colméias de abelhas *Apis mellifera* do tipo *Langstroth*, sendo as amostras adquiridas através de apiários das regiões de Cambará, Cianorte, Ilha Grande, Maringá, Paranavaí e Uniflor.

Análise da própolis

Umidade

Para análise de umidade, foi pesado aproximadamente 1 g de cada amostra de própolis em um recipiente apropriado. Depois de pesadas, as amostras foram levadas à estufa a 70°C por 1 hora, em seguida as amostras passaram para o resfriamento e pesadas novamente. O procedimento foi repetido até obter-se peso constante.

Teor de Cinzas

Em relação a cinzas, 2,0 g de cada amostra de própolis foi pesado em cadinho, em seguida, os cadinhos foram levados à mufla na temperatura de 600°C, deixando-se por aproximadamente 2 horas. Esta análise foi realizada em triplicata e com os dados, foram calculados a porcentagem de cinzas.

Determinação de resíduos insolúveis, sólidos solúveis e cera

Para a determinação dos valores de resíduos insolúveis, sólidos solúveis e cera, foi realizado à extração em aparelho tipo *Soxhlet*. Em um cartucho, feito com papel de filtro de peso conhecido, após secagem em estufa, foi pesado aproximadamente 10 g da amostra de cada amostra própolis e colocado no aparelho *Soxhlet*, para extração com álcool de cereal por 24 horas. Ao término do processo, o precipitado obtido da extração em *Soxhlet* foi colocado em um béquer, esfriado à temperatura ambiente e levado à geladeira para posterior filtragem em funil de *Buchner* forrado com papel filtro apropriado.

Preparação dos Extratos Etanólicos de Própolis (EEP)

As amostras de própolis (1 g) foram extraídas com etanol (10 mL) durante 24 h, a 70°C, em aparelho *Soxhlet*. Os extratos obtidos foram filtrados e acondicionados em vidro âmbar a 5°C. Todos os EEP das amostras foram preparados a 10%.

Avaliação da Capacidade Antioxidante Frente ao ORAC

A capacidade antioxidante foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). Para análise de extrato bruto e sub-frações provenientes de sua partição foram preparadas soluções nas concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL e 250 µg/mL em álcool de cereais, constituindo as soluções

amostra. Solução etanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) 0,3 mM (1 mL) foi adicionada à amostra (2,5 mL) nas diferentes concentrações, deixando-se reagir em temperatura ambiente. Álcool de cereais (1 mL) e a solução amostra (2,5 mL) foram utilizadas como branco. Solução de DPPH 0,3 mM (1,0 mL) e álcool de cereais (2,5 mL) foram usados como controle negativo. Após 30 minutos os valores de absorvância foram medidos a 518 nm e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante ou porcentagem de DPPH consumido (AA%), utilizando-se para isso a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \{[(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100] / \text{Abs controle}\}.$$

O experimento foi realizado em triplicata.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

Para as análises cromatográficas dos EEPs, 1 mL de cada extrato foi adicionado em 15 mL de água ultrapura (sistema Milli-Q, Millipore, Billerica, USA) em um funil de separação contendo 25 mL de acetato de etila. A solução obtida foi transferida para um béquer contendo sulfato de sódio anidro, e em seguida deixada em recipiente adequado em banho-maria (45°C) para evaporação dos compostos líquidos. O resíduo seco obtido foi retomado em metanol, filtrado em membrana Milipore® com porosidade de 0,45 µm e analisado por cromatografia.

Na análise foi utilizado um sistema CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) acoplada a um detector UV/Vis, utilizando uma coluna Phenomenex® Luna PFP (2) (pentafluorofenil), com partículas de 5 µ, 100 Å, com 250 x 4,6 mm e pré-coluna do mesmo material e porosidade, como fase estacionária. (Duas fases móveis foram utilizadas: solução aquosa contendo ácido acético 5% (v/v) e metanol (Methanol Baker HPLC Solvent, Mallinckrodt Baker Inc., Philipsburg, NJ, USA) e solução aquosa de acetonitrila 2,5% (v/v) e metanol, com fluxo de 1,0 mL/minuto, também para otimizar as condições cromatográficas). A detecção foi realizada a 310 nm e o tempo de corrida foi de 30 minutos. Para as análises foram utilizadas alíquotas de 20 µL, com três repetições para cada extrato analisado. Os resultados foram expressos em mg/g de ESP. Na fase móvel utilizou-se gradiente não-linear com metanol, água ultrapura e ácido acético a 5 %, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Sistema eluente em gradiente não-linear utilizado como fase móvel

| Tempo (minutos) | Metanol (%)^a |
|------------------------|--------------------------------|
| 0.00 | 55 |
| 5.00 | 58 |
| 7.50 | 62 |
| 25.00 | 85 |
| 30.00 | 100 |

^aFase aquosa contendo ácido acético 5%

Análise da Ação dos EEPs sobre o Revestimento Dental por Microscopia Eletrônica de Varredura

Dentes decíduos e permanentes foram lavados com água e sabão, e em seguida limpos com álcool. Os mesmos foram colocados em tubos de ensaio previamente identificados, contendo os extratos de própolis e para comparação foi realizado o mesmo procedimento com a clorexidina 0,12%. Durante dois meses, estes foram imersos e retirados das soluções semanalmente e como controle foi mantido dentes limpos sem imersão em qualquer substância. Após este período e com os dentes secos, foram feitos cortes com brocas diamantadas em forma de lápis, número 1092, com motor de alta rotação. Os fragmentos (decíduos e permanentes), que contém esmalte, dentina e polpa foram colocados sobre a superfície de uma fita dupla face aderida a um porta amostra de alumínio e em seguida depositado em sua superfície uma fina camada de substância condutora (ouro) através de um metalizador Balzer, modelo MED 020. As micrografias foram obtidas em um microscópio SHIMADZU modelo SS 550, equipado de microssonda com detector de energia dispersiva (EDS). A tensão de aceleração utilizado foi de 15 KeV.

Avaliação da Ação Antimicrobiana

Linhagens de Bactérias

Neste estudo, foram utilizadas as cepas padrões de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e o experimento realizado em capela de fluxo laminar, em triplicata para cada extrato de própolis.

As linhagens das bactérias foram conservadas em meio líquido BHI a 35°C e quando necessário, foram duplamente repicadas em meio ágar Muller Hinton em intervalos de 24 h antes de serem utilizadas.

Inóculo de Bactérias e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As linhagens das bactérias (*Streptococcus mutans*, *staphylococcus aureus*) foram ativadas em caldo Muller Hinton, a 37°C por 24 h. Após o desenvolvimento, a padronização do inóculo foi ajustada comparando-se à escala 0,5 McFarland. A seguir foi realizada a padronização do inóculo em solução salina. A partir da escala de McFarland foi diluído 1:10 em caldo Muller Hinton estando o inóculo pronto para a aplicação.

Para determinação da CIM foi utilizado o protocolo M7-A7 do National Committee for Clinical Laboratory Standards, atual CLSI (NCCLS, 2006). Para tanto, foram utilizadas microplacas de 96 poços, que contêm 8 linhas e 12 colunas. O meio de cultura que foi utilizado é o meio caldo Muller Hinton, do qual foram colocados 100 µL em cada poço da placa. Em seguida foram adicionados 5 µL do inóculo de microrganismo. A coluna 1 foi usada para o controle negativo do teste, onde adicionou-se ao meio de cultura apenas o EEP. Nos poços da coluna 2 acrescentou-se 100 µL do EEP a ser testado, em concentração de 2.000 µg/mL, e após homogeneização passado 100 µL deste para os poços da coluna 3, e assim sucessivamente até a coluna de número 11, onde o mesmo volume (100 µL) é descartado, os poços da coluna 11 também serviram para o controle de turbidez. A coluna 12 foi considerada como controle positivo, contendo apenas a suspensão de células de microrganismo ($1,0 \times 10^4$ UFC/mL) e o meio de cultura.

Após a montagem, a placa foi incubada em estufa a 37° C e a leitura realizada após 24 h. (Os testes de sensibilidade foram realizados como o descrito pelo National Committee for

Clinical Laboratory Standards, atual CLSI (NCCLS, 2006) segundo o protocolo M7-A7). A leitura foi feita observando-se o desenvolvimento do microrganismo (turvação) em relação ao controle negativo, isto é, ausência de crescimento. Foi determinada como CIM a menor concentração do extrato de própolis onde não ocorreu o desenvolvimento dos microrganismos.

Neste estudo, também foi realizada a determinação da concentração bactericida mínima, onde após a leitura da CIM, com o auxílio de micropipetadores transferiu-se cerca de 10 µL de cada poço das placas, para regiões determinadas de placa de Petri contendo Agar Mueller Hinton. Estas placas de Petri foram levadas à estufa a 37°C e após 24 horas realizado à leitura. A região em que não ocorreu crescimento bacteriano é indicada como a menor concentração do extrato a ter ação bactericida contra o microrganismo estudado.

2.3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Análise Química da Própolis

Todas as amostras de própolis utilizadas nas análises foram colhidas de colméias de *Apis mellifera*, do tipo Langstroth. A Tabela 2 apresenta os valores médios para o teor de cinzas, umidade, resíduos insolúveis, sólidos solúveis e cera para todas as amostras de própolis analisadas, de acordo com as regiões de coleta.

Tabela 2-Determinação do Teor de Cinzas, Umidade, Resíduos Insolúveis, Sólidos Solúveis e Cera

| | Teor de Cinzas (%) | Umidade (%) | Resíduos Insolúveis (%) | Sólidos Solúveis em Etanol (%) | Teor de Cera (%) |
|--------------------|--------------------|-------------|-------------------------|--------------------------------|------------------|
| Cambará | 2,51 ± 0,09 | 2,09 ± 0,08 | 24,68 ± 0,51 | 65,40 ± 0,52 | 10,31 ± 0,29 |
| Cianorte | 3,45 ± 0,05 | 8,21 ± 0,32 | 33,93 ± 3,26 | 56,40 ± 9,04 | 2,33 ± 0,23 |
| Ilha Grande | 3,52 ± 0,07 | 6,98 ± 0,20 | 35,97 ± 0,77 | 60,88 ± 2,89 | 2,49 ± 0,20 |
| Maringá | 3,41 ± 0,05 | 4,91 ± 0,27 | 30,34 ± 4,70 | 53,68 ± 5,70 | 5,58 ± 1,49 |
| Paranavaí | 2,72 ± 0,07 | 9,13 ± 1,81 | 29,28 ± 1,79 | 54,60 ± 1,38 | 6,93 ± 0,52 |
| Uniflor | 2,60 ± 0,04 | 5,62 ± 0,26 | 34,12 ± 2,09 | 50,92 ± 1,45 | 11,09 ± 1,59 |

Observou-se que entre as diferentes amostras de própolis estudadas o teor de cinzas com melhor média foi a de Cambará com 2,51%, mostrando ser a que resultou menor quantidade de resíduos inorgânicos, assim, através dos resultados todas as amostras não apresentam diferenças significativas no teor de cinzas e observa-se também que todos os valores encontrados para as colheitas estão de acordo com a Legislação Vigente (BRASIL, 2002). Esta determinação é importante podendo detectar adulterações no produto, principalmente nos que são comercializados em pó, onde a adição de elementos como terra, por exemplo, resultaria em valores elevados de cinzas (WOYISKI, 1996). GARCIA et al. (1999/2000), analisando a própolis do Paraná, encontrou valores para cinzas (3,56% no verão), valor este superior a todos as amostras analisadas neste trabalho.

Para o teor de umidade houve uma variação grande entre 2,09% e 9,13% para as amostras estudadas, sendo a própolis de Cambará com o menor teor de umidade. Para este parâmetro, o teor de umidade deve ser inferior a 8% para garantir a qualidade da própolis (BRASIL, 2002), o que não ocorreu para as própolis de Cianorte (8,21 %) e Paranavaí (9,13 %), que excederam o limite do Ministério da Agricultura, porém deve-se considerar que podem ocorrer variações pelas condições de armazenamento e manipulação (WOYISKI, 1996).

Os resultados para resíduos insolúveis e sólidos solúveis em etanol estão de acordo com a legislação, sendo que para todas as amostras os valores ficaram abaixo de 40% e acima de 35%, respectivamente (BRASIL, 2002). Estes parâmetros de resíduos insolúveis e sólidos solúveis estão altamente relacionados ao solvente utilizado e a solubilidade da amostra no mesmo (FUNARI *et al.*, 2006).

Comparando-se os dados determinados pelas amostras de própolis neste estudo com os valores da Legislação Vigente (BRASIL, 2002), constatou-se que os resultados obtidos para o teor de cera mostram que todas as própolis estão de acordo com o exigido, pois apresentam valores entre 2,34% e 11,09% de cera, percentagens, que estão abaixo do permitido, que é de 25% de cera. A porcentagem de cera deve ficar abaixo de 25%, pois as substâncias que compõem a cera não são consideradas farmacologicamente ativas (WOYISKI, 1996).

Análise da Capacidade Antioxidante por DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada em porcentagem da atividade antioxidante (AA) através da porcentagem de DPPH consumido. A Tabela 3 descreve os resultados obtidos para a determinação da capacidade antioxidante.

Tabela 3 - Determinação da capacidade antioxidante por DPPH

| | Cambará | Cianorte | Ilha Grande | Maringá | Paranavaí | Uniflor |
|---------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| AA (%) | 92,77 ± 5,20 | 90,45 ± 0,47 | 86,59 ± 0,873 | 83,48 ± 5,67 | 90,72 ± 1,20 | 84,41 ± 0,41 |

A análise mostra que os extratos de própolis apresentam uma excelente atividade antioxidante frente a concentração de DPPH de 250 µg/mL, com os resultados variando entre 83,48% e 92,77%, com o destaque para a amostra de própolis obtido de Cambará que apresentou a melhor atividade antioxidante.

Os componentes ativo biologicamente na própolis estão associados aos diferentes flavonóides fenólicos e seus derivados ésteres e seu efeito correlaciona-se diretamente com as atividades anti-inflamatória e hepatoprotetora. Segundo alguns estudos relatados na literatura científica (KOSALEC et al., 2007; KUMAZAWA et al., 2004; KUMAZAWA et al., 2001; MIGUEL et al., 2010), quando maior a concentração de polifenóis presentes no extrato de própolis, maior será sua capacidade antioxidante e dentre estes compostos podemos destacar o CAPE (fenetil éster do ácido caféico - Tabela 4) como uma das mais potentes substâncias presentes na própolis (FAROOQUI e FAROOQUI, 2010).

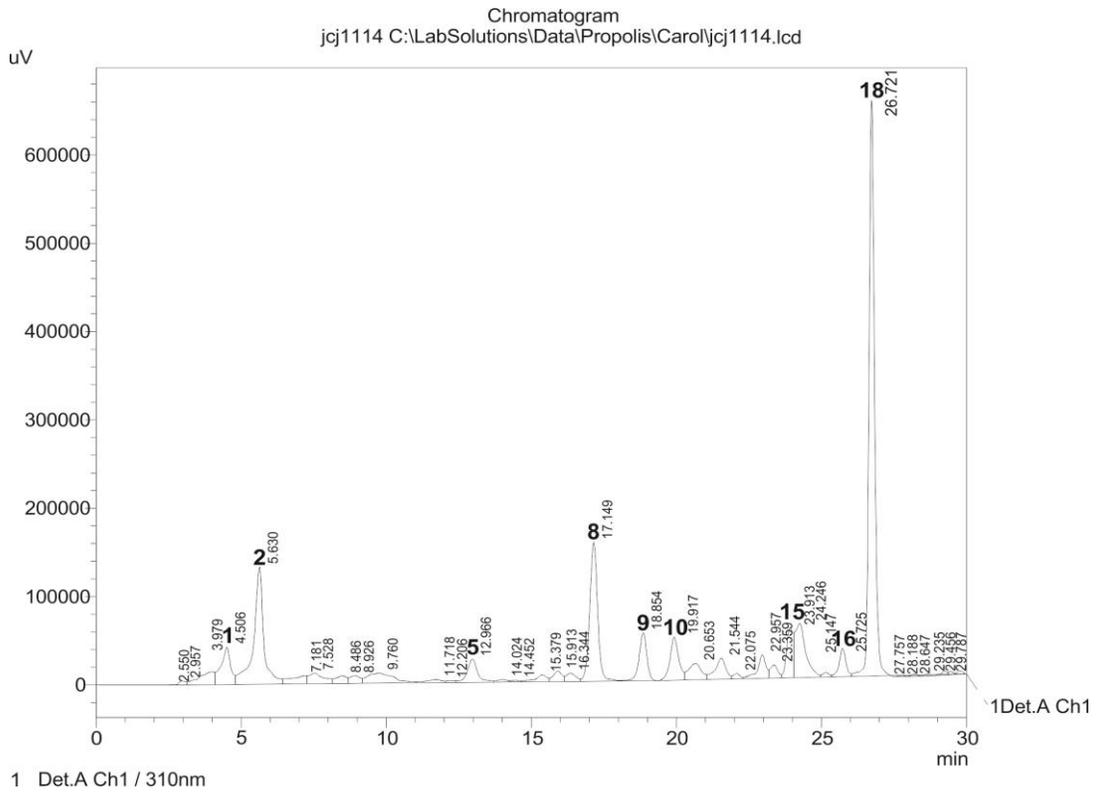
Resultados obtidos para CLAE

A Figura 1 mostra os cromatogramas obtidos para as amostras de extratos de Própolis de Uniflor, Cambará, Maringá, Cianorte, Paranavaí e Ilha Grande, respectivamente. Nestes extratos de própolis foram identificados uma série de substâncias e comparadas com os padrões apresentados na Tabela 4. A identificação foi realizada através da comparação com os respectivos tempos de retenção das substâncias padrões injetadas nas mesmas condições cromatográficas.

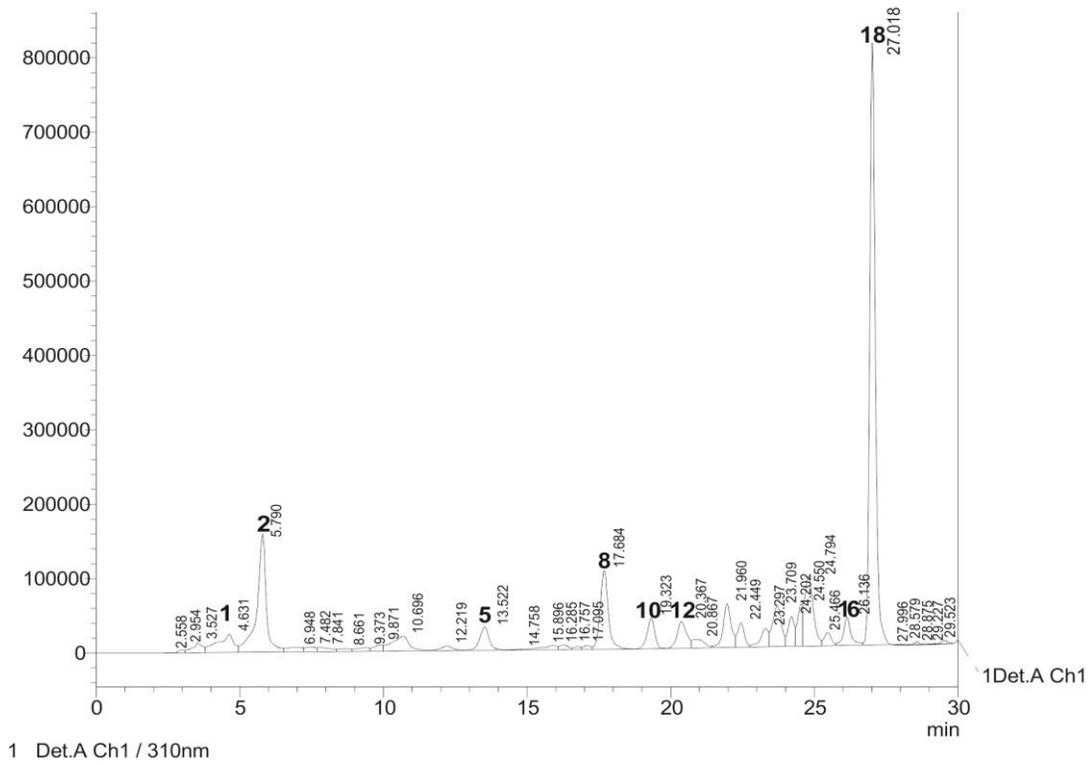
Para estas amostras, cinco compostos de ácidos fenólicos (Tabela 4) foram identificados: ácido cafeico, ácido p-cumárico, CAPE, drupanina e artepillin C, bem como a presença dos flavonóides (Tabela 4): apigenina, galangina, acacetina, isorhamnetina e pinobankisina. Este resultado mostra a importância de utilizar os ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido p-cumárico, CAPE, drupanina e artepillin C) e flavonóides (apigenina, galangina, acacetina, isorhamnetina e pinobanskisina), como marcadores para quantificar própolis e seus produtos derivados.

Entre todos os compostos já identificados na própolis, Artepillin C é o composto químico (estrutura na Tabela 4) que atrai a atenção de pesquisadores, devido a suas inúmeras propriedades biológicas. Devido aos altos níveis de Artepillin C, a própolis brasileira tem sido amplamente estudada por pesquisadores em todo o mundo, especialmente o "própolis verde". (CHANG *et al.*, 2008).

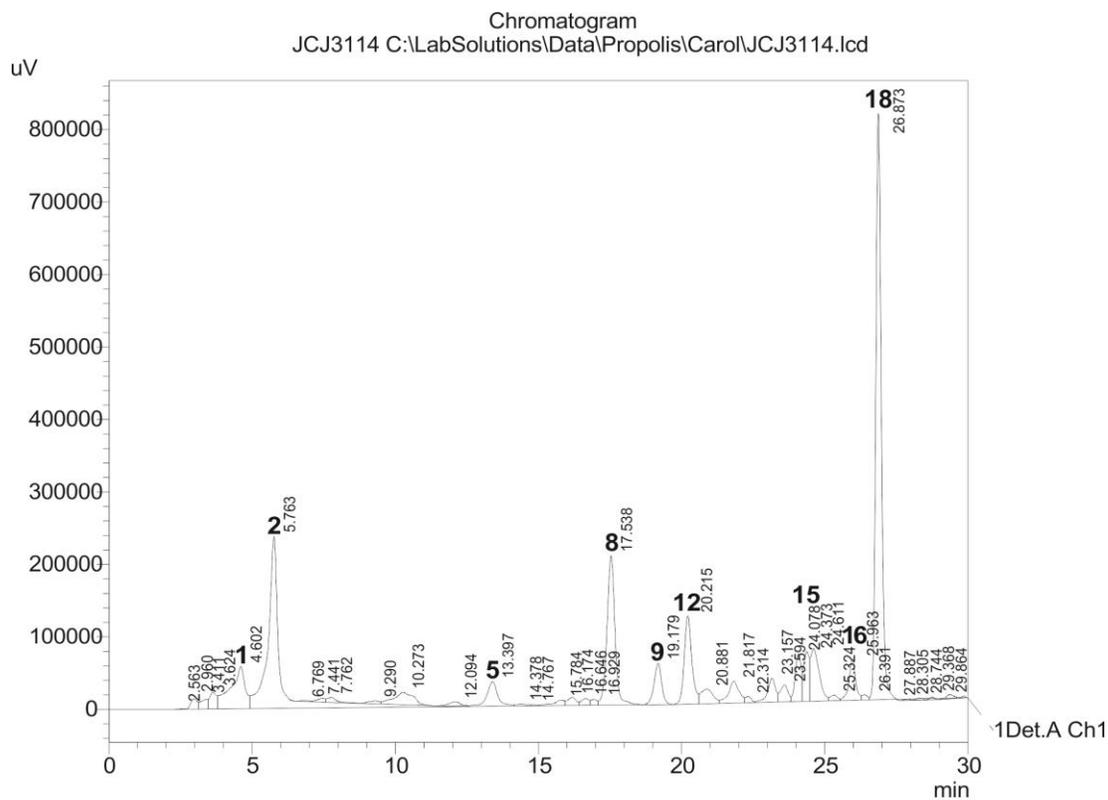
Através dos resultados obtidos neste trabalho e de informações obtidas na literatura, a própolis usada neste estudo pode ser considerada como sendo própolis verde, porque, entre os compostos fenólicos identificados, Artepillin C constitui a principal substância química. Diferentemente da própolis vermelha onde a concentração do Artepillin C não é a predominante no extrato de própolis.



A - UNIFLOR

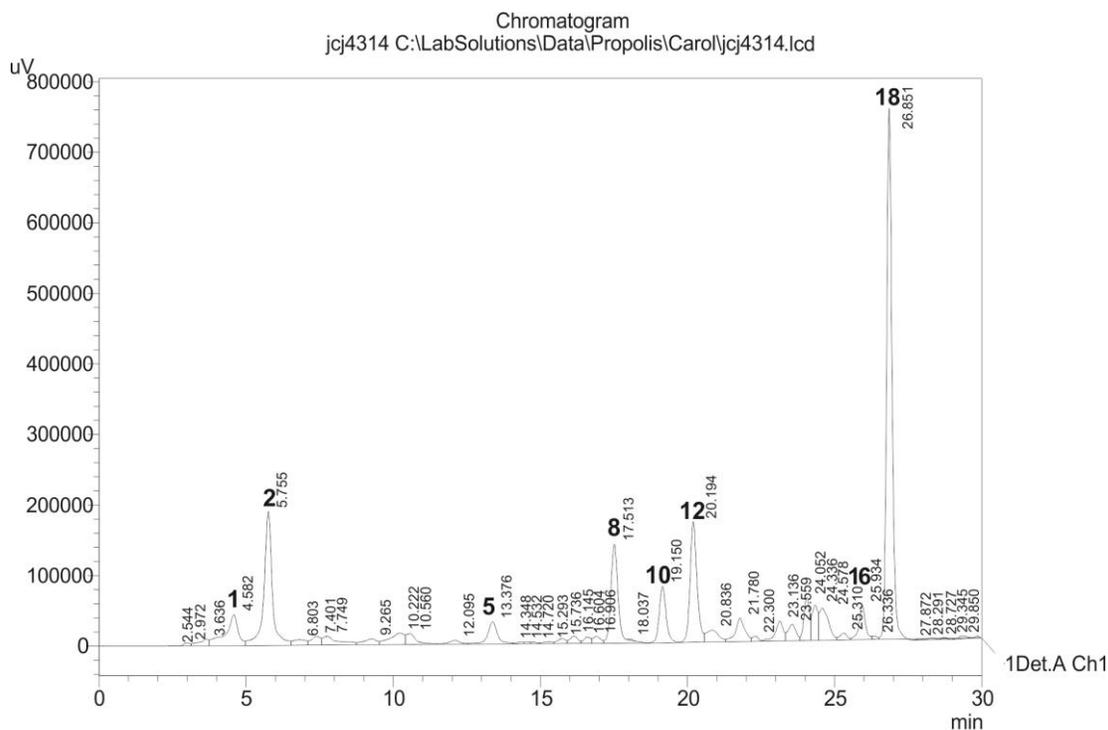


B - CAMBARÁ



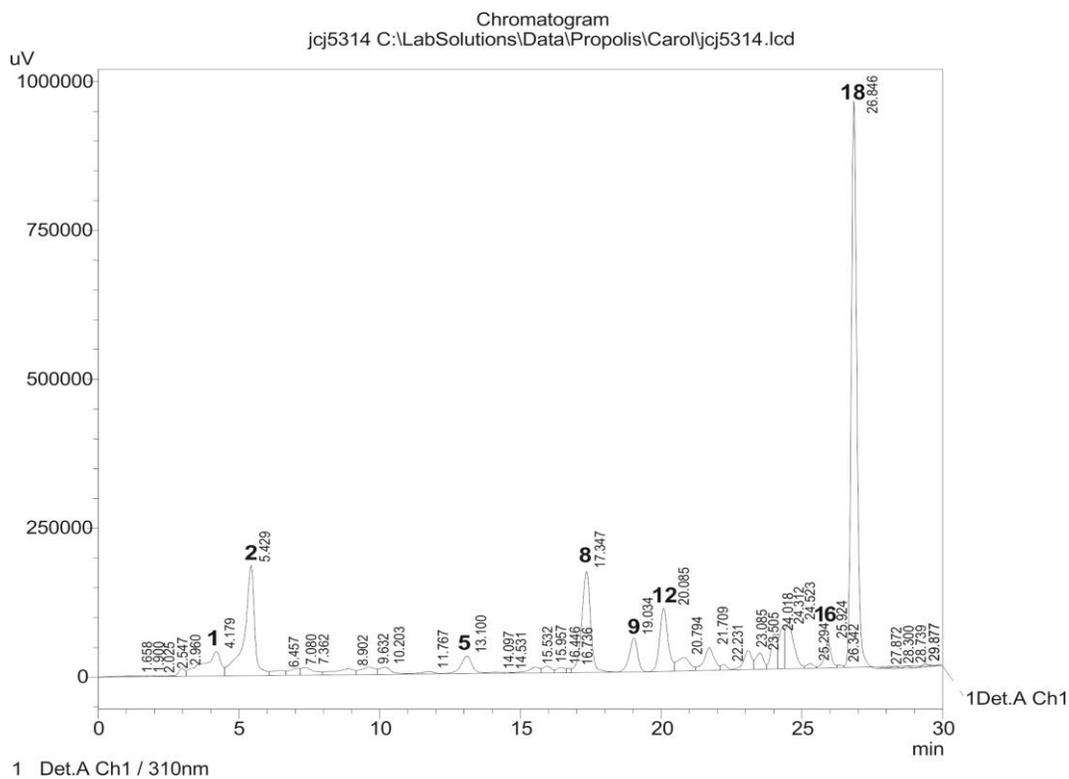
1 Det.A Ch1 / 310nm

C- MARINGÁ

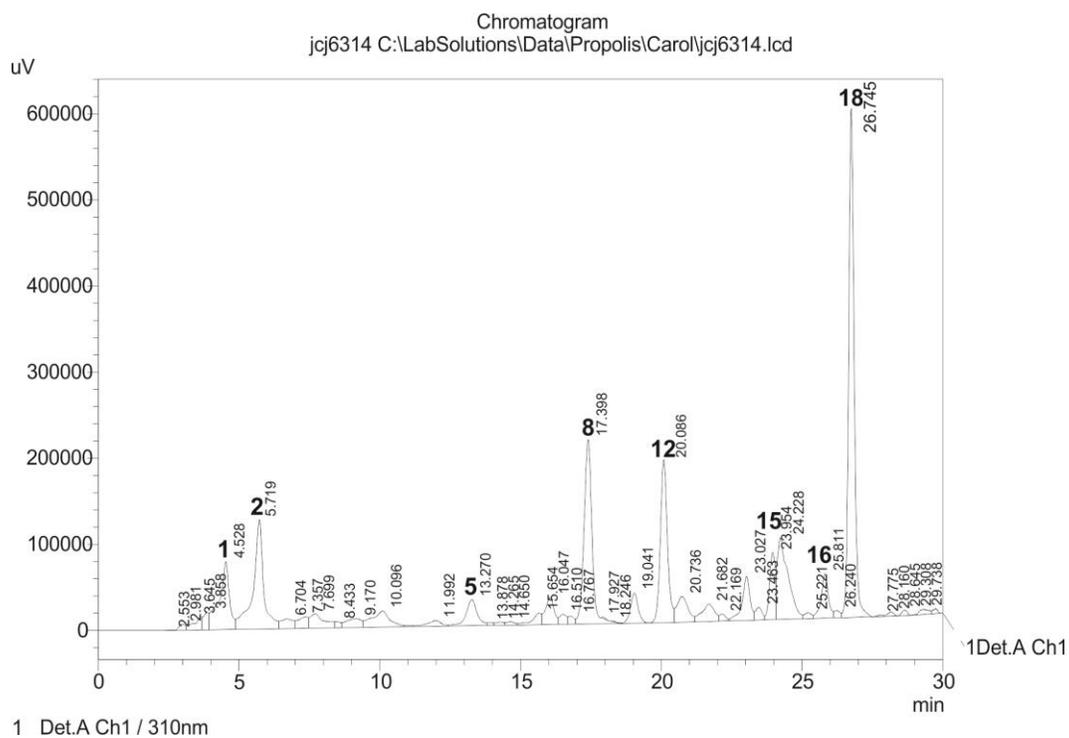


1 Det.A Ch1 / 310nm

D-CIANORTE



E- PARANAÍ



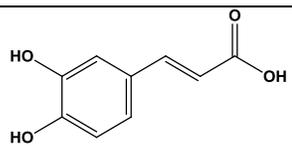
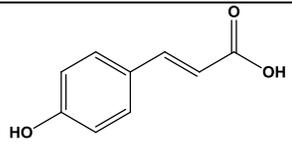
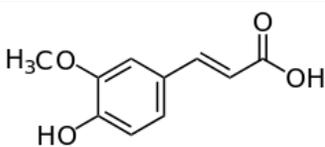
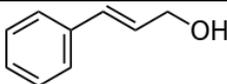
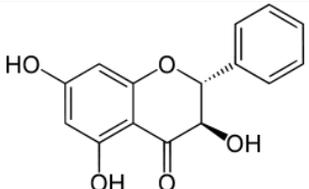
F- ILHA GRANDE

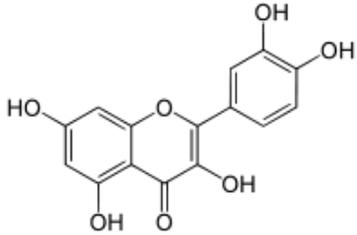
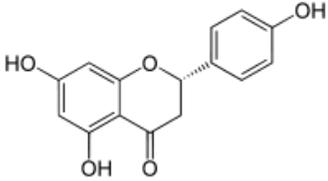
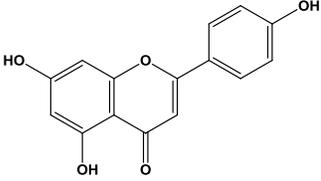
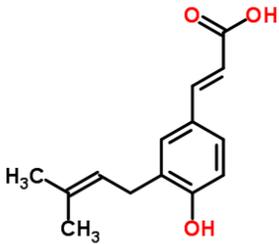
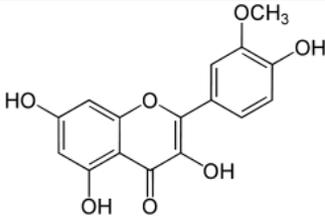
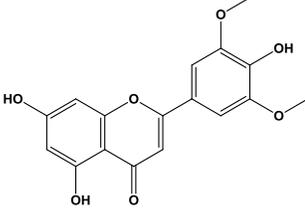
Figura1-Cromatogramas das amostras de Extrato de Própolis: (A) UNIFLOR, (B) CAMBARÁ, (C) MARINGÁ, (D) CIANORTE, (E) PARANAÍ, (F) ILHA GRANDE

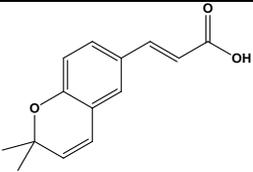
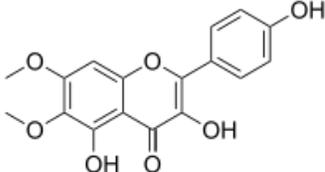
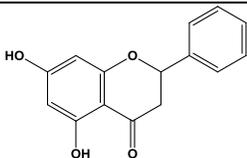
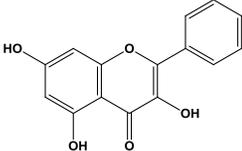
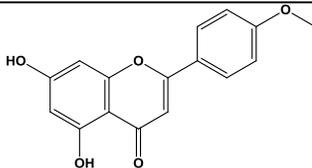
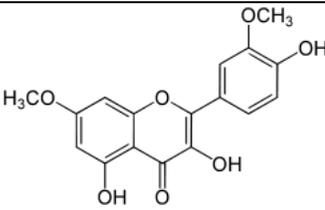
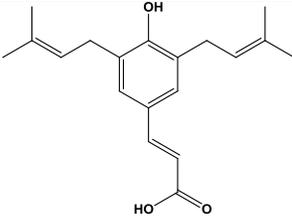
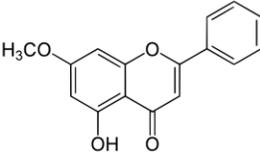
Através da análise da Figura 1 é possível observar que todas as amostras de própolis apresentam as mesmas características químicas onde predomina os compostos 1, 2, 5, 8, 12 e 18. Já nos cromatogramas C, D, E e F apresentam o composto 12 com concentrações similares ao pico 8, diferentemente do cromatograma obtido do extrato de própolis de Uniflor que não apresenta o composto 12 (CAPE). Para todas as amostras de própolis analisadas de diferentes cidades do Paraná foi possível identificar o composto pinobanksina em concentrações parecidas.

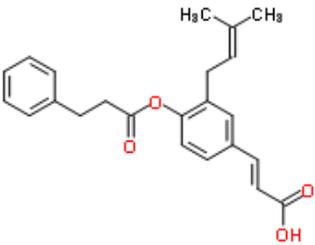
Devido à variação na composição química da própolis, é necessária uma padronização destes extratos de própolis. (SALATINO *et al.*, 2011). Através das análises dos cromatogramas, pode-se verificar que, em função da concentração de própolis, diferentes compostos fenólicos são extraídos a partir da própolis, resultando em extratos com diferentes propriedades biológicas.

Tabela 4: Substâncias identificadas através da análise de CLAE

| Compostos | Tempo de retenção (min) | Substância identifica | Estrutura |
|-----------|-------------------------|--------------------------|---|
| 1 | ~ 4,48 | Ácido caféico |  |
| 2 | ~ 5,6 | Ácido <i>p</i> -cumárico |  |
| 3 | ~ 6,95 | Ácido ferúlico |  |
| 4 | ~10,25 | Cinnamyl |  |
| 5 | ~12,80 | Pinobanksina |  |

| | | | |
|----|---------|---------------|---|
| 6 | ~ 14,21 | Quercetina |  |
| 7 | ~16,94 | Naringenina |  |
| 8 | ~17,4 | Apigenina |  |
| 9 | ~18,01 | Drupanina |  |
| 10 | ~19,66 | Isorhamnetina |  |
| 11 | ~ 20,9 | Crisina |  |

| | | | |
|----|---------|--------------|---|
| 12 | ~ 20,10 | CAPE |  |
| 13 | ~ 20,39 | Eupalitina |  |
| 14 | ~ 20,70 | Pinocembrina |  |
| 15 | ~ 23,19 | Galangina |  |
| 16 | ~ 25,78 | Acacetina |  |
| 17 | ~ 26,34 | Rhamnazina |  |
| 18 | ~ 26,78 | Artepillin C |  |
| 19 | ~29,14 | Tetochrysin |  |

| | | | |
|----|---------|------------|---|
| 20 | ~ 30,72 | Baccharina |  The chemical structure shows a central benzene ring. On the left, there is a propyl chain (-CH2-CH2-CH2-) attached to the ring. On the top, there is a methyl group (-CH3). On the right, there is a carboxylic acid group (-COOH). The structure is labeled 'Baccharina'. |
|----|---------|------------|---|

As amostras de própolis e os padrões serão analisados por LC/MS, para uma análise mais confiável e também realizar a determinação da concentração de cada substância identificada nas amostras de própolis. Este experimento será realizado como continuação deste trabalho.

Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise por MEV, os dentes (decíduos e permanentes) foram imersos nos respectivos extratos de própolis. Após a remoção destes dentes das soluções dos extratos de própolis foi realizada uma prévia avaliação dos tecidos que revestem os dentes e observou-se que não houve alteração na mudança da coloração das estruturas teciduais da superfície dentária.

As Figuras abaixo 2, 3 e 4 são imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de cortes de dentes permanentes e decíduos imersos em soluções de extrato de própolis, de clorexidina manipulada à 0,12% e corte de dentes que ficaram em tubos vazios.

Figura 2: Micrografia de MEV de dentes imersos em amostras de extrato de própolis: (A) Dente permanente com aumento de 500 X e (B) Dente Decíduo com aumento de 350 X

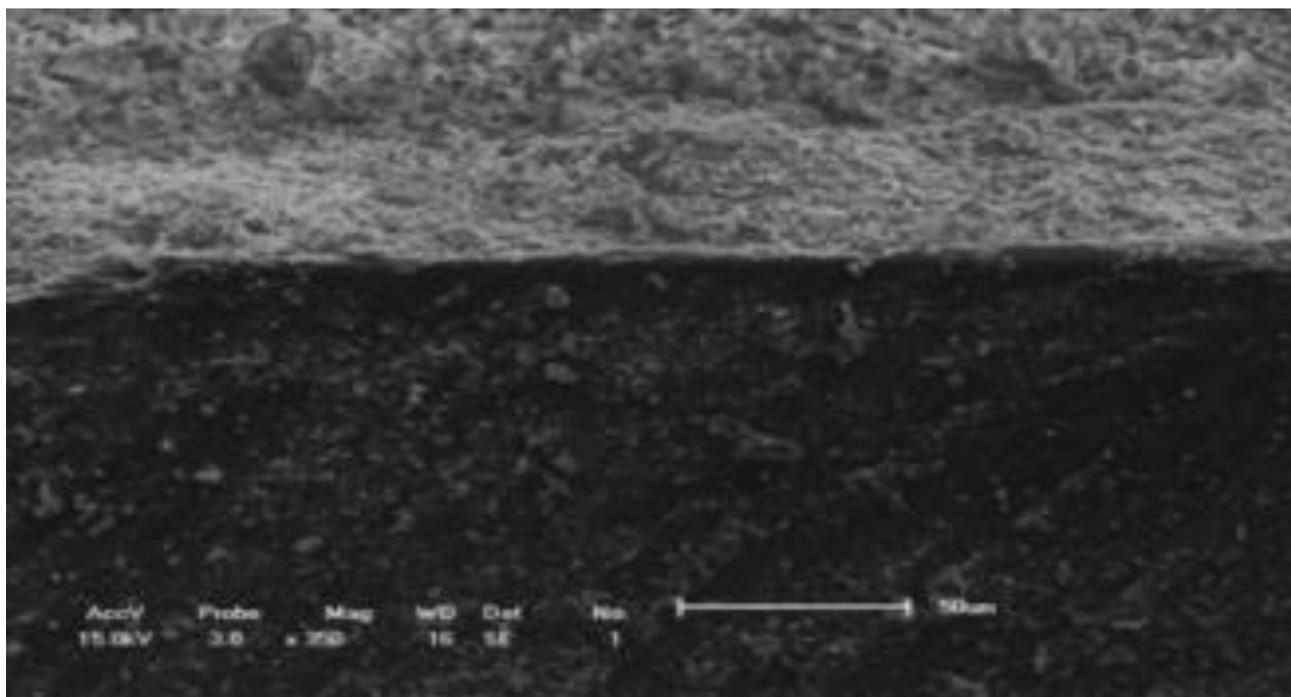
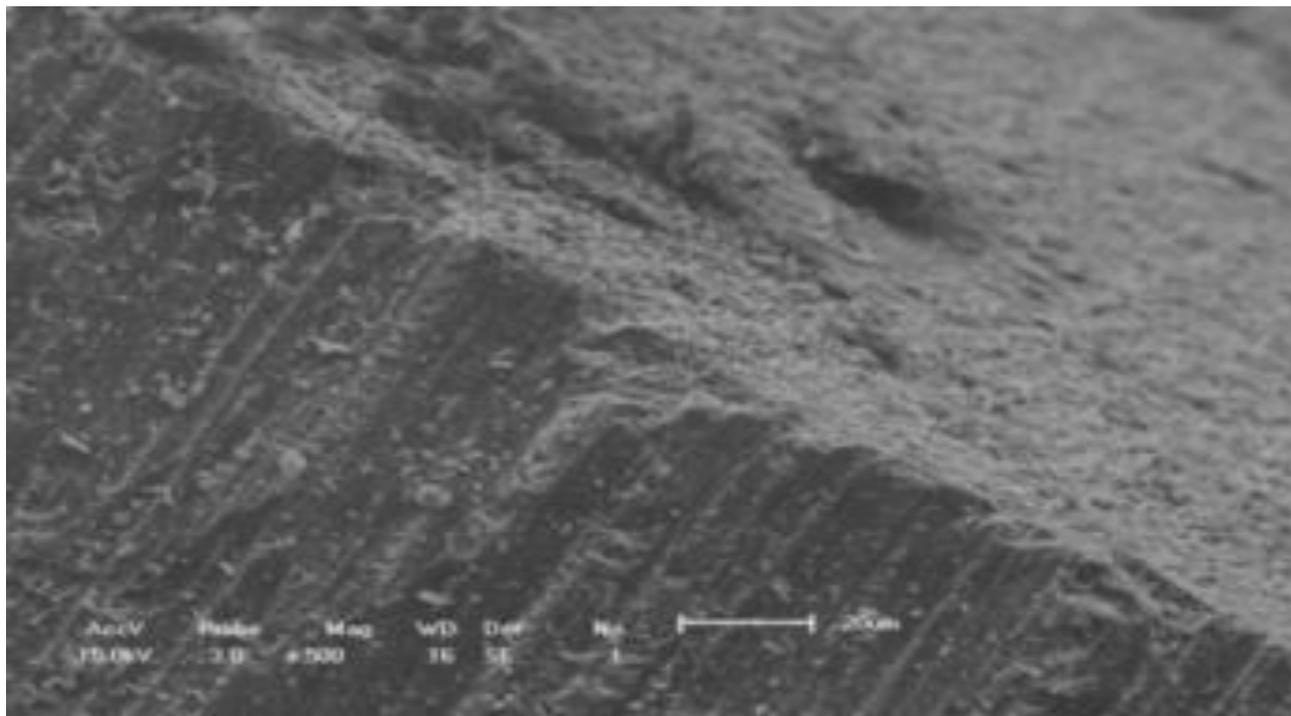


Figura 3: Micrografia de MEV de dentes imersos em clorexidina à 0,12% manipulada: (A) Dente permanente com aumento de 400 X e (B) Dente Decíduo com aumento de 300 X.

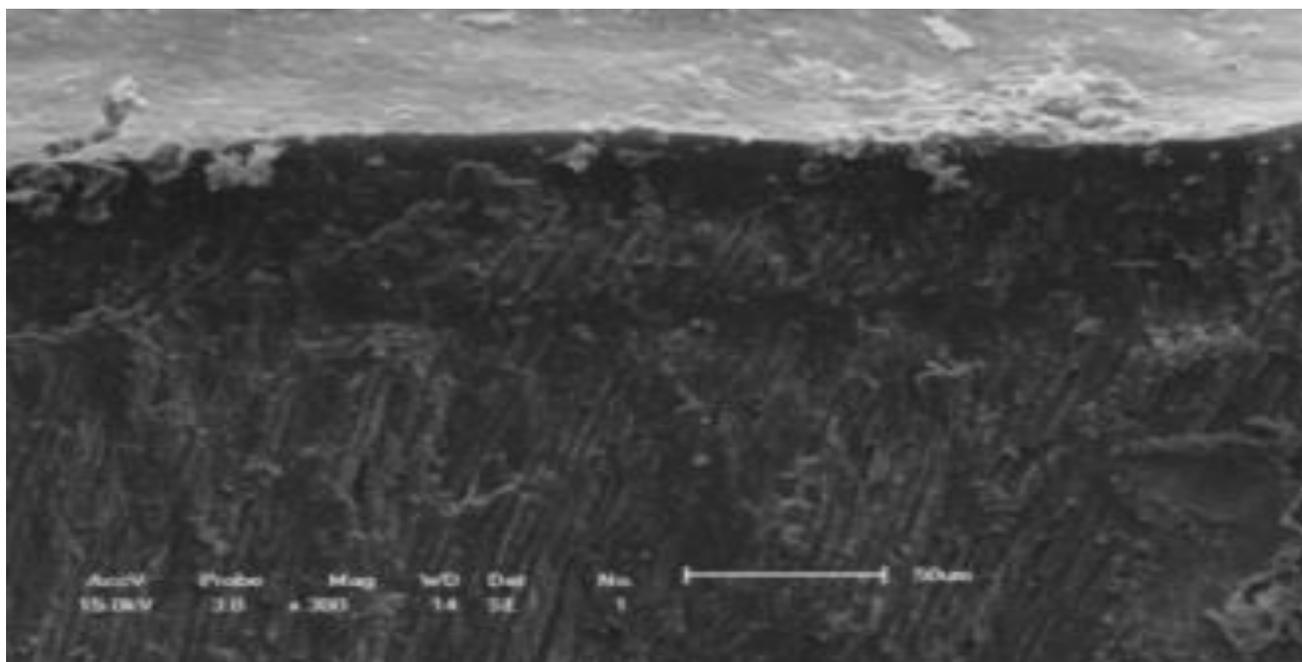
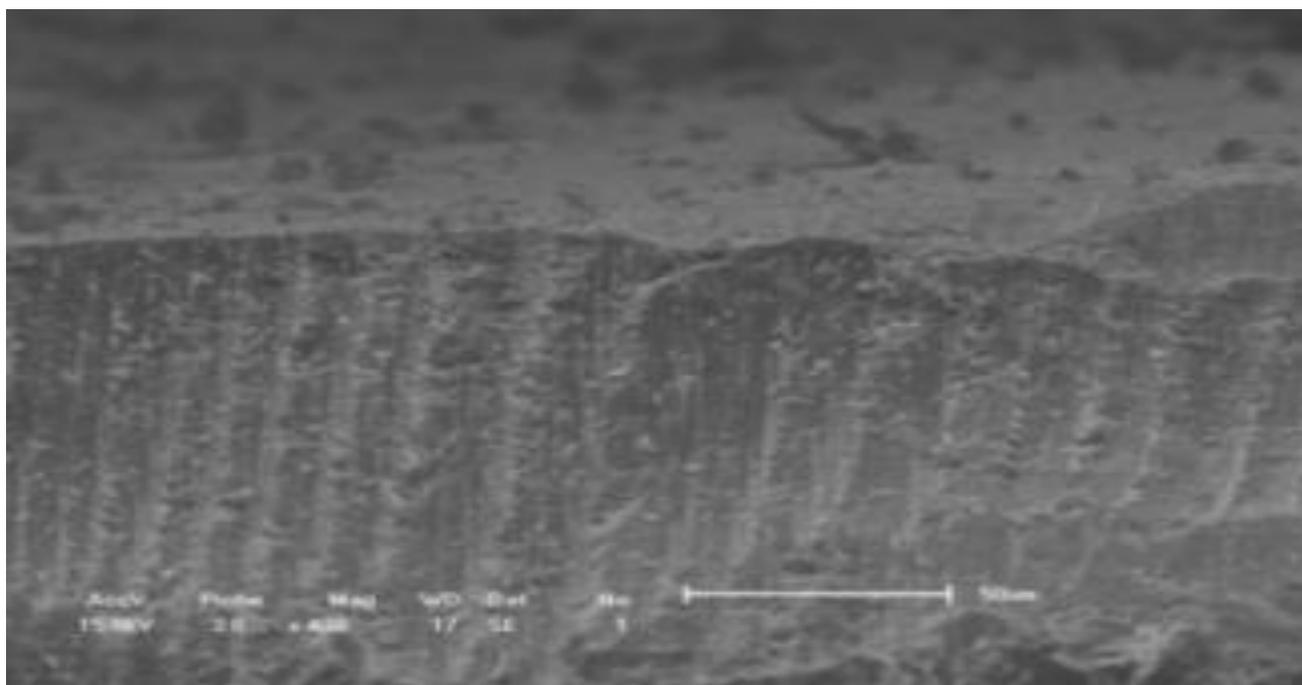
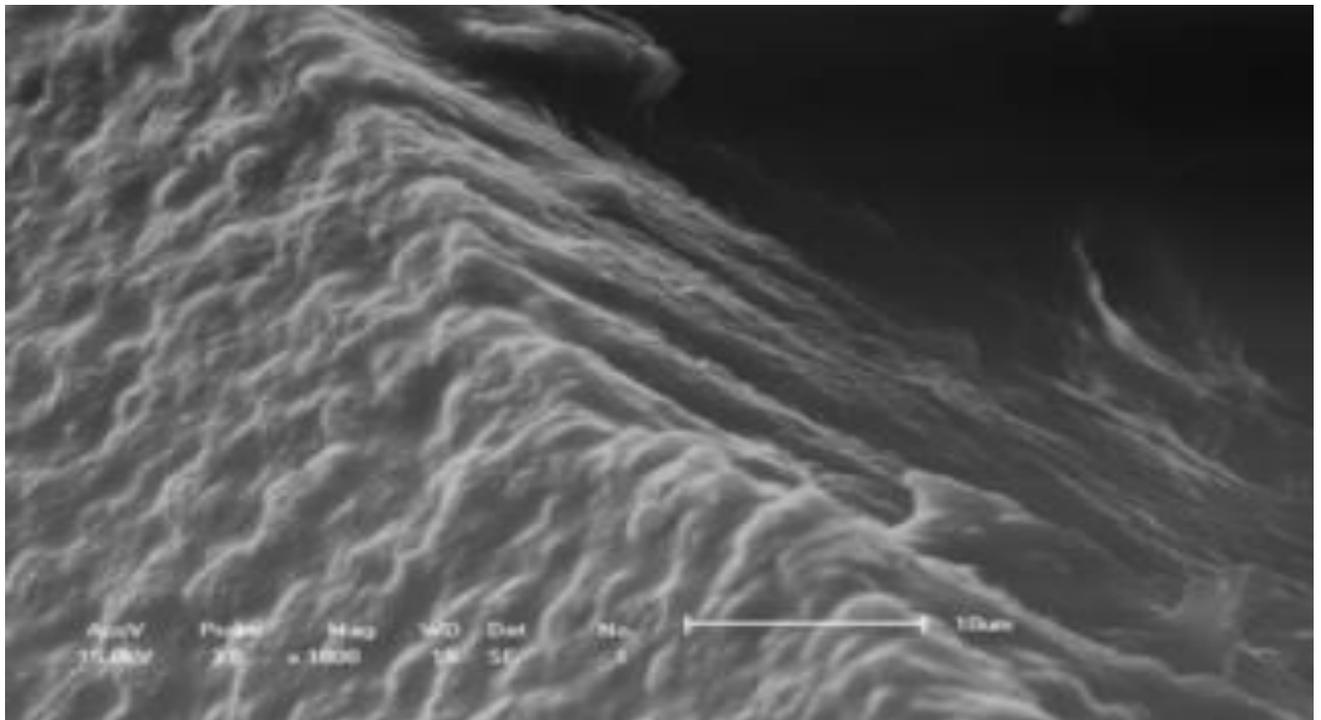
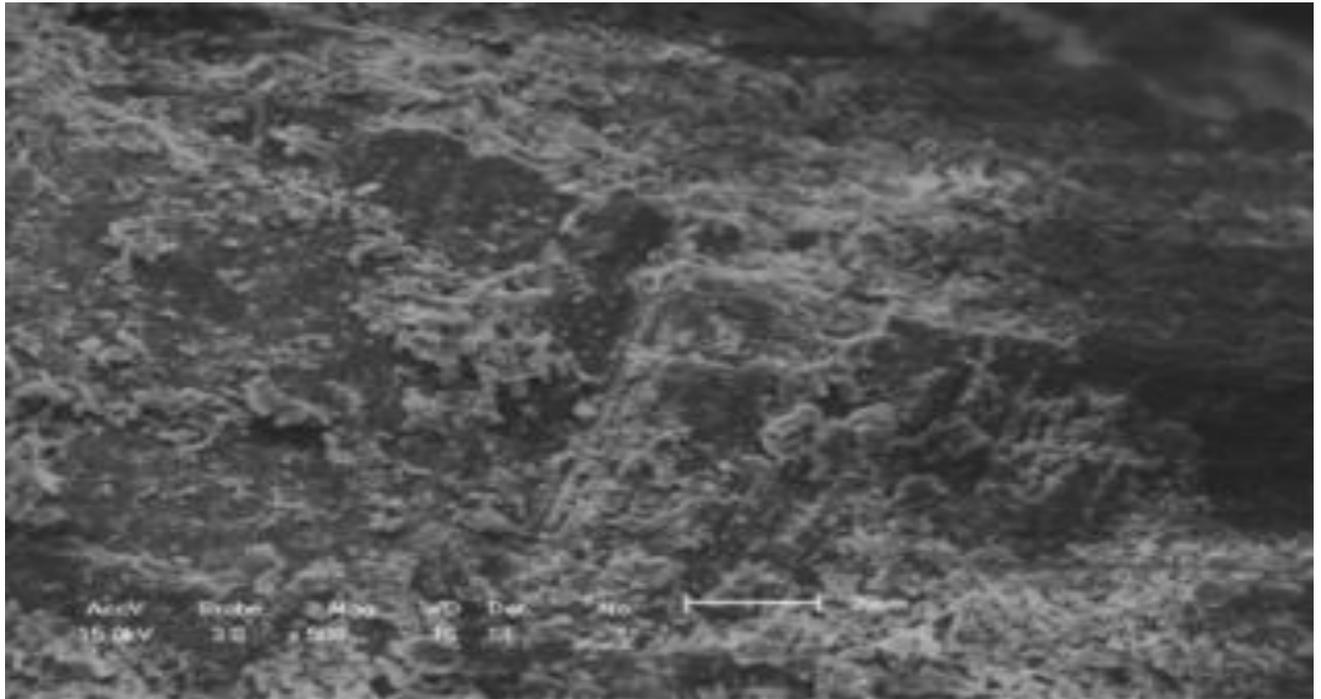


Figura 4: Micrografia de MEV de dentes que não foram imersos em soluções, ficaram em tubos vazios: (A) Dente permanente com aumento de 500 X e (B) Dente Decíduo com aumento de 1800 X.



Foi observado que os dentes que ficaram em soluções com o extrato de própolis e o antisséptico clorexidina à 0,12%, mostraram certa nitidez da imagem em relação aos túbulos dentinários, tanto nos dentes decíduos como nos permanentes, o que não aconteceu com a imagem da figura 4, onde os dentes não foram imersos em soluções, verificando uma superfície bastante rugosa com pouca organização dos túbulos dentinários, demonstrando que as soluções possuem algumas características favoráveis, semelhantes e que atuam de alguma forma na estrutura dos tecidos dentários, o esmalte e a dentina.

Análise Microbiológica

Determinação da Concentração Inibitória Mínima – MIC

A atividade antimicrobiana da própolis é de longe a propriedade biológica mais importante e que tem merecido o maior interesse científico, considerando o elevado número de estudos realizados. Apesar da própolis apresentar grandes diferenças em sua composição química pelos diferentes tipos de própolis, todos eles tem atividade antimicrobiana. Esta atividade, parece estar associada as ações individuais de substâncias presentes na própolis e não na soma dos componentes antimicrobianos presentes na mesma (KUJUMGIEV *et al.*, 1999).

Estas propriedades fazem deles bons candidatos para aplicação terapêutica. Sua ação antimicrobiana está associada a diferentes flavonóides, flavonas, ácidos fenólico e seus derivados ésteres.

A Tabela 5 e Figura 5 mostram os resultados da concentração bactericida mínima para os extratos de própolis. Todas as amostras apresentam efeitos antibacterianos, contra microrganismos presentes no biofilme dental.

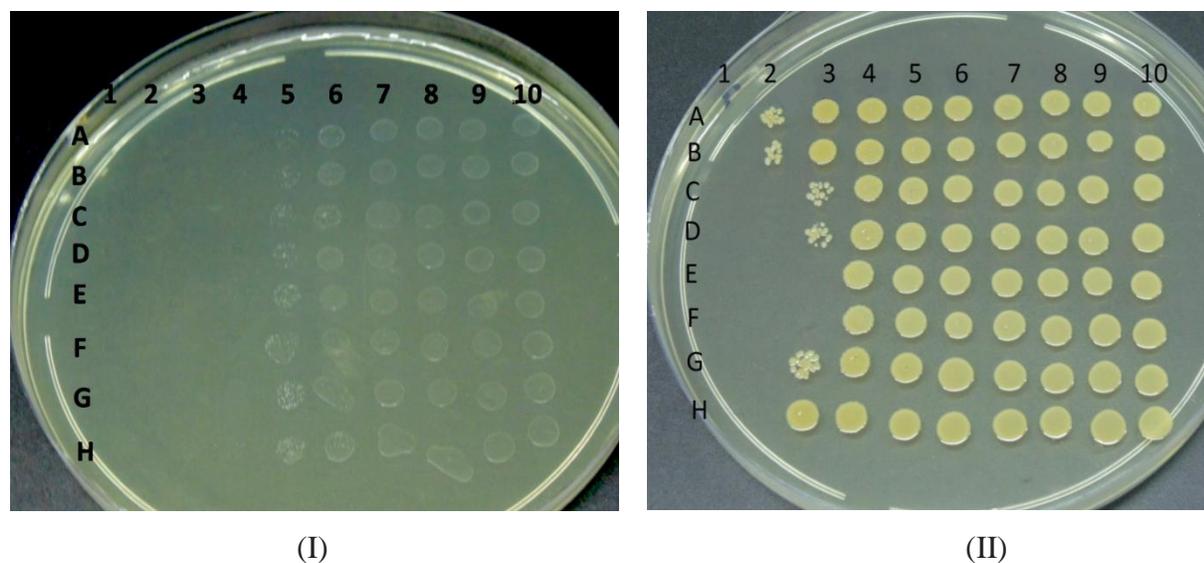


Figura 5: Foto da análise da concentração bactericida mínima de amostras de própolis. Placas: (I) *Streptococcus mutans*, (II) *Staphylococcus aureus*. As amostras de própolis foram testadas em duplicata: Fileiras (A e B) Própolis de Uniflor; Fileiras (C e D) Própolis de Cambará; Fileiras (E e F) Própolis de Cianorte; Fileiras (G e H) Própolis de Maringá-UEM. Coluna (1) controle negativo; (2) 1.000 µg/mL; (3) 500 µg/mL; (4) 250 µg/mL; (5) 125 µg/mL; (6) 62,5 µg/mL; (7) 31,6 µg/mL; (8) 7,8 µg/mL; (9) 7,8 µg/mL; (10) 3,9µg/mL.

Tabela 5: Concentração bactericida mínima das amostras de própolis de diferentes localidades nas cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

| Própolis | Concentração Bactericida Mínima (µg/mL) | |
|-------------|--|-----------------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| Uniflor | > 1000 | 250 |
| Cambará | 1000 | 250 |
| Cianorte | 500 | 250 |
| Maringá | 1000 | 250 |
| Paranavaí | 1000 | 250 |
| Ilha Grande | 1000 | 250 |

A concentração bactericida mínima para o *Streptococcus mutans* foi de 250 µg/mL, para todas as amostras de própolis e para o *Staphylococcus aureus* foi superior a 1.000 µg/mL para a amostra de própolis da Uniflor, 1000 µg/mL para as amostras de Cambará, Maringá, Paranavaí e

Ilha Grande, e a amostra de Cianorte apresentou a melhor atividade sobre a cepa de *S.aureus*, cuja concentração bactericida foi de 500 µg/mL.

Associando os dados da atividade antioxidante, análise cromatográfica e análise microbiológica, podemos destacar como a melhor amostra de própolis para a aplicação no desenvolvimento de um enxaguante bucal a própolis de Cianorte, mesmo sabendo que o teor de umidade ficou acima do permitido.

2.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a própolis verde do Paraná tem potencial para ser usada em solução como enxaguante bucal, inibindo a proliferação bacteriana, e melhorando o aspecto do esmalte dentário, sendo benéfico em relação aos produtos químicos já utilizados, pois se tratando de um produto natural não acarreta prejuízos aos usuários nem ao meio ambiente, contribuindo para a melhoria da saúde bucal, porém são necessários maiores estudos que contribuam com a caracterização e padronização deste material, quanto às características desejadas.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR et al., Comunicação pessoal., 2012. Em publicação.

AHN M, KUMAZAWA S, USUI Y, NAKAMURA J, MATSUKA M, ZHU F, NAKAYAMA T 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of China. Food Chem 101: 1400-1409.

ALENCAR SM, AGUIAR CL, GUZMÁN JP, Park YK 2005. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. Ciência Rural 35: 909-915.

ALMEIDA, R.V.D.; CASTRO, R.D.; PEREIRA, M.S.V.; PAULO, M. Q.; SANTOS, J. P.; PADILHA, W. W. N. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr. 2006; (1): 87

ANGELO, R. A.; SILVA, Y. T. S.; CASTRO, R. D.; ALMEIDA, R. V. D.; PADILHA, W. W. N. Atuação Clínica e Microbiológica da solução de própolis para bochecho em crianças cárie ativas. Arquivos em Odontologia. Vol. 43, n.03, jul/set de 2007.

ARVOUET-GRAND A, VENNAT B, POURRAT A, LEGRET P 1994. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. J Pharm Belg 49: 462-468.

AYRES DC, MARCUCCI MC, GIORGIO S. 2007. Effects of Brazilian propolis in Leishmania amazonensis. Mem Inst Oswaldo Cruz 102: 215-220.

BAAKILINI, M. F.; LARA, E. H. G; PANZERI, H. Adición de própolis em formulaciones de dentifricios. Evaluación de SUS propriedade y estabilidad. Ver Fola Oral, São Paulo, v.2, n.6, p.130-133, dez.1996.

BANKOVA V 2005a. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol 100:114-117.

BORRELLI F, MAFFI P, PINTO L, IANARO A, RUSSO A, CAPASSO F, IALENTI A 2002. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. Fitoterapia 73: S53-S63.

BUISCHI, Y. P. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

BRASIL 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 132, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da União, de 02 de Outubro de 2003. Burdock GA 1998. Review of the biological properties and Capasso F, Castaldo S 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 73: S1-6

BRASIL. Ministério da Agricultura. Anexo VI – Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 2002. Acessado em 12 abril de 2013. Online. Disponível na Internet http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/instnorm03_propolis6.htm.

BRASIL 2001. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº3 – Anexo VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 Jan. 2001.

CATEF 2005. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos. Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis 2005. Disponível em < E:\Própolis\Anvisa - Instituição - Câmaras Técnicas - Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos - CATEF.htm> Acesso em: 10/10/2006.

CHANG, R., PILÓ-VELOSO., MORAIS, S.A.L., NASCIMNETO, E.A. (2008). Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 549-556.

CHOI YM, Noh DO, CHO SY, SUH HJ, KIM KM, KIM JM 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT* 39: 756-761.

CURY, J. A.; ROCHA, E. P.; KOO, H.; FRANCISCO, S. B.; CURY, A. A. D. B. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. *Braz Dent J*, Ribeirão Preto, v. 11, n.1, p.29-34, jan./junh. 2000.

DANTAS AP, OLIVIERI BP, GOMES FHM, DE CASTRO SL 2006. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *J Ethnopharmacol* 103: 187-193.

DA SILVA JFM, SOUZA MC, MATTA SR, ANDRADE MR, VIDAL FVN 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem* 99: 431-435.

DE CARLI, A. D. Capacidade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* associada ao fluoreto de sódio no controle do biofilme dental [Dissertação]. Campo Grande: Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2007.

DUARTE, C. A.; KFOURI, L. S. Ação da própolis sob a forma de bochechos na formação da placa bacteriana e gengivite. *RGO*, Porto Alegre, v.47, n.2, p.82-84, abr./jun. 1999.

FAROOQUI, T; FAROOQUI, A 2010. Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review. *Curr Nutr Food Sci* 6: 188-199.

FERREIRA, R. C. V.; VALENTE, P. H. M.; BARBOSA, A. D. Atividade antibacteriana da própolis. *LECTA USF*, Bragança Paulista, v.14, n.2, p. 65-93, jul./dez. 1996.

FUNARI CS, FERRO VO 2006. Análise de Própolis. *Ciênc Tecnol Aliment* 26: 171-178.

GARCIA, J.; et al. Produção de própolis em colônias de *Apis mellifera* africanizadas pelas técnicas convencional de raspagem e coletor de própolis inteligente. Maringá, PR. Anuário 1999/2000. Acessado em 12 de abril de 2013. Online. Disponível na Internet <http://www.cca.uem.gov/anu4600.htm>.

GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C. G. D. C.; MAYER, M. P. A. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. Rev Odontol Univ São Paulo, SP, v. 10, n. 4, p.251-256, out/dez. 1996.

GIORGIO S, RIBEIRO MCM, AYRES DC 2006. Composições medicamentosas a base de própolis brasileira tipificada com atividade leishmanicida e método de tratamento. BR/SP PI 0601863-7 A.

GOLD, O. G; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, Oxford, v. 18, n. 11, p. 1357-1364, nov. 1973.

GREGORY SR, PICCOLO N, PICCOLO MT, PICCOLO MS, HEGGERS JP 2002. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. J Alter Complement Med 8: 77-83.

HAYACIBARA MF, KOO H, ROSALEN PL, DUARTE S, FRANCO EM, BROWEN WH, IKEGAKI M, CURY JA 2005. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. J Ethnopharmacol 101: 110-115.

HU F, HEPBURN HR, LI Y, CHEN M, RADLOFF SE, DAYA S 2005. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. J Ethnopharmacol 100: 276-283.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res, Basel, v. 25, n. 5, p. 347-351, 1991.

KADOTA S, BANSKOTA AH, NAGAOKA T, SUMIOKA LY, TEZUCA Y, AWALE S, MIDORIKAWA K, MATSUSHIGE K 2002. Antioproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. J Ethnopharmacol 80: 67-73.

KOO, H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. Caries Res, Basel, v. 36, n. 6, p. 445-448, Nov./Dec. 2002.

KOO, H.; GOMES, B. P.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. Arch Oral Biol, Oxford, v. 45, n. 2, p. 141-148, Feb.2000.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A. Effect de *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. Caries Res, Basel, v. 33, n. 5, p. 393-400, Sep./Oct. 1999.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, May. 2002.

KOSALEC, I; SANKOVIC, K; ZOVKO, M; ORSOLIC, N; BAKMAZ, M; KALOGJERA, Z; PEPELJNJAK, S 2007. Antimicrobial and antioxidant activity of propolis from Croatia and Brazil: a comparative study. *Planta medica* 73 (9): 875.

KOSALEC I, PEPELJNJAK S, BAKMAZ M, VLADIMIR-KNEZEVIC S 2005. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. *Acta Pharm* 55: 423-430.

KUJUMGIEV A, TSVETKOVA I, SERKEDJIEVA Y, BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 64: 235-240

KUMAZAWA, S; HAMASAKA, T; NAKAYAMA, T 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84 (3): 329-339.

KUMAZAWA, S; NAKAYAMA, T 2001. Polyphenols in propolis and their antioxidant activity. *Honeybee Science* 22 (1): 1-8.

LIMA MG 2006. A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol 18 (3): 447-454, jul/set de 2008.

MALTZ, M. Cárie dental: Fatores relacionados. In: PINTO, V. G. Saúde bucal coletiva. São Paulo: Santos, 2000. P. 319-339.

MANI F, DAMASCENO HCR, NOVELLI ELB, MARTINS EAM, SFORCIN JM 2006. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol* 105: 95-98

MARCUCCI MC 1996. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim Nova* 19: 529-536.

MARQUELE FD, OLIVEIRA ARM, BONATO PS, LARA MG, FONSECA MJV 2006. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 41: 461-468.

MATSUDA AH, MACHADO LB, MASTRO NL 2002. Thermal analysis applied to irradiated propolis. *Radiat Phys Chem* 63:353-355.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, v.15, p.127-130, 2001.

MIGUEL, M G; NUNES, S; DANDLEN, S A; CAVACO, A M; ANTUNES, M D 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 48 (12): 3418-3423.

MORAES, E.; OTA, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T. Influência da própolis na contagem de estreptococcus do grupo mutans. In: Reunião Anual da SBPqO, 13, 1996, São Paulo: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 1996. p. 111.

MOTA, H. C. N. Avaliação clínica da própolis sobre a placa bacteriana e gengivite. 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia Preventiva). Natal: Faculdade de Odontologia da UFRN; 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for Dilution Antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 7th Edition, CLSI document M7-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2006.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Diagnosis and management of dental caries throughout life. NIH Consensus Statement, 2001; 18: 1-30.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 {ISBN 1-56238-486-4}. NCCLS, 940 West Valley Road, suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

ORSOLIC N, KNEZEVIC AH, SVER L, TERZIC S, Basic I 2004. *J Ethnopharmacol* 94: 307-315. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds

OZKUL Y, SILICI S, ERÖGLU E 2004. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* 12: 742-747.

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, fev./mar. 1999.

PEREIRA AS, SEIXAS FRMS, AQUINO Neto FR 2002. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova* 25: 321-326.

PEREIRA, J. V. Estudos com o extrato da *Punica granatum* Linn. (romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental. 88f. Tese (Doutorado em Estomatologia), João Pessoa: UFPB/UFBA, 2002.

PETERLINI, C.; ELMADJAN NETO, M.; VALLE, P. D.; ROMERO, S. S. Efeitos adversos da clorexidina. *Rev Odontol Univ Santo Amaro*, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 32-34, jan./jun. 1998.

PRYTZYK E, DANTAS AP, SALOMÃO K, PEREIRA AS, BANKOVA VS, DE CASTRO SL, Aquino Neto FR 2003. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *J Ethnopharmacol* 88: 189-193.

ROCHA L, DOS SANTOS LR, ARCENIO F, CARVALHO ES, LUCIO EMRA, ARAUJO GL, TEIXEIRA LA, SHARAPIN N 2003. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Rev Bras Farmacogn* 13: 71-74.

SALATINO, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, 28, 925-936.

SANTOS, V. R. Própolis: antibiótico natural alternativo em Odontologia (revisão de literatura). *Rev CROMG*, Belo Horizonte, v. 5, n. 3, p. 192-195, set./dez. 1999.

SCAZZOCCHIO F, D'AURIA FD, ALESSANDRINI D, PANTANELLA F 2005. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 4: 327-333.

SFORCIN JM, FERNANDES JR A, LOPES CAM, BANKOVA V, FUNARI SRC 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 73: 243-249.

SIMÕES CC, ARAUJO DB, ARAUJO RPC 2008. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Rev Bras Farmacogn* 18: 84-89.

STEINBERG, D.; KAINE, G.; GEDALLA, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am J Dentistry*, San Antonio, v. 9, n.6, p. 236-239, Dec. 1996.

STOOKEY, G. K. Caries prevention. *J Dent Educ*, Washington, v. 62, n.10, p. 803-811, 1998.

SY LB, WU Y, CHIANG B, WANG Y, WU W 2006. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. *Int Immunopharmacol* 6: 1053-1060.

TAVARES JP, MARTINS IL, VIEIRA AS, LIMA FAV, BEZERA FAF, MORAES MO, MORAES MEA 2006. Estudo de toxicologia clínica de um fototerápico a base de associações de plantas, mel e própolis. *Rev Bras Farmacogn* 16: 350-356.

TWETMAN, S.; GRINDEFJORD, M. Mutans streptococci suppression by chlorhexidine gel in toddlers. *Am J Dentistry*, San Antonio, v. 12, n. 2, p. 89-91, Apr. 1999.

UZEL A, SORKUN K, ÖNÇAG Ö, ÇOGULO D, GENÇAY Ö, SALIH B 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 160: 189-195.

VICENTINO ARR, MENEZES FS 2007. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Rev Bras Farmacogn* 17: 384-387.

VINHOLIS, A. H. C. et al. Mecanismo de ação da clorexidina. *Rev Periodontia*, São Paulo, v.5, n.3, p.281-283, jan./jun. 1996.

VOLPI N, BERGONZINI G 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42: 354-361.

WOISKY, R. G.; GIESBRECHT. M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera*. *Rev Farm Bioquím Univ São Paulo*, SP, v.30, n.1, p. 19-21, jan./jun. 1994.

WOISKY, R. G. do Rio. Métodos de controle químico de amostras de própolis. São Paulo. 1996. 74 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

ZANELA, N. L. M. et al. Influência de bochechos com soluções de digluconato de clorexidina a 0,2%, fluoreto de sódio a 0,05% pH 3,4 e esteviosídeo a 0,1% na inibição da placa dentária "in vivo", em crianças. *Rev Fac Odontol Bauru*, Bauru, v.5, n. ½, p. 71-78, jan./jun. 1997.

ZANELA, N. L. M.; BIJELLA, M. F. T. B; ROSA, O. P. S. The influence of muoثرinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children. *Pesq Odontol Bras*, São Paulo, v.16, n.2, p. 101-106, abr./jun. 2002.

ZÁRATE-PEREIRA, P. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%; fluoreto de sódio 0,2% e própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% sobre níveis salivares de estreptococcus do grupo mutans em pacientes cárie-ativos. 74f. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

ZÁRATE-PEREIRA, P. Avaliação in situ da ação de própolis de *Apis mellifera* no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental. 116f. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

CAPÍTULO III

CONCLUSÃO

PERSPECTIVAS

REFERÊNCIAS

3.1 CONCLUSÃO

No presente estudo conclui-se que, a própolis utilizada pode ser considerada uma própolis verde através do perfil cromatográfico, onde observou-se o Artepilin C como o componente químico majoritário.

Através das análises das micrografias obtidas pela microscopia eletrônica de varredura os extratos de própolis não promovem alteração na coloração e na parede estrutural dos dentes decíduos e permanentes, sendo possível utilizar como uma substância natural para proteção dos mesmos, podendo ser o uso da solução de extrato de própolis uma alternativa promissora no tratamento da diminuição do risco de adquirir as doenças bucais, como enxaguante bucal.

As amostras dos extratos de própolis estudadas possuem ação antioxidante muito pronunciadas.

Ensaio biológico da concentração bactericida mínima mostrou que os extratos de própolis estudados apresentam ação antimicrobiana, podendo ser uma alternativa para utilização de antisséptico bucal, colaborando em programas de prevenção à saúde bucal, porque a Saúde tem um papel relevante na atenção integral do indivíduo, contribuindo para a diminuição ao risco das doenças bucais e melhorando a qualidade de vida das pessoas.

As melhores funções dos parâmetros químicos e biológicos, através dos resultados obtidos, estão representadas pelas amostras de própolis de Cambará e Cianorte.

3.2 PERSPECTIVAS

- Quantificação dos compostos químicos identificados nos extratos de própolis por LC/MS;
- Estudo comparativo (qualitativo e quantitativo) dos extratos de própolis por GC/MS e LC/MS;
- Desenvolvimento de enxaguante bucal a base de própolis;
- Análise sensorial da formulação do enxaguante bucal a base de própolis;
- Aplicação da formulação do enxaguante bucal a base de própolis em escolares na avaliação da microbiota oral.

3.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR et al;. **Comunicação pessoal.**, 2012. Em publicação.

AHN M, KUMAZAWA S, USUI Y, NAKAMURA J, MATSUKA M, ZHU F, NAKAYAMA T 2007. **Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of China.** Food Chem 101: 1400-1409.

ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J.A.; REIS, F. P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M.A.G. ; CARDOSO, J. C. **Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model.** *International Journal of Morphology* (Print). 2009, 27, 1105-1110.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMAN, J. PARK, Y.K. **Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais.** *Ciência Rural*. 2005. 25(4), 909-915.

ALMEIDA, R.V.D.; CASTRO, R.D.; PEREIRA, M.S.V.; PAULO, M. Q.; SANTOS, J. P.; PADILHA, W. W. N. **Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas.** *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.* 2006; (1): 87-92.

AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L. E.; CORMIER, M. **In vitro antiviral activity of propolis.** *Apidologie*, 1992. 23, 231-240.

ANGELO, R. A.; SILVA, Y. T. S.; CASTRO, R. D.; ALMEIDA, R. V. D.; PADILHA, W. W. N. **Atuação Clínica e Microbiológica da solução de própolis para bochecho em crianças cárie ativas.** *Arquivos em Odontologia*. Vol. 43, n.03, jul/set de 2007.

ARVOUET-GRAND A, VENNAT B, POURRAT A, LEGRET P 1994. **Standardization of propolis extract and identification of principal constituents.** *J Pharm Belg* 49: 462-468.

AYRES DC, MARCUCCI MC, GIORGIO S. 2007. **Effects of Brazilian propolis in *Leishmania amazonensis*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 215-220.

BAAKILINI, M. F.; LARA, E. H. G; PANZERI, H. **Adición de própolis em formulaciones de dentifrícios. Evaluación de SUS propriedade y estabilidad.** *Ver Flora Oral*, São Paulo, v.2, n.6, p.130-133, dez.1996.

BACKER-DIRKS, O. **Posteruptive changes in dental enamel.** *J. Dent Rev.* 1966; 3(suppl): 503-11.

BANKOVA, V. **Chemical diversity of própolis and the problem of standardization.** Journal of ethnopharmacology, Limerick, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, Aug-2005.

BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; JORGE, L. L. R. **Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas.** *Acta Paul Enferm.* 2009, 22(3), 318-22.

BARROSO, P.R. et al. **Effect of própolis on mast cells in wound healing.** *Inflammopharmacology*, Basel, Dec. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.** Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº132 de 29 de maio de 2003. **Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. In: site da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.**

BRASIL. Ministério da Agricultura. Anexo VI – **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis.** Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 2002. Acessado em 12 abril de 2013. Online. Disponível na Internet http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/instnorm03_propolis6.htm..

BIJELLA, M. F. ZANELA, N. L. M.; T. B; ROSA, O. P. S. **The influence of muothrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children.** *Pesq Odontol Bras*, São Paulo, v.16, n.2, p. 101-106, abr./jun. 2002.

BOSIO, K. AVANZINI, C. DAVOLIO, A. OZINO, O. SAVOIA, D. **In vitro activity of própolis against Streptococcus pyogenes.** *Letters in applied microbiology*, oxford, v. 31, n. 2, p. 147-174, aug, 2000.

BORRELLI F, MAFFI P, PINTO L, IANARO A, RUSSO A, CAPASSO F, IALENTI A 2002. **Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract.** *Fitoterapia* 73: S53-S63.

BUISCHI, Y.; AXELSSON, P.; BARBOSA, M. F. Z.; MAYER, M. P. A.; PRADO, M. C. Q. B.; OLIVEIRA, L. B. **Salivary streptococcus mutans and caries prevalence in Brazilian Schoolchildren.** *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17: 28-30.

BUISCHI, Y. P. **Promoção de saúde bucal na clínica odontológica.** São Paulo: Artes Médicas, 2000.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHIMDT, E.M.; SANTOS, M.T.; ROSA, M.R.; QUINAIA, S.P.; TORRES, Y.R.; SANTA, H.S.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, P.M.P.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N. **Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico.** *Quimica Nova*. 2009, 32(2), 296-302.

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; FRANKLIN, I. **Antibiotic activity of natural products: 1.Própolis.** *Micróbios*, 1990;62:19-22.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. **Propolis, an old remedy used in modern medicine.** *Fitoterapia*, Milano, v. 73, suppl. 1, p. S1-S6, Nov. 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J.A; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. **Própolis do sudeste e Nordeste do Brasil: influencia da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica.** *Quimica Nova*. 2007, 30(7), 1512-1516.

CATEF - Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos.

Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis. 2005, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>, consultado em: 10/01/2011.

CHANG, R., PILO-VELOSO., MORAIS, S.A.L., NASCIMNETO, E.A. (2008). **Analysis of aBrazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 549-556.

CUESTA-RUBIO, O., PICCINELLI, A.L., FERNANDEZ, M.C., HERNANDEZ, I.M., ROSADO, A. RASTRELLI, L. **Chemical characterization of Cuban própolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red and yellow Cuban varieties of propolis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 7502-7509.

CHIRUMBOLO, S. **Propólís as anti-inflammatory and allergic compounds: which role for flavonoids?** *International immunopharmacology*, Amsterdam, v. 11, n. 9, p. 1386-1387, sept. 2011.

CHOI YM, Noh DO, CHO SY, SUH HJ, KIM KM, KIM JM 2006. **Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea.** *LWT* 39: 756-761.

CURY, J. A.; ROCHA, E. P.; KOO, H.; FRANCISCO, S. B.; CURY, A. A. D. B. **Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel.** *Braz Dent J*, Ribeirão Preto, v. 11, n.1, p.29-34, jan./junh. 2000.

CURY, J. A. TENUTA, L. **Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions?** *Braz Oral Res*, 2009; 23(1): 23-30.

DA SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; VIDAL, F.V.N. **Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities.** *Food Chem* 99: 431-435. 2006.

DANTAS AP, OLIVIERI BP, GOMES FHM, DE CASTRO SL 2006. **Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response.** *J Ethnopharmacol* 103: 187-193.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas.** Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. 2007.

DE CARLI, A. D. **Capacidade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* associada ao fluoreto de sódio no controle do biofilme dental [Dissertação].** Campo Grande: Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2007.

DUAILIBE, S. A.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F.J. **Effect of a própolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo.** *Journal of applied oral science*, Bauru. V. 15, n. 5, p. 420-423, oct, 2007.

DUARTE, C. A.; KFOURI, L. S. **Ação da própolis sob a forma de bochechos na formação da placa bacteriana e gengivite.** *RGO*, Porto Alegre, v.47, n.2, p.82-84, abr./jun. 1999.

FAROOQUI, T; FAROOQUI, A 2010. **Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review.** *Curr Nutr Food Sci* 6: 188-199.

FEATHERSTONE, J. D. B. **Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride.** *Community Dent Oral Epidemiol*, 1999; 27:31-40.

FEATHERSTONE, J.D.B. **Remineralization, the natural caries repair process-the need for new approaches.** *Adv. Dent. Res*, 2009; 21:4-7.

FERNANDES JUNIOR, A. et al. **Própolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. v. 100, n. 5, p. 563-566, Aug, 2005.

FERREIRA, A. B. H.; ANJOS, M.; FERREIRA, M. B. **Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa.** 5. ed. Curitiba: Positivo, 2010. 2220 p.

FERREIRA, R. C. V.; VALENTE, P. H. M.; BARBOSA, A. D. **Atividade antibacteriana da própolis.** *LECTA USF*, Bragança Paulista, v.14, n.2, p. 65-93, jul./dez. 1996.

FUNARI, C. S.; FERRO, O. **Análise de própolis.** *Ciênc.Tecnol. Aliment.* 26(1), 171-178.2006.

GARCIA, J.; et al. **Produção de própolis em colônias de *Apis mellifera* africanizadas pelas técnicas convencional de raspagem e coletor de própolis inteligente.** Maringá, PR. Anuário 1999/2000. Acessado em 12 de abril de 2013. Online. Disponível na Internet <http://www.cca.uem.gov/anu4600.htm>.

GAREDEW, A.; SCHMOLG, E.; SCHRICKER, B. E.; LAMPRECHET, I. **Microcalorimetric investigation of the action of propolis on *Varroa destructor* mites.** *Thermochimica Acta*, 2002. 382, 211-220.

GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C. G. D. C.; MAYER, M. P. A. **Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*.** Rev Odontol Univ São Paulo, SP, v. 10, n. 4, p.251-256, out/dez. 1996.

GIORGIO S, RIBEIRO MCM, AYRES DC 2006. **Composições medicamentosas a base de própolis brasileira tipificada com atividade leishmanicida e método de tratamento.** BR/SP PI 0601863-7 A.

GOLD, O. G; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. **A selective medium for *Streptococcus mutans*.** Arch Oral Biol, Oxford, v. 18, n. 11, p. 1357-1364, nov. 1973.

GREGORY SR, PICCOLO N, PICCOLO MT, PICCOLO MS, HEGGERS JP 2002. **Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns.** J Alter Complement Med 8: 77-83.

HAYACIBARA MF, KOO H, ROSALEN PL, DUARTE S, FRANCO EM, BROWEN WH, IKEGAKI M, CURY JA 2005. **In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development.** J Ethnopharmacol 101: 110-115.

HERNANDEZ, I. M., CUESTA-RUBIO, O., FERNANDEZ, M. C., PEREZ, A.R., PORTO, R.M.O. PICCINELLI, A.L., RASTRELLI, L. **Studies on the constituents of yellow Cuban própolis: CG-MS determination of triterpenoids and flavonoids.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2010, 58, 4725-4730.

HU F, HEPBURN HR, LI Y, CHEN M, RADLOFF SE, DAYA S. **Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute infl ammatory animal models.** J Ethnopharmacol 100: 276-283. 2005.

IKEDA, T.; SANDHAM, H. J.; BRADLEY, E. L. **Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caíres in Negro children.** Arch Oral Biol, 1973; 18: 555-66.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. **Effects of propolis on dental caries in rats.** Caries Res, Basel, v. 25, n. 5, p. 347-351, 1991.

ISLA, M.I. et al. **Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina.** Journal of medicinal food, Larchmont, v. 12, n. 6, p. 1334-1342, Dec. 2009.

KADOTA S, BANSKOTA AH, NAGAOKA T, SUMIOKA LY, TEZUCA Y, AWALE S, MIDORIKAWA K, MATSUSHIGE K 2002. **Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines.** J Ethnopharmacol 80: 67-73.

KHALIL, M. L. **Biological activity of bee propolis in health and disease.** Asian Pacific journal of cancer prevention, Bangkok, v.7, n.1, p.22-31, jan-mar, 2006.

KIMOTO, T. et al. **Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin C.** Pathology international, Carlton South, v. 50, n. 9, p. 679-689, sept. 2000.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; SATTTLER, A. **Effect de Apis mellifera propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats.** Caries Res, Basel, v. 33, n. 5, p. 393-400, Sep./Oct. 1999.

KOO, H.; GOMES, B. P.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. **In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens.** Arch Oral Biol, Oxford, v. 45, n. 2, p. 141-148, Feb.2000.

KOO, H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. **Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation.** Caries Res, Basel, v. 36, n. 6, p. 445-448, Nov./Dec. 2002.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. **Effects of compounds found in propolis on Streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity.** Antimicrob Agents Chemother, Washington, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, May. 2002.

KOO, H.; PEARSON, S. K.; SOOTT-ANNE, K.; ABRANCHES, J. CURY, J. A.; ROSALEN, P.

L.; PARK, Y. K.; MARQUIS, R. E.; BOWEN, W. H. **Effects of apigenin and tt-farsenol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats.** Oral Microbiol Immunol, 2003; 17: 337-43.

KOO, H.; SCHOBEL, B.; SCOTT-ANNE, K.; WATSON, G.; BOWEN, W. H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y.K. **Apigenin and tt-farnesol with fluorid on s. mutans biofilm and dental caries.** J. Dent Rest. 2005; 84 (11): 1016-1020.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; KNEZEVIC, S.V. **Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products.** *Acta Pharma*, 2005. 55, 423–430.

KOSALEC, I; SANKOVIC, K; ZOVKO, M; ORSOLIC, N; BAKMAZ, M; KALOGJERA, Z; PEPELJNJAK, S 2007. **Antimicrobial and antioxidant activity of propolis from Croatia and Brazil: a comparative study.** *Planta medica* 73 (9): 875.

KUJUMGIEV A, TSVETKOVA I, SERKEDJIEVA Y, BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S 1999. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** *J Ethnopharmacol* 64: 235-240

KUMAZAWA, S; NAKAYAMA, T 2001. **Polyphenols in propolis and their antioxidant activity.** *Honeybee Science* 22 (1): 1-8.

KUMAZAWA, S; HAMASAKA, T; NAKAYAMA, T 2004. **Antioxidant activity of propolis of various geographic origins.** *Food Chemistry* 84 (3): 329-339.

LANG, N.P.; HOTZ, P.R.; GUSBERTI, F.A.; JOSS, A. **Longitudinal clinical and microbiological study on the relation ship between infection with Streptococcus mutans and the development of caries in humans.** *Oral Microbiol Immunol*, 1987; 2: 39-47.

LI, F. et al. **Cytotoxicity of constituents from Mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines.** *Natural product communications*, Westerville, v. 5, n. 10, p. 1601-1606, Oct. 2010.

LIMA, M. G. **A produção de própolis no Brasil.** São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, 2006.

LOESCHE, W. J.; STRAFFON, L.H. **Longitudinal investigation of the role of Streptococcus mutans in human fissure decay.** *Infect Immun*, 1979; 26(2): 498-507.

LOESCHE, W. J. **Role of streptococcus mutans in human dental decay.** *Microbiol. Rev.* 1986; 50(4): 353-80.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. **Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol 18 (3): 447-454, jul/set de 2008.

MALTZ, M. **Cárie dental: Fatores relacionados.** In: PINTO, V. G. Saúde bucal coletiva. São Paulo: Santos, 2000. P. 319-339.

MALTZ, M.; BARBACHAN E SILVA, B.; CARVALHO, D. Q.; VOLKWEIS, A. **Results after two years of non-operative treatment of occlusal surface in children with high caries prevalence.** Braz Dent J, 2003; 14(1): 48-54.

MANARA, L. R. B.; ANCONI, S. I.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W. A. **Utilização da própolis em Odontologia.** Ver FOB, 1999; 7(3/4):15-20.

MANI F, DAMASCENO HCR, NOVELLI ELB, MARTINS EAM, SFORCIN JM 2006. **Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables.** J Ethnopharmacol 105: 95-98.

MARCUCCI, M. C. **Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis.** *Química Nova*, 1996. 19, 529-535.

MARQUELE FD, OLIVEIRA ARM, BONATO PS, LARA MG, FONSECA MJV 2006. **Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC.** J Pharm Biomed Anal 41: 461-468.

MARSH, P. D. **Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque.** Proc. Finn. Dent. Soc. 1991; 87: 515-25.

MARSH, P. D. **Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease.** Adv. Dent. Rev. 1994; 8(2):263-71.

MATSUDA AH, MACHADO LB, MASTRO NL. **Thermal analysis applied to irradiated propolis.** *Radiat Phys Chem* 63:353-355, 2002.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. **Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method.** *Phytotherapy Research*, v.15, p.127–130, 2001.

MIGUEL, M G; NUNES, S; DANDLEN, S A; CAVACO, A M; ANTUNES, M D 2010. Portugal. **Food and Chemical Toxicology Phenols and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of propolis from Algarve,** South of 48 (12): 3418-3423.

MORAES, E.; OTA, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T. **Influência da própolis na contagem de estreptococcus do grupo mutans.** In: Reunião Anual da SBPqO, 13, 1996, São Paulo: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 1996. p. 111.

MORAES, C.S. **Isolamento e identificação de formononetina da própolis de João Pessoa-PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas.** Tese de doutorado,

Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. São Paulo, SP, Brasil, 2009.

MOTA, H. C. N. **Avaliação clínica da própolis sobre a placa bacteriana e gengivite.** 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia Preventiva). Natal: Faculdade de Odontologia da UFRN; 2000.

MURRAY, M.C.; WORTHINGTON, H. V.; BLINKHORN, A.S. **A study to investigate the effect of a propoliscontaining mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation.** J Clin. Peridoniol, 1997; 24: 796-798.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Diagnosis and management of dental caries throughout life.** NIH Consensus Statement, 2001; 18: 1-30.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for Dilution Antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard, 7th Edition, CLSI document M7-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA, 2006.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically;** Approved Standard – Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 {ISBN 1-56238-486-4}. NCCLS, 940 West Valley Road, suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NUNES, L.C.C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A.S.O.; RUFINO, D.A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITO, A. M. G. L.; ROLIM NETO, P.J. **Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009. 19(2B), 524-529.

OOGARD, B.; SEPPA, L. ROLLA, G. **Professional topical fluoride applications-clinical efficacy and mechanism of action.** Adv. Dent. Res 1994; 8(2): 190-201.

OLDONI, T. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*.** Dissertação de mestrado, Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

OLDONI, T. L.C.; CABRAL, I.C.R.; D'ARCEA, M.A.B.R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. **Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis.** *Separation and Purification Technology*. 2011, 77, 208–213.

ORSOLIC N, KNEZEVIC AH, SVER L, TERZIC S, Basic I 2004. *J Ethnopharmacol* 94: 307-315. **Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds.**

ORSOLIC, N. et al. **Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth.** *Biological & pharmaceutical bulletin, Tokyo*, v. 28, n. 10, p. 1928-1933, Oct. 2005.

OTA, C, VALENTE, P. **Atividade da própolis sobre as bactérias isoladas da cavidade bucal.** *Lecta-UFS*. 16: 73-77, 1998.

OZKUL Y, SILICI S, ERÖGLU E. **The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture.** *Phytomedicine* 12: 742-747. 2004.

PADMAVATHI, R.; SENTHILNATHAN, P.; SAKTHISEKARAN, D. **Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbenz(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. Comparative biochemistry and physiology.** *Toxicology & pharmacology, New York*, v. 143, n. 3, p. 349-354, July 2006.

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, fev./mar. 1999.

PARK, Y. K. ; KOO, M. H.; ABREU, J.A.; ROSALEN, P. L. **Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms.** *Curr. Microbiol* 1998; 36: 24-8.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. **Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas.** *Mensagem Doce*. 2000. 58, 3-7.

PARK, Y.K, ALENCAR, S.M, AGUIAR, C.L. **Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. .50, 2502-2506.

PAULINO, N. et al. **Bulgarian própolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle.** *Journal of pharmacological sciences, Kyoto*, v. 93,n.3, p. 307-313, Nov. 2003.

PEREIRA AS, SEIXAS FRMS, AQUINO Neto FR 2002. **Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** *Quim Nova* 25: 321-326.

PEREIRA, J. V. **Estudos com o extrato da Punica granatum Linn. (romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental.** 88f. Tese (Doutorado em Estomatologia), João Pessoa: UFPB/UFBA, 2002.

PETERLINI, C.; ELMADJAN NETO, M.; VALLE, P. D.; ROMERO, S. S. **Efeitos adversos da clorexidina.** Rev Odontol Univ Santo Amaro, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 32-34, jan./jun. 1998.

PICINELLI, A.L; CAMPO, M.; CUESTA-RUBIO,O.; MARQUEZ, I.; DE SIMONE, F. RASTRELLI, L. **Isoflavonoids isolated from cuban própolis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005, 53, 9010-9016.

PRYTZYK E, DANTAS AP, SALOMÃO K, PEREIRA AS, BANKOVA VS, DE CASTRO SL, Aquino Neto FR 2003. **Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis.** *J Ethnopharmacol* 88: 189-193.

QUINTERO-MORA, M. L. et al. **Effect of Mexican própolis extracts from Apis mellifera on Candida albicans in vitro growth.** Revista Iberoamericana de micologia. Madrid. V.25, n.1, p. 22-26, Mar. 2008.

ROCHA L, DOS SANTOS LR, ARCENIO F, CARVALHO ES, LUCIO EMRA, ARAUJO GL, TEIXEIRA LA, SHARAPIN N 2003. **Otimização do processo de extração de própolis através da verifi- cação da atividade antimicrobiana.** Rev Bras Farmacogn 13: 71-74.

RUSSO, A.; LONGO, R. E.; VANELLA, A. **Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin.** *Fitoterapia.* 2004. 73, 21-29.

SAHINLER, N. & KAFTANOGLU, O. **Natural product propolis: chemical composition.** *Natural Product Research.* 2005. 19(2), 183-188.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRIL, G.; MESSAGE, D. **Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis.** 2 ° ed, Cambridge: Oxford University Press. 2005, 33-38.

SALATINO, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., Salatino, M. L. F. (2011). **Propolis research and the chemistry of plant products.** *Natural Product Reports,* 28, 925-936.

SANTOS, V. R. **Própolis: antibiótico natural alternativo em Odontologia (revisão de literatura).** Rev CROMG, Belo Horizonte, v. 5, n. 3, p. 192-195, set./dez. 1999.

SCAZZOCCHIO F, D'AURIA FD, ALESSANDRINI D, PANTANELLA F. 2005. **Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis.** *Microbiol Res* 4: 327-333.

SFORCIN, J.M, FERNANDES J.R.A, LOPES, C.A.M., BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.** *J. Ethnopharmacol.* 2000.73, 243-249.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, A.; Jr. LOPES, C.A.M.; FUNARI, S.R.C.; BANKOVA, V. **Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.** *Journal of Venomous Animals and Toxins.* 2001. 7, 139-144.

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. **Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production.** *J Ethnopharmacol*, 2005; 98: 301-305.

SIMÕES CC, ARAUJO DB, ARAUJO RPC 2008. **Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos.** *Rev Bras Farmacogn* 18: 84-89.

SOARES, A. K. A.; CARMO, G. C.; QUENTAL, D. P.; NASCIMENTO, D. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. **Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis.** *Rev Bras Farmacogn.* 2006.16, 447-454.

SONG, Y.S.; JIN, C.B.; JUNG, K.J.; PARK, E.H. **Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis.** *Journal of Ethnopharmacology.* 2002. 82, 89-95.

SUGIMOTO, Y.; TARUMI, T.; KANEKO, Y.; ISAYAMA, S.; KAWAI, N.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H. E.; KAMEI, C. **Effect of propolis extract on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats.** *Biological & pharmaceutical bulletin*, 1999. 22, 1237-1239.

STEINBERG, D.; KAINE, G.; GEDALLA, I. **Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria.** *Am J Dentistry*, San Antonio, v. 9, n.6, p. 236-239, Dec. 1996.

STARZYK, J.; SCHELLER, S.; SZAFŁAVISKI, J.; MOSKWA, M. E.; STOJKO, A. **Biological properties and clinical application of propolis II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis.** *Arzneimittel-Forschung*, 1997. 27, 1198-1199.

STOOKEY. G, K. **Caries prevention.** *J. Dent Educ*, 1998; 62:803-11.

SY LB, WU Y, CHIANG B, WANG Y, WU W 2006. **Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model.** *Int Immunopharmacol* 6: 1053-1060.

TAVARES JP, MARTINS IL, VIEIRA AS, LIMA FAV, BEZERA FAF, MORAES MO, MORAES MEA 2006. **Estudo de toxicologia clínica de um fototerápico a base de associações de plantas, mel e própolis.** *Rev Bras Farmacogn* 16: 350-356.

TWETMAN, S.; GRINDEFJORD, M. **Mutans streptococci suppression by chlorhexidine gel in toddlers.** *Am J Dentistry*, San Antonio, v. 12, n. 2, p. 89-91, Apr. 1999.

TRUSHIVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMONA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. **Bioactive constituents of Brazilian red propolis. e CAM.** 2006. 3, 249-254.

UZEL A, SORKUN K, ÖNÇAG Ö, ÇOGULO D, GENÇAY Ö, SALIH B 2005. **Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples.** *Microbiol Res* 160: 189-195.

VICENTINO ARR, MENEZES FS 2007. **Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH.** *Rev Bras Farmacogn* 17: 384-387.

VINHOLIS, A. H. C. et al. **Mecanismo de ação da clorexidina.** *Rev Periodontia*, São Paulo, v.5, n.3, p.281-283, jan./jun. 1996.

VOLPI N, BERGONZINI G. **Analysis of flavonoids from propolis by on line HPLC-electrospray mass spectrometry.** *J Pharm Biomed Anal* 42: 354-361, 2006.

WOISKY, R. G.; GIESBRECHT. M.; SALATINO, A. **Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera*.** *Rev Farm Bioquím Univ São Paulo*, SP, v.30, n.1, p. 19-21, jan./jun. 1994.

WOISKY, R. G. do Rio. **Métodos de controle químico de amostras de própolis.** São Paulo. 1996. 74 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

ZANELA, N. L. M. et al. **Influência de bochechos com soluções de digluconato de clorexidina a 0,2%, fluoreto de sódio a 0,05% pH 3,4 e esteviosídeo a 0,1% na inibição da placa dentária “in vivo”, em crianças.** *Rev Fac Odontol Bauru*, Bauru, v.5, n. ½, p. 71-78, jan./jun. 1997.

ZANELA, N. L. M.; BIJELLA, M. F. T. B; ROSA, O. P. S. **The influence of muothrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque and on the levels of mutans streptococci in children.** *Pesq Odontol Bras*, São Paulo, v.16, n.2, p. 101-106, abr./jun. 2002.

ZÁRATE-PEREIRA, P. **Avaliação in situ da ação de própolis de Apis mellifera no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental.** 116f. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

ZÁRATE-PEREIRA, P. **Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%; fluoreto de sódio 0,2% e própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% sobre níveis salivares de estreptococcus do grupo mutans em pacientes cárie-ativos.** 74f. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

ZERO, D. T. **Dental caries process.** Dent clin North Amer, Philadelphia, v.43, p.635-663, oct.1999.