



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Leliene Suely Rodrigues Pereira

Atividade antimicrobiana de soluções de própolis

Rio de Janeiro

2001

Leliene Suely Rodrigues Pereira

Atividade antimicrobiana de soluções de própolis

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Ricardo Guimarães Fischer

Co-orientador: Rafael Hirata Júnior

Rio de Janeiro

2001

Leliene Suely Rodrigues Pereira

Atividade antimicrobiana de soluções de própolis

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 30 de agosto de 2001.

Orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Rafael Hirata Júnior

Faculdade de Odontologia – UERJ

Banca examinadora:

Prof. Dr. Walter Augusto Soares Machado

Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Eduardo Muniz Barreto Tinoco

Universidade de OSLO

Prof.^a Dra. Simone de Queiroz Chaves Lourenço

Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro

2001

DEDICATÓRIA

A meus queridos e amados irmãos Maria da Graças, Evandro e Sérgio, pela presença e parceria de vida.

À minha querida e amada mãe, Nair, pela presença forte e serena em todos os momentos de minha vida.

Ao meu querido e amado pai, Orozimbo, por ter me despertado e preparado para os caminhos da Odontologia.

AGRADECIMENTOS

Ao Divino Espírito Santo, pela manifestação de seus sinais em minha vida. Ao Professor Doutor Ricardo Guimarães Fischer.

Meu orientador, pelo critério científico, conhecimento e espírito crítico fundamentais para a realização desta tese.

Ao Professor Raphael Hirata Junior, meu co-orientador, pela dedicação, capacidade técnica e científica, inestimável paciência e amizade essenciais para a conclusão deste trabalho

Ao Professor Doutor Walter Augusto Hoares Machado, pelo estímulo e por ter despertado meu espírito crítico.

As bioquímicas, Jussara Alves, Claudia e Elizabete Pereira dos Santos, pela atenção, empenho e orientação científica fornecidos a este trabalho.

A responsável pelo setor de fitoterápicos do LCQ, Andrea Pedroza Cardozo, pela paciência, disponibilidade e empenho técnico durante as análises das amostras.

A monitora da disciplina de Microbiologia, Marina, pelo suporte técnico durante os experimentos.

Aos amigos da turma de mestrado, área de concentração em Periodontia, Volusia, Esio, Dalton e Joel, pelo companheirismo e pelos agradáveis momentos compartilhados.

A minha querida irmã, Grapa Lara pela amizade, carinho, atenção e pela assessoria nas pesquisas jornalísticas.

Aos meus queridos irmãos, Evandro e Sérgio, companheiros de profissão e de vida. As minhas queridas amigas, Magali e Rosângela, pelo apoio, incentivo e carinho constantes.

As minhas queridas amigas Kerma, Marivânia e Sandra, pelo carinho e atenção e pelo apoio no início de minha carreira profissional no Rio de Janeiro.

Aos meus queridos sogros Nilda e Jorge, pelo incentivo e apoio.

A minha secretária Kelli, pela dedicação na condução do consultório durante minhas ausências.

Aos funcionários do Curso de Mestrado da Faculdade de Odontologia da UERJ, Wilma, Antônio e Denise, pela dedicação, disponibilidade e convívio agradável proporcionado ao longo do curso.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Quando o homem ainda não povoava a terra, as laboriosas abelhas já trabalhavam incansavelmente, já que com elas, a sabia natureza havia conseguido uma das maiores formas de organização coletiva e especializada individual, tão perfeita que não houve necessidade de altera-la. Desde o aparecimento da abelha (*Apis mellifera*) na face da terra, há cerca de 41 milhões de anos, houve pouca necessidade de evolução. Além de criar uma vivenda que poderia servir de modelo de funcionalidade ao mais experimentado arquiteto (a colméia), satisfazer suas necessidades nutricionais com um dos alimentos mais completos (o mel), e elaborar substâncias cuja atividade biológica é capaz de dar qualidades específicas às larvas com elas alimentadas (a geléia real), a abelha teve também necessidade de criar sistemas de defesa para proteger-se de seus predadores criando uma arma individual (o veneno) e uma arma coletiva (a própolis).

Darcy José Gueto Levy

RESUMO

PEREIRA, Leliene Suely Rodrigues. **Atividade antimicrobiana de soluções de própolis.** 2001. 55 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

O presente estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de soluções extrativas de própolis sobre cepas bacterianas usadas como referência em testes de susceptibilidade a antimicrobianos e sobre dois periodontopatógenos, através de teste de difusão em ágar e concentração mínima inibitória. Foram utilizadas três soluções extrativas de própolis: uma delas comercializada como extrato etanólico de própolis a 50% em álcool 90°GL e outras duas manipuladas a partir da própolis *in natura* para obtenção de soluções de própolis a 50% em álcool 70°GL. As amostras utilizadas no estudo foram submetidas a análise cromatográfica em camada delgada, apresentando os flavonóides pré-qualificados pelo padrão: quercetina, crisina, galangina, tectocrisina e pinocembrina. As cepas bacterianas utilizadas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram cultivadas em ágar Müeller-Hinton a 36°C por 48 horas. As cepas dos microrganismos periodontopatogênicos: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29522) foram cultivadas em ágar sangue suplementado com hemina e menadiona, e incubadas a 36°C durante 5 dias, em jarras de anaerobiose. O inóculo foi preparado na concentração 1 da escala de McFarland. Para o teste de difusão em ágar discos de papel de 7 mm de diâmetro foram impregnados com 10µl das soluções extrativas de própolis. Como controle, foram utilizados 10µl do solvente álcool etílico a 70% e a 90%. Para os testes com os microrganismos anaeróbios facultativos e *P. aeruginosa*, os inóculos foram semeados em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton e incubadas a 36°C por 48 horas. Para a *P. gingivalis* e para o *A. actinomycetemcomitans*, o meio utilizado for ágar sangue suplementado. Após a distribuição dos discos de papel, as placas foram incubadas em atmosfera de anaerobiose, a 36°C por 5 dias. Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), as soluções de própolis foram diluídas ou não, em meio de cultura nas proporções 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 e 1:2560. O meio utilizado na avaliação da CIM para os anaeróbios facultativos e para a *P. aeruginosa* foi o ágar Müeller-Hinton e para a *P. gingivalis* e para o *A. actinomycetemcomitans*, ágar sangue suplementado. As superfícies dos meios foram semeadas com 4µl de inóculo e as placas foram incubadas a 37°C por um período mínimo de 48 horas. Nos resultados obtidos pelo teste de difusão em ágar *S. aureus*, *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* foram inibidos pelas três soluções extrativas testadas. Na avaliação da concentração mínima inibitória o *E. faecalis* e as espécies que apresentaram sensibilidade ao teste de difusão em ágar foram inibidos por diferentes concentrações das soluções analisadas. A *P. aeruginosa* e a *E. coli* foram resistentes as menores diluições das soluções extrativas de própolis (1:20) no meio de cultura. Os maiores padrões de inibição foram evidenciados em relação a *P. gingivalis*. Em todos os testes, os microrganismos foram resistentes ao solvente: etanol a 70°GL e a 90°GL.

Palavras – chave: Própolis. Bactérias. Antimicrobianos.

ABSTRACT

PEREIRA, Leliene Suely Rodrigues. **Antimicrobial activity of propolis solutions**. 2001. 55 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

The present study aimed to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of propolis extractive solutions on bacterial strains used as reference in antimicrobial susceptibility tests and on two periodontopathogens, through agar diffusion test and minimum inhibitory concentration. Three extractive propolis solutions were used: one marketed as 50% ethanolic propolis extract in 90°GL alcohol and the other two manipulated from *in natura* propolis to obtain 50% propolis solutions in 70°GL alcohol. The samples used in the study were submitted to thin layer chromatographic analysis, presenting the flavonoids pre-qualified by the standard: quercetin, chrysin, galangin, tectochrysin and pinocembrin. The bacterial strains used: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) were cultivated on Müeller-Hinton agar at 36°C for 48 hours. The strains of periodontopathogenic microorganisms: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29522) were cultured on blood agar supplemented with hemin and menadione, and incubated at 36°C for 5 days in anaerobic jars. The inoculum was prepared at concentration 1 on the McFarland scale. For the agar diffusion test, 7 mm diameter paper discs were impregnated with 10µl of the propolis extractive solutions. As a control, 10µl of the 70% and 90% ethyl alcohol solvent were used. For tests with facultative anaerobic microorganisms and *P. aeruginosa*, the inoculums were seeded in Petri dishes containing Müller-Hinton agar and incubated at 36°C for 48 hours. For *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, the medium used was supplemented blood agar. After distributing the paper discs, the plates were incubated in an anaerobic atmosphere at 36°C for 5 days. For the evaluation of the minimum inhibitory concentration (MIC), the propolis solutions were diluted or not, in culture medium in the proportions 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280 and 1:2560. The medium used to evaluate the MIC for facultative anaerobes and for *P. aeruginosa* was Müller-Hinton agar and for *P. gingivalis* and for *A. actinomycetemcomitans*, supplemented blood agar. The media surfaces were seeded with 4µl of inoculum and the plates were incubated at 37°C for a minimum of 48 hours. In the results obtained by the agar diffusion test, *S. aureus*, *P.gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* were inhibited by the three extractive solutions tested. In the evaluation of the minimum inhibitory concentration, *E. faecalis* and the species that showed sensitivity to the agar diffusion test were inhibited by different concentrations of the analyzed solutions. *P. aeruginosa* and *E. coli* were resistant to lower dilutions of propolis extractive solutions (1:20) in the culture medium. The highest inhibition patterns were evidenced in relation to *P. gingivalis*. In all tests, the microorganisms were resistant to the solvent: ethanol at 70°GL and 90°GL.

Keywords: Propolis. Bacteria. Antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Soluções extrativas de própolis e solventes etanólico a 90 GL.....	33
Figura 2 –	Própolis Super-Green e Paraná-Green in natura.....	33
Figura 3 –	Cuba e placa cromatográficas.....	34
Figura 4 –	Leitura cromatográfica da solução extrativa Nova Era (on amostra A.)	34
Figura 5 –	Leitura cromatográfica da solução extrativa Super-Green (ou amostra B).....	35
Figura 6 –	Leitura cromatográfica da solução extrativa Paraná-Green (on amostra ^).....	35
Figura 7 –	Halo de inibição gerado pelas amostras A, B e C sobre Staphylococcus aureus. Evidenciação de resistência microbiana ao solvente etanólico a 70 GI. Teste de difusão em ágar.....	39
Figura 8 –	Spots bacterianos de Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis e Escherichia coli evidenciados em avaliação de Concentração Mínima Inibitória.....	39
Figura 9 –	Halo de inibição gerado pelas amostras A, B e C sobre Porphyromonas gingivalis. Evidenciação de resistência microbiana ao solvente etanólico a 70‘GL Teste de difusão em ágar.....	40
Figura 10 –	“Spots” bacteriano de Actinobacillus actinomycetemcomitans evidenciado em avaliação de Concentração Mínima Inibitória.....	40
Figura 11 –	“Spots” bacteriano de Porphyromonas gingivalis, evidenciado em avaliação de Concentração Mínima Inibitória.....	41

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	11
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1	Própolis - Generalidades.....	14
1.1.1	<u>Definição e Características.....</u>	14
1.1.2	<u>Origem.....</u>	14
1.1.3	<u>Composição.....</u>	16
1.1.4	<u>Funções na colméia.....</u>	17
1.1.5	<u>Processamento.....</u>	18
1.1.6	<u>Vias de administração.....</u>	19
1.1.7	<u>Toxicidade.....</u>	19
1.1.8	<u>Emprego terapêutico geral.....</u>	20
1.2	Própolis — Atividade Antimicrobiana.....	20
2	PROPOSIÇÃO.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Soluções extrativas de própolis testadas.....	28
3.1.1	<u>Preparo das soluções a partir da própolis <i>in natura</i>.....</u>	28
3.1.1.1	<u>Análise técnica da própolis <i>in natura</i>.....</u>	28
3.1.1.2	<u>Processo extrativo da própolis <i>in natura</i>.....</u>	29
3.1.2	<u>Análise cromatográfica das soluções de própolis.....</u>	29
3.2	Cepas bacterianas e condições de cultivo.....	30
3.3	Preparo do inóculo.....	31
3.4	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	31
3.4.1	<u>Teste de difusão em ágar.....</u>	31
3.4.2	<u>Concentração Inibitória Mínima.....</u>	32
4	RESULTADOS.....	36
5	DISCUSSÃO.....	42
	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

INTRODUÇÃO

A gengivite induzida pela placa bacteriana, sempre precede periodontite (LOE, 1986). Embora as lesões de gengivite evoluam necessariamente para periodontite, não é possível distinguir lesões de gengivite que progredirão ou não para a perda de inserção periodontal (PAGE, 1986). Para que isto ocorra, é necessária uma cooperação interativa multifatorial, que envolve bactérias específicas, genética e fatores tais modificadores e de risco PAGE et al., 1997).

A chave para a prevenção das doenças periodontais é o controle de placa dentária bacteriana. O controle químico desta, fundamenta-se nas deficiências do controle mecânico (ADDY; GRIFFITHS; ISSAC, 1977), que depende da cooperação e da destreza individual, sendo, frequentemente, inadequada. De acordo com Collaerf et al. (1992) agentes químicos que atuam quantitativa e/ou qualitativamente sobre a placa bacteriana e exerçam repercussão positiva em relação a saúde periodontal, podem ser empregados como adjuvantes do controle mecânico. A terminologia direcionada aos agentes químicos deve ser particularizada, já que compreendem ações diferentes sobre os aspectos microbiológicos e clínicos. A nomenclatura proposta em 1996 pelo segundo " *European Workshop on Periodontics*". esclarece os termos. Agentes com atividade antimicrobiana podem apresentar efeitos bacteriostáticos ou bactericidas *in vitro*, que não devem, entretanto, ser extrapolados para um efeito comprovado sobre a placa *in vivo*. Efeito *anti-placa* produz uma prolongada e profunda redução nos níveis de placa, suficientes para prevenir o desenvolvimento de gengivite e/ou carie. Anti-gengivite correlaciona-se a ação na redução da inflamação gengival sem necessariamente influenciar o desenvolvimento da placa (incluem agentes anti-inflamatórios). Efeito inibidor ou redutor de placa define redução quantitativa e. ou qualitativa de placa, em níveis suficientes ou não, para prevenir o desenvolvimento de gengivite e/ou carie. Agentes antimicrobianos e inibidores de placa veiculados em colutórios ou dentifrícios se direcionam ao tratamento e controle da gengivite crônica e só afetam o espaço supra gengival. Devem ser diferenciados de agentes direcionados ao controle de placa sub-gengival, que precisam de acesso na bolsa periodontal em concentração suficiente para produzir efeito (ELEY, 1999).

Agentes utilizados em colutórios, podem ser categorizados em três grupos (ELEY, 1999) com base em atividade antimicrobiana sobre bactérias da placa, possível efeito antiinflamatório e substantividade. Esta última propriedade parece ser a maior variável que

influencia o controle de placa (KORNMAN; LOESCHE, 1980), permitindo a permanência do quimioterápico geralmente por adsorção as superfícies bucais e sua liberação lenta, sob forma ativa. A classificação divide os agentes em:

- a) Grupo 1- aqueles com substantividade e espectro bacteriano adequado, com efeitos anti-placa satisfatórios: clorexidina (HENNESSY, 1977), salifluór (GENCO, 1994) e o delmopinol (COLLAERF et al., 1992), sendo que estes dois últimos estão ainda sob estudo.
- b) Grupo 2 - agentes com pouca ou sem substantividade, mas com espectro antibacteriano satisfatório: cloreto de cetil piridíneo (LOPEZ et al 1995), compostos fenólicos (FORRELLI; SUNDIN; LINDHE, 1975) e triclosan (SCHAEKEN et al., 1996).
- c) Grupo 3- agentes que possuem efeito antimicrobiano *in vitro*. mas em estudos clínicos mostram ação baixa ou moderada sobre a inibição de placa bacteriana ou não apresentam diferenças estatística em relação ao controle negativo ou placebo: hexetidine (HARPER et al., 1995), povidine iodone (ADDY; GRIFFITHS; ISAAC, 1977), agentes oxigenantes (WENNSTROM; LINDHE, 1979) e sanguinarina.

A própolis, um produto de origem animal, produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*, é um agente químico que tem sido alvo de pesquisas recentes no controle de placa bacteriana. Em estado bruto, é uma resina de coloração e consistência variada consistindo de exsudatos coletados de plantas nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaborar ao final do produto (PARK et al., 1997). Apresenta propriedades antissépticas, antimicrobianas, bacteriostáticas, adstringentes, espasmolíticas, hipotensivas, citostáticas, antiinflamatórias, imunomoduladoras, anestésicas, antioxidantes, dentre outras. Seu emprego em odontologia tem se baseado em empirismo, sendo poucos os trabalhos que realmente atestam efetividade. A própolis tem sido testada para controle químico de placa bacteriana, veiculada normalmente sob a forma de colutórios. Martinez et al. (1992) e Oppermann (1996), observaram redução significativa na formação de placa bacteriana supragengival. Os resultados de Murray, Worthington, Blinkorn (1997) e Duarte e Kfour (1999) não evidenciaram efeitos da própolis nos índices de placa. Silveira et al. (1988) formularam um agente a base de própolis para tratamento de gengivite e úlceras bucais. A denominação proposta foi de Propolán e constituía-se de própolis a 50% em álcool 95 GL, propilenoglicol e colóide flexível. Após sucessivas aplicações sob a forma de irrigação local,

os autores observaram redução do quadro inflamatório gengival. Alguns estudos relataram atividade de própolis sobre *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus in vitro* (GEBARA; ZARDETTO, 1996) e *in vivo* (STEINBERG; KAINE; GEDALIA, 1996). Ikeno, Ikeno e Myazawa (1991) verificaram redução significativa nos índices de cárie dentária em ratos, devido as ações da própolis sobre a microbiota cariogênica, em especial sobre inibição da síntese de glucanos insolúveis e sobre a glicosiltransferase presente nos estreptococos do grupo mutans.

Grange e Davey (1990), observaram efeito inibitório preferencial da própolis sobre cocos e bacilos G⁺, o que justificaria o efeito sobre a placa bacteriana dentária. A própolis poderia ser enquadrada no grupo C de agentes utilizados para controle de placa, se estudos *in vitro* comprovassem efetividade sobre microrganismos presentes na placa dentária, já que *in vivo* os resultados são controversos. Esta possibilidade qualificaria a própolis como agente de efeito antimicrobiano sobre o controle de placa bacteriana. No entanto, a diversidade relacionada a própolis, dificulta uma padronização dos efeitos e exige estudos mais detalhados e direcionados. Vários fatores incluindo origem botânica, ciclos evolutivos das plantas provedoras que condicionam variações nas concentrações das resinas, fatores climatológicos, área de deposição na colméia (MARCUCCI, 1995) alteram a composição da própolis. Segundo Park et al. (1997) sua composição química depende da espécie de abelha, da região geográfica e da fonte botânica de origem, dos métodos extrativos aplicados e do controle de qualidade de cada fabricante.

Este estudo objetiva avaliar a atividade antimicrobiana genérica da própolis, sobre microrganismos frequentemente utilizados para avaliação e controle de qualidade de antissépticos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* e atividade antimicrobiana específica sobre dois microrganismos periodontopatogênicos: *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PRÓPOLIS – GENERALIDADES

1.1.1 Definição e Características

Própolis é um nome genérico para uma substância resinosa, coletada por abelhas melíferas a partir de várias fontes de plantas. É o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas de brotos, flores e exsudatos de plantas nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (BRASIL, 2001).

Seu significado etimológico origina-se do grego e relaciona-se a função defensiva e protetora (“pro “- diante ou defesa; “polis “-cidade ou colméia) (GHISALBERTI, 1979).

De consistência semelhante a cera, a própolis é produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. É uma substância resinosa dura e quebradiça quando fria, mas mole e pegajosa quando aquecida. A cor da própolis, em estado bruto, varia do amarelo-esverdeado ao marrom escuro ou avermelhado, dependendo de sua idade e sua fonte. Apresenta um odor característico, que pode variar de uma amostra para outra. Existem própolis que não apresentam odores (MARCUCCI, 1995). Ela pode ser parecida com uma cola aromática. Como apresenta forte interação com óleos e proteínas da Tele, sua remoção desta superfície é difícil) (GHISALBERTI, 1979).

1.1.2 Origem

Marcucci (1995) salientou que os componentes da própolis, em estado bruto, têm origem a partir de três fontes distintas: dos exsudatos de plantas coletados, de substâncias secretadas a partir do metabolismo das abelhas e de materiais e produtos introduzidos durante elaboração da própolis. Existem vários trabalhos que investigam a origem botânica da própolis. Geralmente é aceito que as abelhas coletam a própolis da resina de rachaduras nas

cascas das arvores e de brotos de folhas (CONE, 1988). As abelhas selecionam as resinas que necessitam e em cada diferente região, escolhem grupos específicos de plantas. De acordo com Ghisalberti (1979), aceita-se que abelhas coletam própolis de várias fontes de plantas presentes na Europa, principalmente de espécies de alamos (gênero *Populus*, família Salicaceae; choupo-branco). Videiros ou bétulas, olmeiros, amieiros, faias e coníferas têm importância secundária, embora na Rússia Central, videiros predominem em relação aos alamos Alfonsus (1983). Nos Estados Unidos da América, alamos e pinheiros são as principais fontes de própolis. Mesmo em áreas desérticas do sudoeste da América do Norte, álamos são fonte predominante de própolis (KONIG, 1985). Segundo Ghisalberti (1979), na Austrália, eucaliptos são importantes fontes nativas de própolis na região oeste, como também *Xanthorrhoea pressii* e *Xanthorrhoea australis*. Na América do Sul não existem arvores de alamos. Na própolis venezuelana, a resina extraída de flores de espécies *Clussia* (*C. minor* e *C. major*), da família Guttifereae são a principal fonte de própolis (VIT et al., 1993). Benzofenonas polipreniladas, contida nestas resinas, foram encontradas na maior parte das amostras estudadas.

Bankova et al. (1996), avaliaram a composição de uma amostra de própolis *in natura* coletada no estado do Paraná, Brasil. A resina foi submetida a processo extrativo e metanol e através de repetidas cromatografias em coluna, 4 ácidos diterpênicos tipo labdano e seringaldeído foram isolados. Os diterpenos encontrados foram relacionados como típicos de algumas espécies *Araucaria*, indicando uma provável origem da própolis brasileira da região sul. Banskota et al. (1998) analisaram os constituintes da própolis brasileira, e a partir do isolamento de componentes prenilados e labdano diterpenos correlacionaram *Baccharis spp.*, *Clussia minor*, *Clussia major* e *Araucaria heterophylla* como prováveis fontes.

Bankova et al. (1999) analisaram qualitativamente, amostras de própolis e exsudatos de três espécies botânicas frequentemente citadas como fontes de própolis no Brasil: *Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria angustifolia* e *Eucalyptus citriodora*. Sob bases químicas, verificaram que *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte de própolis do estado de São Paulo.

Cattorini, (1963) descreveu a coleta de substratos para a própolis a partir de brotos de alamos. Segundo ele, as abelhas coletavam exsudato resinoso de brotos nas arvores e os quebravam em pedaços usando suas patas traseiras e a boca. Esses pedaços eram, então, umedecidos com a língua e amassados dentro de películas, pelas mandíbulas. Com a ajuda das patas, as abelhas levavam as películas da boca ao longo dos pelos da tíbia até a corbícula,

indentação sem pelos no lado externo da tíbia posterior. Enquanto armazenavam pedaços da própolis na corbícula, as abelhas já se preparavam para tatear mais resina. Quando a corbícula estava preenchida, a abelha finalmente levava a própolis para a colméia. Elas poderiam esperar na parede da colméia alinhadas por um período que variava de 1 hora a 2 dias, até que o carregamento de própolis fosse removido por outras abelhas, que imediatamente o usavam. Essas abelhas eram mais velhas que aquelas que construíam. Os favos de mel e as glândulas para umedecimento da cera eram atrofiadas. A coleta da própolis poderia levar um longo tempo e poderia ser interrompida por visitas a colméia para alimentação.

1.1.3 Composição

Através de vários métodos de análise como líquida de alta pressão e cromatografia gasosa, cerca de 160 diferentes compostos têm sido identificados na própolis (WALKER; CRANE, 1987; GREENWAY et al., 1991). Segundo Park et al. 1997, sua composição química depende da espécie de abelha, da região geográfica e da fonte botânica de origem, dos métodos extrativos aplicados e do controle de qualidade de cada fabricante. Geralmente, a composição básica é de 50% a 55% de resinas e balsamos vegetais, 20% a 30% de cera, 5% a 10% de óleos essenciais e 4% a 5% grãos de pólen e 5% de outras substâncias de origem orgânica e mineral como terra, cinzas, oligoelementos (alumínio, cálcio, bário, bismuto, cobalto, cobre, estrôncio, iodo, lítio, magnésio, níquel, prata, potássio, vanádio, zinco, cromo, ferro, manganês, chumbo e silício), vitaminas do complexo B (B1, B2, B6, PP), vitaminas A, C e E (LEJEUNE; POURRAT; DEHMOUCHE 1988; SANTOS, 1999).

Em zonas temperadas, flavonóides, derivados de benzopironas presentes nas células de fotossíntese, são os principais componentes da própolis. Funcionalmente participam da fase light da fotossíntese como catalizadores do transporte de elétrons e/ou como reguladores de canal de íons envolvidos na fosforilação. Com a morte da célula de fotossíntese, são liberados e aparecem no suco da planta (HAVSTEEN, 1983). Agliconas flavonóides compreendem a maior parte dos compostos fenólicos da própolis e estão associadas às suas propriedades. Também podem ser encontrados sob a forma de glicosídeos e derivados metilados. Os flavonóides são onipresentes no reino vegetal e apresentam, na maior parte das vezes, baixa toxicidade, sendo componente comum da dieta humana (TSUCHIYA et al., 1996).

Própolis da Venezuela (VIT et al., 1993) e do Brasil (AGA et al., 1994) apresentam composição química diferenciada daquela das zonas temperadas, pois os polifenóis dos alamos não estão presentes. Existe uma variação na composição química dependendo do sitio de coleta, os flavonóides geralmente estão ausentes ou em baixas concentrações e são encontradas quantidades substanciais de prenilados, derivados de benzofenonas e ácidos cinâmicos.

Amostras de própolis foram coletadas de quatro diferentes áreas do Brasil (BANKOVA et al., 1995) cada uma delas caracterizada por um tipo predominante de arvore e avaliadas em relação a composição química. A área denominada Br-1, era de um reflorestamento de Eucalyptus; a Br-2, de uma floresta nativa; a Br-3, de uma plantação de acaju e a Br-4, de uma plantação de laranja. As soluções foram obtidas a partir de processos extrativos em etanol e submetidas a cromatografia gasosa/espectrofotometria de massa. Foram encontradas, como características da própolis brasileira, baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos. Foram também observadas altas concentrações de ácido dihidrocinâmico, presença de acetofenonas preniladas e terpenóides, quase todos eles, sesquiterpenóides.

1.1.4 Funções na colméia

A função primária da própolis na colméia é de caráter biocida, atuando contra bactérias e outros microrganismos. Sugere-se que a própolis seja responsável pela baixa incidência de bactérias e terra dentro da colméia, em relação a atmosfera extrema. Os constituintes voláteis da própolis reduzem a aeroflora presente no apiário (GHISALBERTI, 1979).

A própolis assegura a manutenção das condições ambientais no interior da colméia, garantindo a sobrevivência do enxame, além de servir como material para o vedamento de orifícios. É usada para reparar e reforçar as finas bordas dos favos, para fechar fendas e buracos e para fazer com que a entrada da colméia seja resistente as intempéries, mantendo a temperatura estável (cerca de 00°C) e facilitando a defesa contra invasores. Promove manutenção do grau relativo de umidade dentro da colméia, necessário para o desenvolvimento das larvas (MOBUS, 1972), além de proteger as câmaras de cria evitando sua contaminação. Também possui ação sanitizante, sendo usada para “embalsamar” a carcaça de

invasores da colméia que as abelhas conseguiram matar, mas não conseguem transportar para fora. O invasor é coberto com própolis e cera e os remanescentes são deixados na parte inferior ou em uma das paredes da colméia (NICOLAS, 1947). Este recobrimento com própolis evita putrefação e odor característicos.

1.1.5 Processamento

A própolis é uma mistura de componentes, por isso é difícil o processo de extração ou fracionamento. A diversidade na composição da própolis representa problemas para se extrair precisamente seus princípios ativos e estabelecer veículos mais adequados para sua formulação, devido aos diferentes graus de solubilidade dos constituintes (WALKER; CRANE, 1987).

Segundo Debuyse (1983), alguns solventes, como éter, amoníaco, acetona, álcool etílico, tolueno e tricloroetileno permitem a solubilização da própolis. Proserpio (1981) caracteriza o etanol como um solvente parcial desta resina, e sugere associação com propilenoglicol. Soluções aquosas são obtidas através da fervura de própolis *in natura*, mas permitem menor liberação de princípios ativos comparativamente com o processo extativo em álcool.

O método usual para a extração da fração solúvel em álcool, permite a separação de uma "fração de cera" ou insolúvel em álcool. "Balsamo de própolis" refere-se a fração que pode ser extraída com álcool a 70% (GHISALBERTI, 1979). Este título etanólico é frequente nas formulações das soluções de própolis e permite a extração de compostos fenólicos de ação antimicrobiana, antiinflamatória e antioxidante (HAVSTEEN, 1983, GREENWAY et al., 1991).

A própolis, em seu estado bruto, é coletada por apicultores através da raspagem da superfície da colméia. O processamento da própolis, a partir de sua coleta, envolve primariamente, a avaliação do conteúdo em cera. Na observação de maior aspecto ceroso da própolis, a mesma deverá ser colocada sob processo de lavagem, a frio, em água, para a eliminação da cera extrínseca. O remanescente é então, colocado para secagem ao ar, sobre tela de aço inox. Caso não haja excesso aparente no conteúdo extrínseco de cera, a própolis poderá ser colocada diretamente, em álcool etílico a 95%. Por este método, a cera remanescente e

resquícios indesejáveis poderão ser removidos. A finalização do processo, envolve filtrações sucessivas (BURDOCK, 1998).

1.1.6 Vias de administração

A maior parte das preparações a base de própolis são disponíveis para uso tópico com indicação para aplicação em pele e mucosa. A administração oral permite a veiculação de extrato seco em cápsulas contendo aproximadamente 400mg de própolis por unidade (BURDOCK, 1998).

A maioria dos componentes individuais da própolis possuem várias ações terapêuticas, mas a completa insolubilidade da inistura (de compostos derivados de resinas de plantas), geralmente impede a administração parenteral da própolis e possivelmente a ação através dessa via eficaz. Com a descrição dos primeiros derivativos solúveis em água (DIMOV et al., 1991), isentos de cera, surgiu o interesse em se alcançar uma nova geração de drogas baseadas na própolis, com possibilidade de administração parenteral.

1.1.7 Toxicidade

Casos de dermatite de contato em indivíduos que usam própolis em aplicação externa e em apicultores que frequentemente entram em contato com a resina para coleta de mel e limpeza das colméias têm sido relatados. Esta propriedade indutiva tem sido relacionada a presença de ácido cafeico fenil-éster na composição da própolis (HAUSEN et al., 1987). Alguns pacientes apresentam reação alérgica a própolis, embora esta resina apresente altas concentrações de flavonóides, potentes antialérgicos. Acredita-se que isto se deva aos grãos de pólen presentes, o que pode ser contaminados pela hiperfiltração do extrato de própolis (HAVSTEEN et al., 1983).

1.1.8 Emprego terapéutico geral

A própolis é um dos produtos mais amplamente usados, durante milênios, na etnomedicina. Desde o século passado, muitos estudos tem sido desenvolvidos e a maior parte das publicações são do leste europeu.

Existe significativo relato na literatura sobre o emprego da própolis para tratamento de algumas doenças inflamatórias, causada por bactérias ou fungos (MARCUCCI, 1995). Em dermatologia, apresentam indicações e regeneração tecidual, tratamento de queimaduras, cicatrização de feridas, tratamento de neurodermatite, de acne, de úlceras de pele, psoríase, herpes simples e genital, pruridos, além de atuar sobre alguns dermatófitos. Produtos farmacêuticos e cosméticos apresentados em loções, cremes, pomadas, tabletes, sabonetes e soluções são formas usuais de comercialização. Em odontologia, a própolis foi inicialmente empregada para anestesia, pois se reconhecia um efeito 5 vezes maior da resina que aquele da cocaína. Veiculada atualmente sob forma de dentifrícios e colutórios, tem sido indicada em tratamento de gengivite, queilite e estomatite (BURDOCK, 1998). A própolis demonstra efetividade no tratamento de doenças do aparelho digestivo, evidenciando potente ação hematoprotetora e antiulcerosa (MARCUCCI, 1995).

À própolis têm sido atribuídas propriedades antissépticas, antimicrobianas, bacteriostáticas, antimicóticas, antivirais, antiparasitárias, antituberculosas, adstringentes, antipiréticas, antiinflamatórias, imunomoduladoras, antialérgicas, analgésicas, anestésicas, antioxidantes, citostáticas, epitelizantes, espasmolíticas, hipotensoras e anticolesterolêmicas (GHISALBERTI, 1979; KUJUMGIEV et al., 1993; AMOROS et al., 1994; MARCUCCI, 1995).

1.2 **Própolis — Atividade antimicrobiana**

A ação provavelmente mais estudada, em relação a própolis, é a antibacteriana em seus efeitos bactericida e bacteriostático. Os componentes frequentemente relacionados a esta propriedade são o ácido benzoico e seus derivados oxi e metoxibenzoicos, ácidos p-cumárico e cafeico, ácido ferúlico com ação sobre Gram-positivos (G+) e Gram-negativos

sesquiterpenos (principalmente o bisabolol) e os flavonóides pinocembrina e galangina (KUJUMGIEV et al., 1993).

A ação provavelmente mais estudada, em relação a própolis, é a antibacteriana em seus efeitos bactericida e bacteriostático. Os componentes frequentemente relacionados a esta propriedade são o ácido benzoico e seus derivados oxi e metoxibenzóicos, ácidos p- cumárico e cafeico, ácido ferúlico com ação sobre Gram-positivos (G+) e Gram-negativos sesquiterpenos (principalmente o bisabolol) e os flavonóides pinocembrina e galangina (KUJUMGIEV et al., 1993).

Grange e Davey (1990), observaram efeito inibitório preferencial em cocos e bacilos G+. Utilizaram no estudo, extrato de própolis coletada em Lion (França). Sob evaporação, 1 ml deste extrato produziu 60 mg de material resinoso sólido. O estudo foi feito usando diluição 1:20 do extrato etanólico de própolis em base ágar-sangue: 1 ml de própolis foi adicionado a 19 ml de meio a 45°C em placa de Petri. Posteriormente, houve inoculação de suspensões de bactérias nas placas. O método permitiu evaporação do etanol e na presença de quantidade residual, não houve inibição de crescimento bacteriano. A concentração inibitória mínima (CIM) da própolis foi estimada através de duplas diluições 1:20 em nutriente de crescimento e cada tubo inoculado com uma gota de suspensão bacteriana. Após 14 horas, porções de cada conteúdo dos tubos foi colocado em meio ágar, isento de própolis, para verificação do crescimento bacteriano. Na avaliação da CIM para *Micobacterium tuberculosis*, foi removido todo o conteúdo de etanol, devido à sensibilidade do bacilo. Os resultados evidenciaram que em diluição 1:20 (3mg de material sólido/ml) em ágar houve inibição completa de *Staphylococcus aureus* (incluindo MRSA), *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus* spp., *Branhamella catarrhalis*, *Corynebacterium* sp., *Bacillus cereus*, parcial de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e inefetividade relacionada a *Klebsiella pneumoniae*. As diluições inibitórias para *Bacillus cereus* e cocos G+ for de 1:160 a 1:320 e para extratos de *Micobacterium tuberculosis*, a inibição total for sob diluição de 1:320 e parcial 1:640.

Alguns autores sugerem que a alta atividade antibacteriana da própolis seja derivada parcialmente, de algum sinergismo. Testando esta hipótese, Kujumgiev et al (1999) avaliaram atividade antibacteriana de combinações de própolis com seus principais componentes, bem como associações entre alguns destes compostos. Sinergismo, mas de pouca intensidade, foi observado somente entre própolis e benzil cafeato, própolis e isopentil cafeato e entre pinocembrina e benzil cafeato. Grange e Davey (1990), nos estudos com *Staphylococcus aureus*, observaram sinergismo entre própolis e extrato etanólico de *Aralia racemosa*, outra

planta com atividade anti-estafilocócica. Krol et al., (1993), também avaliando a ação da própolis sobre *Staphylococcus aureus*, observaram efeito sinérgico significativo entre a própolis e certos antibióticos como a estreptomicina a cloxaciclina, além de um efeito moderado em associa a penicilina G, doxiciclina cloranfenicol e polimixina B.

Takaisi-Kikuni e Shilcher (1994) através de estudos microcalorimétricos e em microscopia eletrônica, elucidaram o mecanismo de ação antimicrobiana da própolis em culturas de *Streptococcus agalactie*. O tratamento de células em crescimento deste microrganismo com extrato etanólico de própolis (25% V/V de etanol) levou ao bloqueio da divisão celular pela permanência da união entre as células-filhas, inibindo assim, a mitose bacteriana e resultando na formação de estreptococos pseudo-multicelulares. Além disso, levou a redução ou inibição da atividade metabólica bacteriana por desorganização do conteúdo e da membrana citoplasmática e da parede celular causando, às vezes, bacteriólise parcial. Análises de proteínas em células tratadas com própolis indicaram que esta substância inibiu a síntese e a secreção de proteínas bacterianas. O tratamento de *Streptococcus agalactie*, com extrato etanólico de própolis, não levou a formação de paredes celulares tinas sugerindo que o mecanismo de ação diverge daquele relacionado às tetraciclinas, cloranfenicol e macrolídeos. Desta forma, pela complexidade atribuída a ação da própolis, seu mecanismo não pode ser relacionado ao de outros antibióticos clássicos. Ikeno, Ikeno e Myazawa (1991) verificaram, *in vitro*, atividade antimicrobiana da própolis contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus cricetus* além da inibição da síntese de glucano insolúvel em água e da atividade da glicosiltransferase. Neste estudo, utilizaram própolis de 3 diferentes áreas: 2 da China (Liaoning-Sheng e Jiangsu - Sheng) e a terceira, do Japão (Koriyama). Os extratos foram inicialmente preparados com 5 volumes de etanol (99,5%) e depois filtrados. Cada um dos filtrados foi diluído em etanol até atingirem o mesmo grau de absorbância de 290nm. Também investigaram o desenvolvimento de caries dentarias em ratos inoculados com *Streptococcus sobrinus*, resistente à estreptomicina e sob dieta criogênica. Os animais foram divididos em 5 grupos: aos do grupo 1 (controle) foram dados água contendo 1% de etanol; aos do grupo 2, água, contendo 1% de extrato etanólico de própolis com concentração final da resina 1 mg/ml; os do grupo 3 foram inoculados com *S. sobrinus* e foi fornecido água contendo somente etanol; aos do grupo 4 foi dado água contendo própolis ao mesmo tempo em que foi feita inoculação com *S. sobrinus*; ao grupo 5 foi dado água contendo própolis após inoculação com *S. sobrinus*. A mesma concentração de própolis do grupo 2 foi usada nos grupos 4 e 5. Nos resultados do estudo *in vivo*, os ratos inoculados com *S. sobrinus* no grupo

3, apresentaram metade das fissuras cariadas, enquanto que houve significativamente menos cáries nos grupos 4 e 5. As cáries dentárias nos grupos 4 e 5 foram inibidas 56,2 e 62,2%, respectivamente, comparados ao grupo 3. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre ratos aos quais foi dado própolis ao mesmo tempo (grupo 4) ou após inoculação com *S. sobrinus* (grupo 5). Nenhum efeito tóxico da própolis sobre o crescimento dos ratos foi observado sob condições experimentais neste estudo. Os resultados sugeriram assim, que a própolis pode controlar cárie dentária em um sistema de modelo em ratos. Analisando a composição da própolis de Liaoning-Sheng, Ikeno, Ikeno e Myazawa (1991) identificaram atividade antimicrobiana do ácido cinâmico e do ácido cafeico contra *S. mutans* e *S. cricetus*. Ácido cinâmico também inibiu atividade de glicosiltransferases. Concluíram assim, que ácido cinâmico pode ser o componente ativo na própolis em termos de proteção contra cáries dentárias em ratos. Steinberg et al 1996 testaram *in vitro* e *in vivo*, ação de extrato etanólico de própolis (20% de própolis em título etanólico de 60GL) sobre *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*. *In vitro*, foram preparadas diluições seriadas de própolis em meio caldo *Trypticase Soy Proth* (TSB) com concentrações finais de 0,8%, 0,4%, 0,2%, 0,02% e 0,002. Em cada tubo teste foram adicionados 0,6ml de inóculo bacteriano. Como a própolis interage com o caldo do meio bacteriano, a atividade antibacteriana foi mensurada usando-se o método da placa de ágar. Diluições seriadas foram preparadas a partir de cada diluição da própolis e alíquotas de 0,05 ml destas foram semeadas nas placas de ágar contendo TSB e mantidas em incubação por 24 horas. Nos resultados *in vitro*, na diluição 0,002% de própolis, o efeito não foi significativo sobre *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*. Em concentrações superiores a esta, houve diminuição no crescimento bacteriano e a 0,4 foi observado efeito inibitório completo. Para o estudo clínico, foram recrutados 10 indivíduos. Inicialmente foram coletados 2 a 3ml de saliva de cada um deles, matinalmente (9-10 horas). No período experimental os insumos foram orientados a escovar os dentes sem usar dentifrícios e a não comer ou beber. Cada um dos voluntários recebeu 10 ml de solução de própolis diluída a 0,2% com solução salina estéril e bochecharam por 1,5 minuto. Amostras de saliva foram coletadas 10 minutos e 60 minutos após a aplicação. As mesmas foram mantidas a 4°C e manipuladas no mesmo dia. Os resultados evidenciaram, 10 minutos após a aplicação da própolis, 38% e 42% de redução média na contagem bacteriana de *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*, respectivamente ($P < 0,05$). Uma hora após a aplicação, a redução na contagem bacteriana foi mantida ($P < 0,05$), embora um leve aumento quantitativo de *S. mutans* tenha sido detectado. Os autores sugeriram que a redução nas contagens de

Streptococcus sobrinus e *Streptococcus mutans* também seja resultado do aumento do fluxo salivar induzido pelo bochecho com este produto. Gebara e Zardetto (1996) avaliaram a atividade antimicrobiana de diversas tinturas a base de produtos naturais. entre elas a própolis, sobre *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans*. Na avaliação da concentração mínima inibitória, a solução de própolis inibiu *S. mutans* e *S. sobrinus* nas diluições 0,04 mg/ml e 0,02 mg/ml. respectivamente. A capacidade de inibição da síntese de glucanos, representada pela aderência ao vidro, foi avaliada pela concentração inibitória mínima de aderência (CIMA) correspondendo a 0,01 mg/ml para ambos os microrganismos. Os resultados sugerem possibilidade de emprego deste agente no controle de *S. mutans* e *S. sobrinus* presentes placa dentária. O estudo de Park et al (1998) observou efeito inibitório de extratos etanólicos de própolis (2g de extrato seco em 25 ml de etanol a 80%) sobre, *S. mutans* e sobre a atividade da glicosiltransferase. No estudo, as amostras de própolis foram coletadas de diferentes estados brasileiros: Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS), Paraná (PA) e Rio Grande do Sul (RS) sendo que o maior efeito inibitório bacteriano se relacionou a uma amostra da região sul (RS). Resultados da análise qualitativa da própolis, evidenciou diferenças no conteúdo flavonóide, com maiores teores de pinocembrina e galangina na própolis originária do RS.

Zarate-Pereira (1999), comparou a atividade antimicrobiana de fluoreto de sódio a 0,05%, fluoreto de sódio a 0,2% e própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% sobre *Streptococcus mutans*. No estudo foi utilizado extrato etanólico de própolis a 70% e a determinação da concentração inibitória mínima sobre *S. mutans* foi determinada *in vitro*. Aliquotas de 0,1ml de cultura de *S. mutans* em caldo *Trypticase Soy Broth* (TSB) foram inoculadas em tubos de ensaio contendo própolis nas concentrações 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5,0% e 10% também em caldo TSB. A concentração bactericida mínima de 2,5% foi posteriormente determinada em meio ágar triptone soja. O autor conduziu o estudo preparando uma solução de própolis com concentração de 5%, devido a condições inerentes ao meio bucal. Foram selecionadas para a avaliação antimicrobiana, 46 crianças com idades de 6 a 10 anos, carie-ativas, com níveis de *S. mutans* variando de 10^5 a 10^6 UFC/ml de saliva. Os pacientes foram divididos em 3 grupos e receberam os colutórios teste aleatoriamente, sendo orientados a fazerem bochechos diários por 15 dias. Após 24 horas, 7 de 15 dias, foram realizadas novas coletas de saliva e contagens de *S. mutans*. Concluiu-se que própolis a 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% apresentou maior atividade antibacteriana contra *S. mutans*, em comparação às outras soluções avaliadas.

Os efeitos de uma solução hidroalcolica de própolis de origem cubana, a 1,5% foram discutidos por Silveira et al. (1988). Vinte estudantes do sexo feminino, de 16 anos de idade, com quadros de gengivite crônica, participaram do experimento. No *baseline* foram avaliados os índices de análise de higiene bucal de Love e gengival de Loe e não foram dadas instruções de higiene bucal. As voluntárias foram divididas em 2 grupos: teste (receberam solução hidroalcolica de própolis) e controle (receberiam placebo) e se submeteram a um bochecho diário, supervisionado, com duração de 3 minutos, durante 15 dias. Ao final deste período, nova mensuração dos índices foi realizada. Em ambos os grupos se observou redução no nível de placa acumulada e no grupo teste a melhoria do estado gengival em relação ao grupo controle. Os autores sugeriram o uso da solução hidroalcolica a 1,5% como colutório para uso diário na manutenção de saúde gengival.

Opperman (1996) objetivou a avaliação do efeito inibitório de placa bacteriana supra gengival 24 horas após a aplicação das soluções de própolis a 30% em título etanólico de 70°GL (solução 1), e de etanol a 70% (solução 2) em relação ao controle (nenhuma solução foi aplicada). Participaram do estudo, 20 acadêmicos do curso de Odontologia que se submeteram a aplicação de cada uma das soluções e avaliação do Índice de Placa (de acordo com Silness e Loe; Loe) a intervalos semanais. De acordo com os resultados, houve redução significativa na formação de placa supragengival, tanto nas faces livres, quanto nas proximais, 24 horas após a aplicação da solução 1 em relação a solução 2 e ao controle.

Murray, Worthington e Blinkhorn (1997) avaliaram o efeito de um colutório a base de própolis em extrato etanólico a 10% associado a polioxiésteres, óleo de rícino hidrogenado, sódio nipasept e água, na formação *de novo* de placa bacteriana. O estudo foi duplo-cego, paralelo de três grupos e envolveu 42 pacientes. Três colutórios foram comparados: o teste, contendo o ingrediente ativo própolis; o placebo, contendo a mesma composição do teste, embora sem a resina e o controle positivo, a base de clorexidina. Três semanas e uma semana antes do início do estudo, todos os pacientes foram submetidos a raspagem e polimento dentários. No *baseline* foram avaliados os índices de placa (de acordo com Silness e Loe, Loe). Procedimentos de profilaxia dentária foram realizados e a partir daí os pacientes, divididos em grupos, foram orientados a usar o colutório, fornecido aleatoriamente, 2 vezes ao dia, em bochechos de 1 minuto e a absterem-se dos cuidados de controle doméstico de placa por 5 dias. Após este período, os *scores* de placa foram reavaliados e os autores verificaram que a clorexidina foi significativamente melhor no efeito inibitório de placa.

Houve uma redução de 14% no índice de placa do colutório teste para o placebo, mas não foi estatisticamente significativa ($p=0.19$).

O estudo de Duarte e Kfoury (1999), avaliou o efeito de 3 bochechos diários, cada um deles de um minuto, com 20ml de suspensão hidroalcoólica de própolis a 0,84%. durante 10 dias. No *baseline* foram avaliados os índices gengivais (proposto por Loe e Silness e modificado por Loe) e de placa (preconizado por Quigley; Hein). Os 17 pacientes do estudo foram então submetidos a controle profissional de placa supra gengival e orientados para retomo após 10 dias, sem qualquer tipo de orientação sobre procedimentos de higiene bucal. Após este período foram novamente avaliados os índices gengival e de placa, realizados os procedimentos de profilaxia e os pacientes foram orientados a fazerem os bochechos com a solução de própolis. Nova mensuração do controle de placa foi realizada após 10 dias e estaticamente não se observou diferença nos índices avaliados nos 3 períodos. Os autores concluíram que não houve modificação significativa no mecanismo de formação de placa bacteriana e nos sinais clínicos de gengivite.

Santos et al. (1997), avaliaram a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis sobre 30 amostras de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e bactérias do gênero *Fusobacterium* por método de diluição (V/V%) em ágar. Foram testados 4 espécimes de própolis comerciais e 4 de própolis *in natura* coletadas em apiário experimental localizado no município de Cachoeira da Prata-MG. As amostras de própolis *in natura* foram analisadas quanto as características físico-químicas e a origem botânica. Os resultados para o *A. actinomycetemcomitans* revelaram sensibilidade a concentrações de 0,1% a 0,25%, e ausência de crescimento a 0,5%. A maior parte das amostras de *Fusobacterium spp.* foi inibida a concentrações de 0,05% a 0,1% e nenhuma cresceu a 0,25%.

2 PROPOSIÇÃO

Objetivou-se, neste estudo, avaliar a atividade antimicrobiana de três soluções de própolis obtidas a partir de processo extrativo em álcool, de origens distintas (amostras Nova Era, Paraná Green e Super Green), sobre microrganismos que reconhecidamente apresentam elevado grau de resistência a substâncias com propriedades antimicrobianas/anti-sépticas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e sobre dois periodontopatógenos: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29522) e *Porphyromas gingivalis* (ATCC 3327).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções extrativas de própolis testadas

Foram utilizadas tres soluções extrativas de própolis a 50% (Figura 1). Uma delas, comercializada, foi adquirida através do laboratório Nova Era Homeopatia, RJ (amostra A). Era rotulada como "extrato de própolis em solução alcoólica 90°GL". A origem geográfica, dados técnicos sobre características da própolis *in natura* utilizada para obtenção da solução e o tipo de processo extrativo em álcool, não foram relatados. As duas outras amostras foram de própolis, *in natura*, gentilmente cedidas pela Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda. (CONAP), de Belo Horizonte, MG (Figura 2). A partir destas amostras, foram preparadas soluções extrativas de própolis a 50% em título etanólico de 70°GL.

3.1.1 Preparo das soluções a partir da própolis *in natura*

3.1.1.1 Análise técnica da própolis *in natura*

As amostras foram selecionadas por macroregiões de coleta: a própolis denominada Super-Green era procedente da região sudeste, enquanto que a Paraná-Green da região sul do Brasil. As amostras foram previamente analisadas pelo órgão emissor. Em relação a caracteres organolépticos, ambas apresentaram aspecto de fragmentos heterogêneos, de colorção verde escura, sabor forte e amargo, possuindo odor resinoso característico. Possuíam, ainda, consistência viscosa sob temperaturas de 20°C a 40°C e endurecida a temperaturas inferiores a 20°C. Através de cromatografia de camada delgada for determinada a ausência dos antimicrobianos: tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetraciclina e sulfas.

3.1.1.2 Processo extrativo da própolis *in natura*

As soluções extrativas de própolis a 50%, em álcool etílico a 70%, foram manipuladas por "Genese - Homeopatia e Preparações Farmacêuticas", Niterói, RJ.

Obteve-se 500ml das soluções extrativas a partir de 250g de própolis *in natura* usando como líquido extrator etanol a 70° GL. A técnica empregada foi de maceração prévia por 48 horas na proporção de 350ml (7, partes) de álcool a 96° GL. Após este período, o material foi triturado e foram acrescentados a proporção 150ml (3 partes) de água destilada para a obtenção do título etanólico de 70° GL. O produto foi mantido em maceração em local fresco e seco com ausência total de luz, durante 28 dias e submetido a duas agitações vigorosas diárias durante 5 minutos. Após esse período, foram realizadas duas filtrações sucessivas e a solução extrativa final obtida de cada amostra foi acondicionada em frasco de vidro de cor âmbar, bem fechado e armazenado em local fresco.

3.1.2 Análise cromatográfica das soluções de própolis

As três soluções utilizadas no estudo foram submetidas a cromatografia em camada delgada, realizada na Fundação Bio-Rio, Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ). Setor de Fitoterápicos.

Para cada uma das análises, foi utilizada uma cromatoplaça de alumínio de 20/20cm com adsorvente sílica-gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany). Na placa foram feitas 4 demarcações de 1 cm de largura no sentido horizontal para aplicação das bandas-padrão e banda-teste, com equidistância de 2cm. Posteriormente, a placa foi ativada em estufa a 105°C por 10 minutos. Foram então aplicados 10µ das bandas dos flavonóides quercetina e crisina a 0,005% em etanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), da solução alcoólica de própolis referendada como padrão e da solução-teste.

A cuba cromatográfica (Pyrex, USA) foi saturada através do embebedimento de papéis de filtro colocados no interior das paredes internas com o eluente utilizado como fase móvel: tolueno + acetato de etila + ácido fórmico (80:20:10). Posteriormente o fundo da cuba foi preenchido com o eluente, em cerca de 10cm de altura.

Para a corrida cromatográfica, a placa foi colocada na cuba em posição vertical, com os pontos de aplicação das bandas acima do nível do eluente (Figura 1). Após o desenvolvimento do cromatograma, a placa foi removida da cuba e exposta ao ar para secagem. A leitura cromatográfica foi realizada sob luz UV 254 nm (*Spectroline-Long Life Filter*, USA).

Todas as amostras de testadas obedeceram aos critérios exigidos pela análise cromatográfica em camada delgada, apresentando os flavonóides pré-qualificados quercetina (Rf 0,15), pinocembrina (Rf 0,30), crisina (Rf 0,37) , galangina (Rf 0,41) e tectocrisina (Rf 0,49) e foram certificadas como soluções de própolis (Figuras 4, 5 e 6).

3.2 Cepas bacterianas e condições de cultivo

Todas as cepas bacterianas utilizadas nos experimentos foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) Rockville, MD, USA e mantidas sob congelamento a -70°C em solução de leite desnatado a 10% (*Skim Milk Difco Laboratories*, Detroit, MI, USA), contendo 5% de glicerol. Foram selecionados os seguintes anaeróbios facultativos: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Todos foram mantidos em placas de Petri contendo meio ágar Müeller-Hinton (Difco) e incubadas em estufa microbiológica a 36°C por 48 h. Apesar de ser um microrganismo aeróbio estrito, a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) for cultivada nas mesmas condições dos microrganismos anaeróbios facultativos. Foram utilizadas as cepas dos microrganismos periodontopatogênicos' *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ATCC 29522). As cepas foram cultivadas em ágar sangue suplementado (*base Trypticase Soy Broth*, Difco), contendo 0,5% de extrato de levedura (Difco), 10 mg/ml de hemina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e 0,1mg/ml de vitamina K1 (naphthoquinone, Sigma). Após a semeadura, as placas foram mantidas em jarras de anaerobiose (Oxoid, London UK) contendo como gerador de anaerobiose, o sistema Anaerobac (Probac, Sao Paulo, SP, Brasil). As jarras contendo as placas e os geradores foram incubadas a 36°C durante 5 dias. Apesar de ser considerado um microrganismo anaeróbio facultativo, o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foi cultivado em condições de anaerobiose estrita, como a *Porphyromonas gingivalis*. A pureza

das amostras era conferida através da observação da morfologia colonial e através da coloração de Gram.

3.3 Preparo do inóculo

As amostras de microrganismos aeróbio estrito e anaeróbios facultativos foram cultivadas em ágar Müeller-Hinton (Difco) durante 24h a 36°C, e diluídos no meio líquido caldo Müeller-Hinton, não inoculado, até a obtenção de uma turvação similar ao tubo número 1 da escala nefelométrica de McFarland. Tal suspensão corresponde a um valor entre 5×10^8 e 1×10^9 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml).

As amostras de *Porphyromonas gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans* foram cultivadas em ágar sangue suplementado e após o crescimento, as células foram removidas cuidadosamente com o auxílio de swabs estéreis e transferidos para meio líquido *Trypticase Soy Broth* (TSB, Difco), até a obtenção de uma suspensão bacteriana correspondente ao tubo 1 da escala de McFarland.

As suspensões assim obtidas foram utilizadas para a realização do teste de sensibilidade à própolis por difusão em ágar e para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das soluções de própolis testadas.

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.4.1 Teste de difusão em ágar

A avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de difusão em ágar foi realizada de acordo com Park et al. (1997). Foram utilizados discos de papel de 7mm de diâmetro (Sensifar Ltda), apropriados para antibiograma. Os discos de papel foram depositados em placas de Petri estéreis e impregnados separadamente com 10µl de cada solução de própolis. Como controles, foram utilizados 10µl do solventes álcool etílico a 70% e 90%.

Para a realização do teste com os microrganismos anaeróbios facultativos e os inóculos foram semeados em confluência na superfície de placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton, com o auxílio de swabbs estéreis. As placas foram incubadas a 36°C por 48 horas. Para a *Porphyromonas gingivalis* e para o *A. actinomycescomitans*, o mesmo procedimento anterior foi adotado, apenas substituindo-se o ágar Müller-Hinton pelo ágar sangue suplementado. A seguir, as placas foram incubadas em atmosfera de anaerobiose, a 36°C por 5 dias.

Os halos de inibição de crescimento, gerados em torno de cada disco, foram medidos com o auxílio de urna régua sob luz adequada.

3.4.2 Concentração Inibitória Mínima

Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) das soluções de própolis foi determinada seguindo-se o mesmo protocolo utilizado para os agentes antimicrobianos. As soluções de própolis foram, ou não, diluídas em álcool 70% (amostras B e C) e em álcool 90% (amostra A), na proporção $\log^2 x$ (ou seja: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128) e incorporadas aos meios de cultura em diluição 1:20. A concentração final das diferentes soluções de própolis nos meios de cultura foram então: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560. O meio utilizado na avaliação da CIM para os anaeróbios facultativos e para a *P. aeruginosa* foi o ágar Müller-Hinton. A avaliação da CIM para a *Porphyromonas gingivalis* e para o *A. actinomycescomitans*, foi realizada em meio ágar sangue suplementado.

Os meios sólidos foram preparados em tubos e aquecidos até a liquefação do ágar. A seguir, os meios foram resfriados em banho maria e mantidos a temperatura de 48°C. No caso do ágar sangue suplementado, a base TSB contendo 0,5% de extrato de levedura foi liquefeita e então adicionada de sangue desfibrinado de carneiro, menadiona e da solução de própolis (diluída ou não). No caso do ágar Müller-Hinton, após permanecer a 48°C, cada tubo recebeu apenas a solução de própolis (diluída ou não). Após a homogeneização dos tubos contendo o ágar, as misturas foram vertidas para placas de Petri estéreis.

Quatro microlitros de cada inóculo bacteriano foram semeados na superfície do meio de cultura e incubados em atmosfera adequada a 37°C por um período mínimo de 48 horas.

A *Porphyromonas gengivalis* foi incubada por cinco dias para que fosse possível observar-se a pigmentação negra característica, o que confirmava a pureza do inóculo bacteriano.



Figura 1: Soluções extrativas de própolis e solventes etanólico a 90 GL.
Fonte: Própria autora.



Figura 2: Própolis Super-Green e Paraná-Green in natura
Fonte: Própria autora.



Figura 3: Cuba e placa cromatográficas.
Fonte: Própria autora.

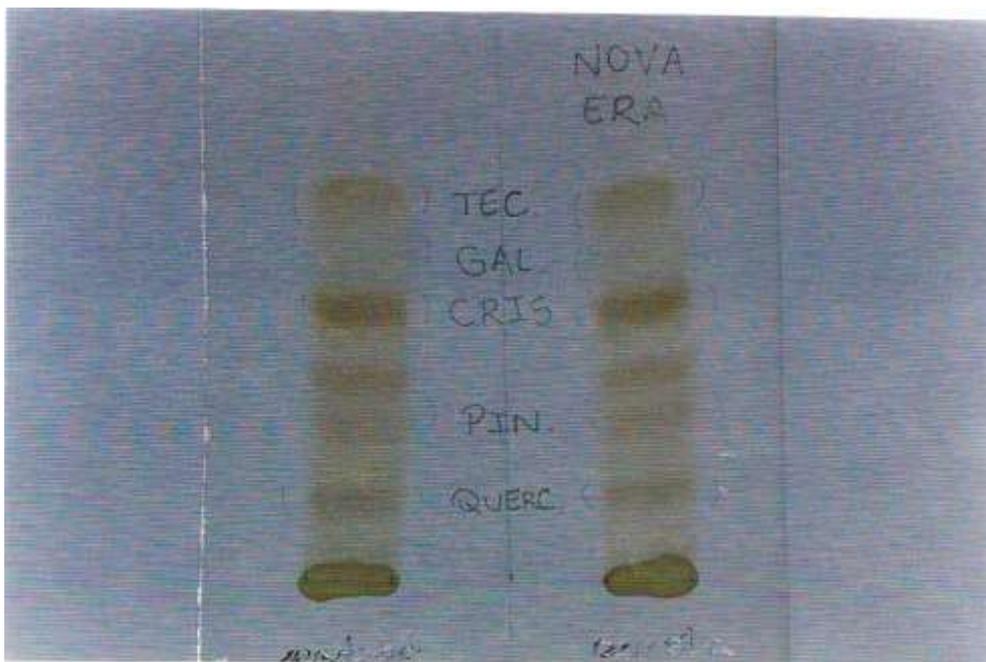


Figura 4: Leitura cromatográfica da solução extrativa Nova Era (on amostra A.).
Fonte: Própria autora.

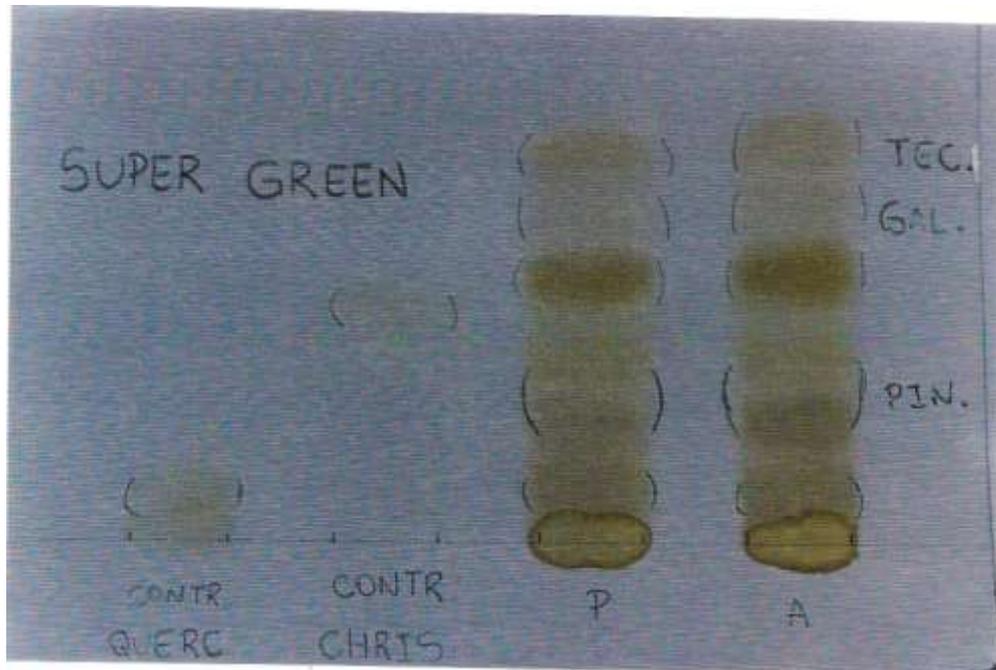


Figura 5: Leitura cromatográfica da solução extrativa Super-Green (ou amostra B)
 Fonte: Própria autora.



Figura 6: Leitura cromatográfica da solução extrativa Paraná-Green (on amostra ^).
 Fonte: Própria autora.

4 RESULTADOS

Suscetibilidades de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* a soluções de própolis obtidas a partir de processo extrativo e ao solvente das amostras foram testadas e os resultados são apresentados na Tabela 1. Os resultados da difusão em ágar mostraram resistência microbiana de *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* as 3 amostras de própolis e ao solvente. O crescimento de *S. aureus* foi inibido e os halos evidenciados foram de 9mm para amostras A e B e de 8mm para a C (Figura 7). Esta cepa bacteriana apresentou resistência ao solvente.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de soluções de própolis em *Staphylococcus aureus*.

<u>DIFUSÃO EM ÁGAR</u>					
<u>SOLUC, OES DE PP / MICRORGANISMOS (ATCC)</u>	<u>A*</u>	<u>B**</u>	<u>C***</u>	<u>S1****</u>	<u>S2*****</u>
<i>S. aureus</i> (25923)	9mm	9mm	8mm	R	R
<i>E. coli</i> (25922)	R	R	R	R	R
<i>E. faecalis</i> (29212)	R	R	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i> (27853)	R	R	R	R	R

* amostra A	Nova Era
** amostra B	Super Green
*** amostra C	Paraná Green
**** SOLVENTE 1	Álcool 90% em diluição 1:20
*****SOLVEN BE 2	Álcool 70% em diluição 1:20
PP	Própolis
R	Resistente

A atividade inibitória das soluções de própolis sobre *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* é apresentada na Tabela 2. Os resultados evidenciaram que a concentração inibitória mínima das amostras de própolis A e B para *S. aureus* foi de 1:160, enquanto para a amostra C foi de 1:80. *E. faecalis* foi inibida em concentrações 1:80, 1:40 e 1:20 das soluções A, B e C, respectivamente. *P. aeruginosa* e *E. coli* apresentaram resistência as amostras. Todas as cepas testadas foram resistentes ao solvente. A Figura 8 evidencia os spots bacterianos dos microrganismos testados.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana de soluções de própolis em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*: Concentração Inibitória Mínima

CIM					
SOLUÇÕES DE PP / MICRORGANISMOS (ATCC)		B**	C***	S1****	S2 *****
<i>S. aureus</i> (25923)	1:160	1:160	1:80	R	R
<i>E. coli</i> (25922)	R	R	R	R	R
<i>E. faecalis</i> (29212)	1:180	1:40	1:20	R	R
<i>P. aeruginosa</i> (27853)	R	R	R	R	R

* amostra A	Nova Era
** amostra B	Super Green
*** amostra C	Paraná Green
**** SOLVENTE 1	Álcool 90% em diluição 1:20
*****SOLVEN BE 2	Álcool 70% em diluição 1:20
PP	Resistente
R	

Os antibiogramas relativos aos periodontógenos cultivados foram avaliados e os resultados são apresentados na Tabela 3. *Porphyromonas gingivalis* for inibido pelas três soluções de própolis e os halos evidenciados foram de 25mm para a amostra A e de 27 mm para a B e também para a C (Figura 9). Inibição de crescimento de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* obteve como resultado halos de 12mm, 11mm e 10mm para as amostras A, B e C, respectivamente. Ambos os microrganismos foram resistentes ao solvente.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana de soluções de própolis em *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*: Difusão em Ágar

DIFUSÃO EM ÁGAR						
SOLUÇÕES DE PP / MICRORGANISMOS (ATCC)	A*	B**	C***	S1****	S2*****	
<i>P. gingivalis</i> (33277)	25 mm	27 mm	27 mm	R	R	
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (29522)	12 mm	11 mm	10 mm	R	R	

* amostra A	Nova Era
** amostra B	Super Green
*** amostra C	Paraná Green
**** SOLVENTE 1	Álcool 90% em diluição 1:20
*****SOLVEN BE 2	Álcool 70% em diluição 1:20
PP	Própolis
R	Resistente

Resultados pertinentes a concentração inibitória das soluções teste de própolis sobre periodontopatógenos são apresentados na Tabela 4. Evidenciam diluição máxima de 1:640 para a amostra A e de 1:1280 para a B e a C na inibição de *P. gingivalis*. Culturas de *A. actinomycetemcomitans* foram inibidas em concentrações mínimas de 1 :40 para amostra B e de 1:80 para as amostras A e C. As bactérias testadas apresentaram resistência ao solvente. As Figuras 10 e 11 evidenciam os *spots* bacterianos do *A. actinomycetemcomitans* e *P. gengivalis* respectivamente.

Tabela 4: Atividade antimicrobiana de soluções de própolis em *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gengivalis*.

SOLUÇÕES DE PP / MICRORGANISMOS (ATCC)	CIM					
	A*	B**	C***	S1****	S2*****	
<i>P. gingivalis</i> (33277)	1:640	1:1280	1: 1280	R	R	
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (29522)	1:80	1:40	1.80	R	R	

* amostra A	Nova Era
** amostra B	Super Green
*** amostra C	Paraná Green
**** SOLVENTE 1	Álcool 90% em diluição 1:20
*****SOLVEN BE 2	Álcool 70% em diluição 1:20
PP	Própolis
R	Resistente

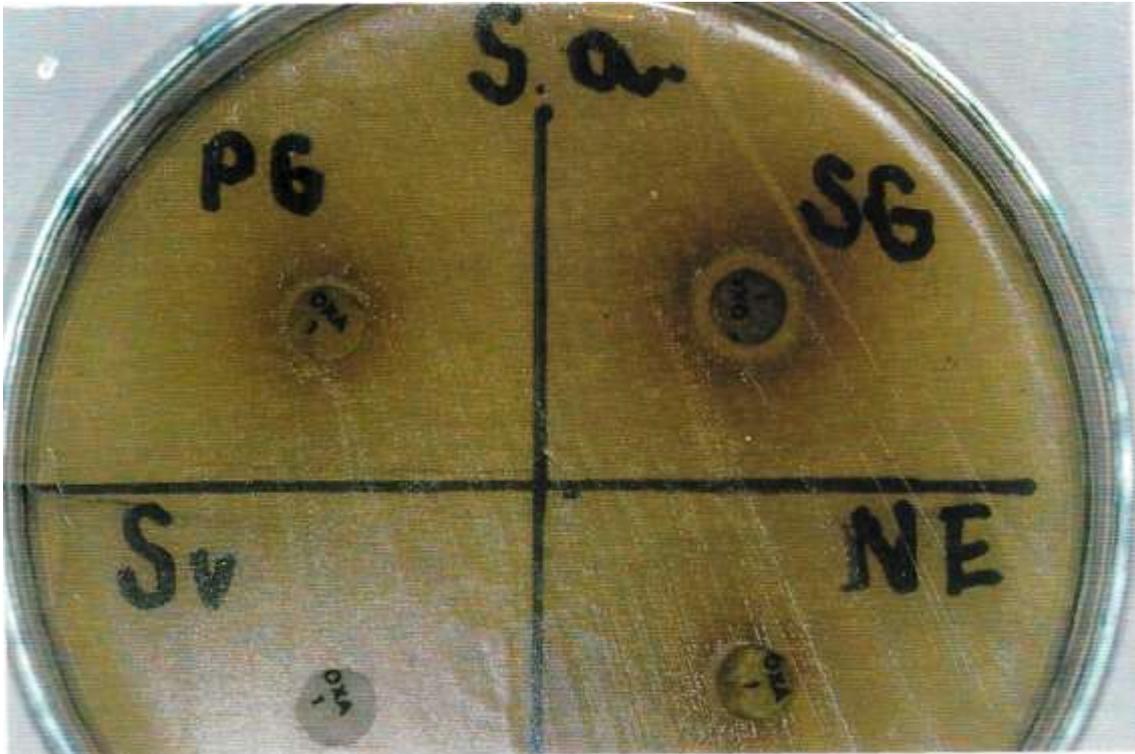


Figura 7: Halo de inibição gerado pelas amostras A, B e C sobre *Staphylococcus aureus*. Evidenciação de resistência microbiana ao solvente etanólico a 70 GI. Teste de difusão em ágar.

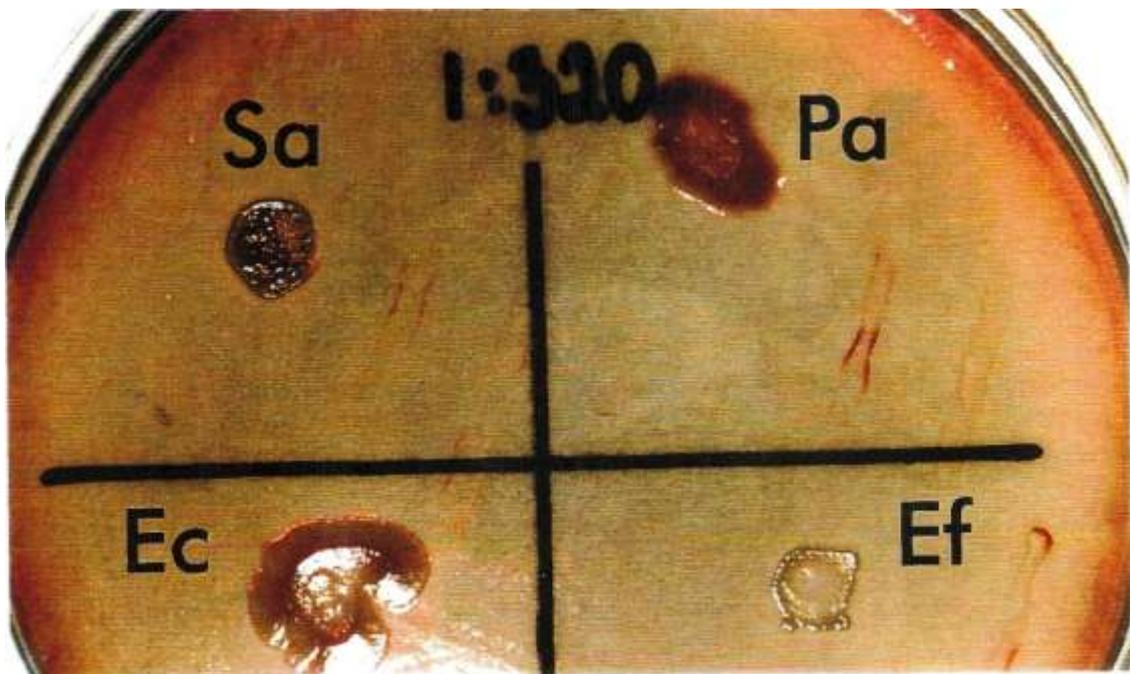


Figura 8: Spots bacterianos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* evidenciados em avaliação de Concentração Mínima Inibitória.



Figura 9: Halo de inibição gerado pelas amostras A, B e C sobre *Porphyrromonas gingivalis*. Evidenciação de resistência microbiana ao solvente etanólico a 70'GL Teste de difusão em ágar.



Figura 10: "Spots" bacteriano de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* evidenciado em avaliação de Concentração Mínima Inibitória.



Figura 11: “Spots” bacteriano de *Porphyromonas gingivalis*, evidenciado em avaliação de Concentração Mínima Inibitória.

5 DISCUSSÃO

Registros relacionados ao uso empírico da própolis datam da pré-história, passam pela civilização egípcia, são citados pelo grego Aristóteles (384-322 aC), e se estendem progressivamente até nossos dias. As atribuições de propriedades terapêuticas a própolis fazem parte da cultura popular.

Somente no século passado esta resina, produzida por abelhas, passou a ser alvo de pesquisas. A primeira investigação sistemática das propriedades antimicrobianas da própolis foi realizada por Kivalkina, em 1948, com a detecção de atividade bacteriostática da própolis sobre *Staphylococcus aureus*, bacilo tifóide e outros patógenos (GHISALBERTI, 1979). O primeiro medicamento elaborado a base de própolis foi produzido na URSS em 1969, o Propoli-3, para uso extemo. Hoje os estudos se direcionam a determinação dos princípios ativos e às múltiplas propriedades terapêuticas, passando pela cosmetologia e indústria de conservantes (MARCUCCI, 1995).

Na odontologia, esta resina também ainda é usada com empirismo por profissionais e pacientes que frequentemente relatam aceleração de processos cicatriciais após seu emprego no ambiente bucal. Vários estudos tem sido realizados, principalmente na Europa, onde as propriedades dos produtos apícolas são reconhecidas e divulgadas. O Brasil tem produzido alguns trabalhos sobre aplicação da própolis em Odontologia, mas ainda não existe divulgação suficiente do reconhecimento científico da resina. Estudos comprovaram atividade antimicrobiana da própolis sobre *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (GEBARA, ZARDETTO, 1996; ZARATE-PEREIRA, 1999) e *Candida* ssp (AZEVEDO et al., 1999); mostraram efetividade na aceleração do reparo de feridas cirúrgicas (MAGRO FILHO, 1988) e no tratamento de úlceras aftosas recorrentes (LOTUFO; BIRMAN, 1998); avaliaram efeitos na mumificação pulpar (MATOS, 1989), no reparo de dentina em exposição da polpa (BRETZ et al., 1998) e na microflora anaeróbica relacionada a lesões endodônticas (FERREIRA; VALENTE, 1999), além de testarem formulações de própolis veiculadas em colutórios para controle de placa bacteriana (OPPERMANN, 1996; DUARTE e KFOURI, 1999) e em dentifício (PANZERI et al., 1999).

O presente estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis. Como são muitas as variáveis que resultam nas diferenças da composição e conseqüentemente, nas propriedades da resina, foram então estabelecidos dois padrões para as

amostras: (1) obtenção a partir de processo extrativo em álcool e (2) presença de conteúdo básico de flavonóides.

Extratos etanólicos de própolis exibem ações antibacterianas, antivirais, antifúngicas, anestésicas, antiinflamatórias, imunomoduladoras, hipotensivas e citostáticas (GHISALBERTI, 1979, BANKOVA et al., 1995). As formulações mais conhecidamente veiculadas no comércio são "tintura de própolis a 20%" e "extrato de própolis a 50%". No presente estudo, a escolha recaiu sobre a formulação a 50% pela possibilidade de se ter maior concentração de princípios ativos.

As amostras testadas corresponderam a (1) solução de própolis comercializada como "extrato etanólico de própolis a 50%" cedida pela Farmácia Nova Era. A sua origem geográfica, dados técnicos sobre características da própolis *in natura* utilizada para obtenção da solução e o tipo de processo extrativo em álcool, não foram relatados. As outras amostras (2) Super Green e (3) Paraná Green foram processadas a partir de própolis *in natura* enviadas pela CONAP - Cooperativa Nacional de Apicultura Ltda. e selecionadas por macroregiões de coleta. A própolis denominada Super-Green era procedente da região sudeste, enquanto que a Paraná-Green, da região sul do Brasil. As resinas foram previamente avaliadas pelo órgão emissor em relação a caracteres organolépticos e presença dos antibióticos tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetraciclina e sulfas. Análise macroscópica da própolis *in natura* já fornece dados importantes sobre ocorrência de princípios ativos na própolis, como a presença do flavonóide crisina, responsável pela cor amarelada e de cumarina, associada ao odor resinoso (GHISALBERTI, 1979). A negatividade relativa aos antibióticos descartou um possível efeito cruzado sobre os microorganismos que seriam testados

O exame para análise das própolis avaliadas foi cromatografia de camada delgada. O objetivo era de padronizar o conteúdo flavonóide básico normalmente presente na própolis, sem no entanto quantificá-lo e qualificá-lo totalmente. Na técnica empregada, as amostras foram comparadas a solução alcoólica extrativa de própolis usada como padrão que apresentava em sua composição cinco flavonóides distintos: (1) pinocembrina, (2) quercetina, (3) crisina, (4) galangina e (5) tectocrisina. Estes representam os principais flavonóides presentes em soluções de própolis e correspondem a cerca de 35% do conteúdo flavonóide normalmente detectado (VANHAELEN e VANHAELEN-FASTRE, 1979). Nos resultados dos exames cromatográficos, as três amostras foram certificadas como própolis pelos caracteres organolépticos de cor e aroma das soluções extrativas e pela composição básica de flavonóides. Os resultados do presente estudo mostraram sensibilidade do *Staphylococcus*

aureus (*S.aureus*) a todas as amostras de própolis testadas pelo teste de difusão em ágar. As demais bactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) foram resistentes. No entanto, na avaliação da concentração mínima inibitória (CIM), padrões de diluições variando de 1:20 (controle) a 1:80 foram inibitórios para *E.faecalis*. A diferença relativa inibição deste microrganismo pode ser decorrente da difusibilidade dos princípios ativos da própolis em álcool, que pode gerar, na difusão em ágar, uma concentração abaixo da inibitória mínima. Na prática, o diâmetro do halo de inibição não permite distinguir a eficácia relativa do antimicrobiano ensaiado, pois quanto maior for o peso molecular da substância testada, menor a difusibilidade no meio e menor o contato com os microrganismos cultivados.

Park et al. (1997), compararam qualitativamente os flavonóides presentes em própolis coletada de diferentes regiões brasileiras. Os resultados indicaram semelhança no conteúdo flavonóide presente nos extratos etanólicos a 80% obtidos de São Paulo e Minas Gerais (região sudeste) e Goiás e Mato Grosso (próxima a sudoeste), mas diferença em relação a aquela da região sul (Paraná e Rio Grande do Sul). Em relação a atividade antimicrobiana, todas as amostras de extrato etanólico demonstraram inibição de *S.aureus*, enquanto *E. coli* não foi inibida. Essa diferença na sensibilidade pode ser explicada pela diferença no conteúdo qualitativo e/ou quantitativo de flavonóides. Própolis brasileiras apresentam menor conteúdo de flavonóides (BANKOVA et al., 1995).

Os resultados relativos a inibição de bactérias Gram-positivas, no presente estudo, condizem com os de Lepekhin e Leonova (1970) e Grange e Davey (1990), que observaram maior sensibilização de bactérias Gram-positivas a soluções extrativas de própolis em álcool do que de Gram-negativas. Estas últimas apresentam na membrana celular externa, uma proteína denominada porina, que promove o mecanismo de transporte seletivo de compostos de baixo peso molecular para o interior da célula, o que poderia explicar um menor efeito da própolis se em sua composição predominassem compostos de alto peso molecular, responsáveis pela ação antimicrobiana.

Os microrganismos utilizados no experimento corresponderam a cepas padronizadas referendadas da *American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville, MA, usadas em culturas puras. Esta padronização foi realizada para que não surgissem dúvidas em relação a procedência e a qualidade das cepas e para viabilização da reprodutibilidade dos experimentos.

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo móvel, Gram-negativo, aeróbio estrito. E

toxigênico e invasivo e um importante patógeno nosocomial. *Enterococcus faecalis* é o mais comum dos enterococos e é responsável por 85-90% das infecções enterocócicas, sendo também um patógeno nosocomial. É um microrganismo anaeróbio facultativo e Gram-positivo. *Escherichia coli* apresenta forma cocobacilar e é um anaeróbio facultativo Gram-negativo. *Staphylococcus aureus* é um coco anaeróbio facultativo, Gram-positivo, imóvel e não esporulado, produtor de catalase e coagulase. Estes microrganismos foram escolhidos por serem mais resistentes as adversidades do meio ambiente e a agentes químicos, sendo referenciados como patógenos de escolha para testagens de antimicrobianos (PAPPALARDO; SILGRIST; FRANCIOLI, 1991). Além disto, para a determinação da atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis derivado de diferentes origens, o padrão bacteriano tem sido o *Staphylococcus aureus* (GRANGE e DAVEY, 1990; BANKOVA et al., 1995).

Neste experimento, o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A actinomycetemcomitans*) teve seu crescimento inibido no teste de difusão em ágar, formando halos de inibição de até 12mm. A CIM variou de 1:40 a 1:80. Estes dados não estão de acordo com aqueles do estudo de Santos et al (1997), que avaliaram a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis sobre o *A. actinomycetemcomitans* por método de diluição (V/V%) em ágar. Os resultados para o *A. Actinomycetemcomitans* revelaram sensibilidade a concentrações de 0,1% a 0,25%, e ausência de crescimento a 0,5%. Calculando os dados do presente estudo, as concentrações inibitórias variaram de 1,25% a 2,5%. No entanto, uma comparação efetiva não foi possível, pois no estudo de Santos et al. (1997) não foram mencionadas as concentrações das soluções de própolis.

O Actinobacillus actinomycetemcomitans (*Aa*) e *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) são os microrganismos mais extensivamente estudados em periodontia e se relacionam a diversas condições de doença periodontal, estando também presentes em saúde gengival, na placa supra gengival. São considerados periodontopatogênicos e apresentam fatores de virulência que potencializam a capacidade destrutiva e invasiva dos tecidos do hospedeiro. Estas propriedades dificultam a erradicação destes patógenos pelos procedimentos convencionais de raspagem supra, sub-gengival e alisamento radicular, indicando associação de substâncias químicas para controle adjuvante (SLOTS e TING, 1999).

Caracteristicamente, o *Actinobacillus actinomycetemcomitans* é um coco-bacilo Gram-negativo, não esporulado e imóvel. De acordo com o metabolismo respiratório é um anaeróbio facultativo, capnofílico, sendo produtor de oxidase e catalase (SLOTS, 1986). Este

microrganismo apresenta vários fatores de virulência que permitem sua sobrevivência e proliferação no ambiente bucal e o capacitam a envolver as estratégias de defesa do hospedeiro. Muitos destes fatores podem estar relacionados a patogênese da doença periodontal e podem atuar (1) promovendo a colonização e persistência do microrganismo na cavidade bucal através de adesinas, invasinas, bacteriocinas e capacidade de resistência antibiótica; (2) interferindo na resposta do hospedeiro pela ação de leucotoxinas, inibidores quimiotáticos, proteínas imunossupressivas e proteínas de ligação a Fc; (3) destruindo os tecidos do hospedeiro por mediação de citotoxinas, colagenase, agentes de reabsorção óssea e estimuladores da inflamação; (4) impedindo o reparo dos tecidos do hospedeiro por inibição da proliferação de fibroblastos e da formação óssea (FIVES-TAYLOR et al., 1999)

Periodontite juvenil localizada é a doença mais relacionada a presença de *A. actinomycetemcomitans* (EISENMANN et al., 1983; LOPEZ et al., 1995, TINOCO et al., 1997) com prevalência variável do microrganismo de 39% a 100% dos casos (SLOTS e TING, 2000). Esta bactéria também tem sido fortemente relacionada a lesões periodontais em pacientes com síndrome de Papillon-Lefevre (BIMSTEIN et al., 1990). Em sítios de periodontite refratária, o *A. actinomycetemcomitans* também é frequentemente encontrado (SLOTS, 1986), provavelmente devido à capacidade de invasão tecidual e consequente dificuldade para efetivo controle mecânico microbiano e adequada cicatrização periodontal (SAGLIE, 1981).

No presente estudo, a *Porphyromonas gingivalis* apresentou o maior perfil de sensibilidade antimicrobiana a própolis no teste de difusão em ágar e na avaliação da concentração inibitória mínima. Os halos de inibição formados variaram de 25 a 27mm e CIM de 1:640 a 1:1280. Comparação com outros estudos não foi possível, pois estes não existem ou não foram encontrados na literatura.

A partir deste estudo, poderia ser questionado o uso do *Staphylococcus aureus* como microrganismo teste para antibiograma de própolis. Pelo presente estudo, a *P. gingivalis* apresentou sensibilidade evidente e mais facilmente comprovável que o *S. aureus*. Dessa forma, poder-se-ia sugerir que ela fosse usada como alternativa mais indicada para avaliar atividade antimicrobiana de soluções extrativas de própolis.

A *Porphyromonas gingivalis*, é classificada como um coco-bacilo, Gram negativo, anaeróbio estrito, imóvel, hemolítico e assacarolítico (HOLT et al., 1999). A ocorrência de *P. Gingivalis* é mais restrita a cavidade bucal e tem sido relacionada à etiologia e progressão de vários tipos de doença periodontal (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992). Ocasionalmente

este microrganismo é relacionado a infecções não bucais, tendo sido relacionado a casos de sinusite crônica, abscessos peritonsilares, tonsilites, infecções pleuropulmonares, empiema torácico e abscesso tubo-ovariano (VAN WINKELHOFF e SLOTS, 1999). Acredita-se que a *P. gingivalis* e outras bactérias periodontopatogênicas possam promover destruição tecidual em doenças periodontais por ação direta de seus produtos nos tecidos e células do hospedeiro e por indução de respostas inflamatórias levando a alterações do metabolismo celular do hospedeiro (PAGE e SCHROEDER, 1981). A *Porphyromonas gingivalis* produz muitas macromoléculas e componentes que atuam como fatores de virulência e incluem lipopolissacarídeo, membrana externa e seus componentes incluindo vesículas e fimbrias além de numerosos produtos finais do metabolismo, especialmente proteínases (HOLT et al., 1999).

Pacientes adultos periodontalmente saudáveis ou com mínimo de doença apresentam *P. gingivalis* em cerca de 10% dos sítios estudados. Prevalência variável de 33 a 100% ocorre em pacientes com lesões de periodontite crônica (SLOTS e TING, 1999) e as maiores proporções são observadas na microbiota de bolsas periodontais profundas (ALI et al 1996). Este microrganismo é raramente isolado de sítios saudáveis ao redor do implante e vários estudos correlacionam sua presença ao insucesso no tratamento implantar (ROSENBERG et al., 1991).

Dados deste trabalho abrem perspectivas para outras pesquisas e avaliações. A própria diversidade terapêutica relacionada a própolis abre novos campos de investigação. Dimov et al. (1991) avaliaram um método de preparação de um derivado de própolis, completamente solúvel em água e isento de cera, em relação a efetividade imunomodulatória e bactericida. Foi observada indução significativa e não-específica de resistência do hospedeiro. Os resultados dos testes antimicrobianos *in vitro* foram negativos. Os resultados dos testes antimicrobianos *in vitro* foram negativos indicando que a proteção *in vivo* contra infecções por Gram-negativos não se relacionou a ação bactericida da substância. Estes derivados solúveis teriam a capacidade de aumentar a resistência do hospedeiro por induzirem ativação de macrófagos e estimularem as funções dos linfócitos. Isto justificaria uma função imunomoduladora, que isolada ou associada a propriedade antiinflamatória da própolis poderia atuar como adjuvante na terapêutica de doença periodontal.

Os principais componentes relacionados a atividade farmacológica da própolis são os flavonóides, os ácidos aromáticos e os fenóis (LEJEUNE; POURRAT; DEHMOUCHE 1988, GRANGE e DAVEY, 1990). Entre as várias propriedades terapêuticas dos flavonóides esta o

fortalecimento do tecido conjuntivo. Através da ativação da prolina hidroxilase, promovendo as ligações cruzadas do colágeno, e da supressão de prostaglandina (indutora de elastase e hidrolases catabólicas). poderia controlar a decomposição do tecido conjuntivo. Além disto, os flavonóides potencializam a ação da vitamina C, importante substrato para a síntese do colágeno. Esta propriedade poderia contribuir para a regeneração e/ou reparo do tecido conjuntivo periodontal . No caso dos dados relativos ao presente estudo, a análise qualitativa do conteúdo flavonóide das amostras testadas poderia possibilitar o estabelecimento de um perfil flavonóide de atuação em periodontopatógenos.

Embora varias propriedades terapéuticas da própolis sejam conhecidas, a dificuldade para indicação e aplicação efetivas reside na dificuldade de padronização da resina. Até recentemente. não existiam legislações ou normatizações nacionais e/ou internacionais para regulamentar a identidade e a qualidade da própolis. O Brasil foi pioneiro nesta iniciativa, e recentemente o Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabeleceu instruções normativas para diminuir as variáveis e estabelecer possibilidade de controle do produto. Estas regulamentações podem facilitar o estabelecimento de padrões para estudo formando resultados mais fidedignos e aplicáveis.

Concluindo, os resultados do presente estudo são interessantes Apesar da susceptibilidade *in vitro* sobre patógenos periodontais a antimicrobianos, estes resultados devem ser extrapolados para efetividade *in vivo* sob cautela. A eficácia *in vivo* é determinada por características farmacocinéticas e fatores ambientais locais. Mas de qualquer forma, susceptibilidade microbiana *in vitro* é o primeiro passo para evolução de ensaios clínicos de substâncias antimicrobianas.

CONCLUSÃO

- a) *O Staphylococcus aureus* e o *Enterococcus faecalis* foram inibidos *in vitro*, pelas 3 amostras de própolis testadas.
- b) *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* não foram inibidas pelas soluções de própolis testadas.
- c) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* foram inibidos, *in vitro*, pelas amostras de própolis estudadas.

REFERÊNCIAS

ADDY, M.; GRIFFITHS, C.; ISAAC, R. The effect of povidone iodine on plaque and salivary bacteria. A double-blind crossover trial. **Journal of periodontology**, v. 48, n. 11, p. 730-732, 1977.

AGA, Hajime et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.

ALFONSUS, Erwin C. Some sources of propolis. **Glean. Bee Cult**, v. 61, p. 92-93, 1933.

AMOROS, M. et al. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. **Journal of natural products**, v. 57, n. 5, p. 644-647, 1994.

AZEVEDO, Rosa Vitória Palamin et al. Candida sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 335-341, 1999.

BANKOVA, Vassya et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 54, n. 5-6, p. 401-405, 1999.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 50, n. 3-4, p. 167-172, 1995.

BANKOVA, V. et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 51, n. 5-6, p. 277-280, 1996.

BANSKOTA, Arjun H. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.

BIMSTEIN, Enrique et al. Periodontitis associated with Papillon-Lefèvre syndrome. **Journal of Periodontology**, v. 61, n. 6, p. 373-377, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Anexo VI, de 19 de janeiro de 2001. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Disponível em: <http://www.iberpharm.com.br/www/arquivos/IN03-19-01-2001.pdf>.

BRETZ, Walter A. et al. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53, n. 11-12, p. 1045-1048, 1998.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CATTORINI, P. E. Le api e gli uomini. **Fitoterapia**, v. 34, p. 85-93, 1963.

COLLAERF, Bruno et al. The effect of delmopinol rinsing on dental plaque formation and gingivitis healing. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 19, n. 4, p. 274-280, 1992.

CONE, E. Beekeeping: Science, Practice and World Recources. Heinemann, **London**,; 367-372, 1988.

DEBUYSE E. “ La Própolis”, Tese de Doutoramento em Farmacia, Universidade de Nantes, Franca , 1983.

DIMOV, V. et al. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. **Apidologie**, v. 22, n. 2, p. 155-162, 1991.

DUARTE, Cesário Antonio; KFOURI, Luciana da Silva. Ação da própolis sob forma de bochechos: na formação da placa bacteriana e gengivite. **RGO (Porto Alegre)**, p. 82-4, 1999.

EISENMANN A, Ana C. et al. Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. **Journal of periodontology**, v. 54, n. 12, p. 712-713, 1983.

ELEY, B. M. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque—a review. **British dental journal**, v. 186, n. 6, p. 286-296, 1999.

FERREIRA, Rita de Cássia Valente; VALENTE, Paulo Henrique Muzetti; BARBOSA, Antônio Desidério. Atividade antibacteriana da propolis. **Lecta-USF**, p. 65-93, 1996.

FIVES-TAYLOR, Paula M. et al. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Periodontology 2000**, v. 20, p. 136-167, 1999.

FORNELL, Jan; SUNDIN, Yvonne; LINDHE, Jan. Effect of Listerine® on dental plaque and gingivitis. **European Journal of Oral Sciences**, v. 83, n. 1, p. 18-25, 1975.

GEBARA, Elaine Cristina Escobar; ZARDETTO, Cristina Giovannetti Del Conte; MAYER, Marcia Pinto Alves. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, p. 251-6, 1996.

GENCO, Robert J. Pharmaceuticals and periodontal diseases. **The Journal of the American Dental Association**, v. 125, n. 1, p. 11S-19S, 1994.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee world**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, n. 3, p. 159-160, 1990.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee world**, v. 71, n. 3, p. 107-118, 1990.

GREENAWAY, W. et al. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 46, n. 1-2, p. 111-121, 1991.

- GROSSMAN, E. et al. A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics, and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. **Journal of periodontology**, v. 60, n. 8, p. 435-440, 1989.
- HARPER, P. Renton et al. An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products: (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque in vivo. **Journal of clinical periodontology**, v. 22, n. 9, p. 723-727, 1995.
- HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER E., SEUFF, H., POST, B. Contact Dermatitis; 17: 160-170, 1987.
- HAVSTEEN, Biochem. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.
- HENNESSEY, T. D. Antibacterial properties of Hibitane. **Journal of clinical periodontology**, v. 4, n. 5, p. 36-48, 1977.
- HOLT, Stanley C. et al. Virulence factors of Porphyromonas gingivalis. **Periodontology 2000**, v. 20, n. 1, p. 168-238, 1999.
- IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries research**, v. 25, n. 5, p. 347-351, 1991.
- KÖNIG, Bernd. Plant sources of propolis. **Bee world**, v. 66, n. 4, p. 136-139, 1985.
- KORNMAN, Kenneth S.; LOESCHE, Walter J. The subgingival microbial flora during pregnancy. **Journal of periodontal research**, v. 15, n. 2, p. 111-122, 1980.
- KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. **Pharmazie**, v. 48, n. 10, p. 785-786, 1993.
- LEJEUNE, B.; POURRAT, A.; DEHMOUCHE, H. Propolis: utilisation en dermocosmétologie. **Parfums, cosmétiques, arômes**, n. 82, p. 73-77, 1988.
- LOBENE, R. R.; SOPARKAR, P. M. EFFECT OF A CETYLPRIDINIUM CHLORIDE MOUTHWASH ON HUMAN PLAQUE AND GINGIVITIS. In: **Journal of Dental Research**. 1619 DUKE ST, ALEXANDRIA, VA 22314: AMER ASSOC DENTAL RESEARCH. p. B195-B195, 1977.
- LOE, H. Progression of natural untreated periodontal disease in man. **Borderland Between Caries and Periodontal Disease, 3rd edn. Geneve: Medecin et Hygiene**, 1986.
- LÓPEZ, Néstor J. et al. Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in Chile. **Journal of periodontology**, v. 66, n. 7, p. 559-567, 1995.
- LOTUFO, Mônica Andrade; BIRMAN, Esther Goldenberg. Avaliação clínica do uso tópico de própolis em pacientes com úlceras aftosas recorrentes do tipo Minor. 1999.
- MIDDLETON JR, Elliott; KANDASWAMI, Chithan. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. **Biochemical pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 1167-1179, 1992.

MAGRO FILHO, Osvaldo. Reparação de alvéolo dental e de ferida cutânea após irrigação com solução de própolis: estudo histológico em ratos. 1988.

MARCUCCI, Maria Cristina. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARTÍNEZ SILVEIRA, Guido et al. Efectos curativos de una solución hidroalcohólica del propóleo cubano al 1, 5 en la terapéutica periodontal. **Rev. cuba. estomatol**, p. 14-9, 1992.

MATOS, Francisca Tereza Coelho. Mumificação pulpar pelo emprego da Própolis (Nota prévia). **Rev. bras. odontol**, p. 44-44, 1989.

MOBUS, B. The importance of propolis to the honey bee. **Brit. Bee J**, v. 19, n. 8, p. 198-199, 1972.

MURRAY, M. C.; WORTHINGTON, H. V.; BLINKHORN, A. S. A study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, n. 11, p. 796-798, 1997.

NICOLAS, A. Cire d'abeilles et propolis. Nancy: Thomas 1947; 141-142

OPPERMANN R.V, None D. O Efeito da aplicação de solução alcoólica de própolis sobre a formação da placa bacteriana. *Stomatos* —; artigo 3 (2), Junho, 1996.

PAGE, Roy C.; SCHROEDER, Hubert E. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 52, n. 9, p. 477-491, 1981.

PAGE, Roy C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 216-248, 1997.

PANZERI, Heitor et al. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliações físicas, microbiológicas e clínicas. **Rev. ABO nac**, p. 26-30, 1999.

PAPPALARDO, G.; SIEGRIST, H. H.; FRANCIOLI, P. Evaluation of a new antiseptic based on natural substances. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 17, n. 10-11, p. 531-535, 1991.

PARK, Yong K. et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Tecnol**, p. 97-106, 1997.

PETRI, G.; LEMBERKOVICS, E.; FOLDVARI, M. Examination of differences between propolis (bee glue) produced from different floral environments. **Developments in food science**, 1988.

PROSERPIO G. L' Ape Cosmetica. Erboristeria Domani, Milano. 1981.

SUGLIE, F. R. Bacterial invasion and its role in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontal disease Pathogens and host immune responses**, p. 27-40, 1981.

- SANTOS FA, BASTOS EMAF, OZEDA M, F s LM, C VALHO MAR ,M K ESA
Atividade antibacteriana contra *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium*
spp., Propriedades físico-químicas e origem botânica da própolis produzida por *Apis*
mellifera. **Livro de resumos do XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**,
realizado no Rio de Janeiro Brasil, período de 11 a 15 novembro de 1997.
- SANTOS, Vagner Rodrigues. Própolis: antibiótico natural alternativo em Odontologia?
(Revisão de literatura). **Rev. CROMG (Impr.)**, p. 192-5, 1999.
- SCHAEKEN, M. J. M. et al. The effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on
plaque accumulation, development of gingivitis and formation of calculus in a 28-week
clinical test. **Journal of clinical periodontology**, v. 23, n. 5, p. 465-470, 1996.
- SILVEIRA, Guido et al. Estudio preliminar sobre los efectos del propolan en el
tratamiento de la gingivitis crónica y de las úlceras bucales. **Rev. cuba. estomatol**, p.
36-44, 1988.
- SLOTS, Jørgen; TING, Miriam. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas*
gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. **Periodontology** 2000, v. 20, n.
1, p. 82-121, 1999.
- SLOTS, J. Microbiology in periodontics. **Tandlaegebladet**, v. 90, n. 18, p. 794-798, 1986.
- SOCRANSKY, Sigmund S.; HAFFAJEE, Anne D. The bacterial etiology of destructive
periodontal disease: current concepts. **Journal of periodontology**, v. 63, p. 322-331, 1992.
- STEINBERG, D.; KAINE, G.; GEDALIA, I. Antibacterial effect of propolis and honey on
oral bacteria. **American journal of dentistry**, v. 9, n. 6, p. 236-239, 1996.
- TAKAISI-KIKUNI, Ntongo B.; SCHILCHER, Heinz. Electron microscopic and
microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of
a defined propolis provenance. **Planta medica**, v. 60, n. 03, p. 222-227, 1994.
- TINOCO, Eduardo Muniz Barretto et al. Localized juvenile periodontitis and
Actinobacillus actinomycetemcomitans in a Brazilian population. **European Journal of**
Oral Sciences, v. 105, n. 1, p. 9-14, 1997.
- TSUCHIYA, Hironori et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical
flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of**
ethnopharmacology, v. 50, n. 1, p. 27-34, 1996.
- VAN WINKELHOFF, Arie J.; SLOTS, Jørgen. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and
Porphyromonas gingivalis in nonoral infections. **Periodontology** 2000, v. 20, n. 1, p. 122-
135, 1999.
- VANHAELLEN, Maurice; VAN HAELEN FASTRE, Renée. PROPOLIS. I: ORIGINE,
MICROGRAPHIE, COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITE THERAPEUTIQUE. 1979.
- VIT, Patricia et al. Caracterización de propóleos venezolanos. **Rev. Inst. Nac. Hig**, p. 38-46,
1993.

WALKER, Penelope; CRANE, Eva. Constituents of propolis. **Apidologie**, v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.

WENNSTRÖM, Jan; LINDHE, Jan. Effect of hydrogen peroxide on developing plaque and gingivitis in man. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 6, n. 2, p. 115-130, 1979.

YONG P, K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24-28, 1998.

ZAMBON, J. J.; SLOTS, J.; GENCO, R. J. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. **Infection and immunity**, v. 41, n. 1, p. 19-27, 1983.

ZÁRATE PEREIRA, Paulo. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05 por cento; fluoreto de sódio 0,2 por cento e própolis 5 por cento acrescida de fluoreto de sódio 0,05 por cento, sobre níveis salivares de estreptococos do grupo mutans em pacientes cárie-ativos. 1999.