



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

CINTHIA COELHO SIMÕES

ESTUDO BIOQUÍMICO DA AÇÃO DA PRÓPOLIS
FRENTE AOS MICRORGANISMOS PRESENTES
NA SALIVA DE HUMANOS

Salvador
2007

CINTHIA COELHO SIMÕES

**ESTUDO BIOQUÍMICO DA AÇÃO DA PRÓPOLIS
FRENTE AOS MICRORGANISMOS PRESENTES
NA SALIVA DE HUMANOS**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo

Salvador
2007

Biblioteca Central Reitor Macêdo Costa - UFBA

S593 Simões, Cinthia Coelho

Estudo bioquímico da ação da própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos / Cinthia Coelho Simões - 2007. 106f. : il.

Inclui anexos.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Odontologia, 2007.

1. Própolis - Efeito Fisiológico. 2. Saliva. 3. Metabolismo bacteriano. 4. Microrganismos patógenos. 5. Própolis - Uso terapêutico. 6. Abelha - Produtos. I. Araújo, Roberto Paulo Correia de. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Odontologia. III. Título.

CDD - 615-36
CDU - 638.135

CINTHIA COELHO SIMÕES

**ESTUDO BIOQUÍMICO DA AÇÃO DA PRÓPOLIS
FRENTE AOS MICRORGANISMOS PRESENTES
NA SALIVA DE HUMANOS**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Odontologia com área de concentração em Clínica Odontológica.

Salvador, 26 de fevereiro de 2007.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho (UFRB)

Prof^a. Dr^a. Viviane Almeida Sarmiento (UFBA)

Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo (UFBA)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre orientando meus passos, encorajando-me a enfrentar todos os desafios e por colocar pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais, Maria e Ivan, e às minhas irmãs, Thais e Simone, pela compreensão, amor e carinho durante toda a minha vida.

À minha segunda mãe, vovó Zuléica, pelo amor, carinho, incentivo durante todo o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu marido João Paulo, pelo companheirismo, amor e paciência, compartilhando todos os momentos alegres e difíceis.

A minha filha, Maria Luiza, novo amor da minha vida, ainda no meu ventre, sei que está feliz com esta conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Paulo de Correia Araújo, pela amizade, dedicação e empenho, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, por ter permitido a realização de toda a fase experimental deste trabalho no Laboratório de Bioquímica Oral.

Aos voluntários deste estudo, alunos de graduação em Odontologia da Universidade Federal da Bahia e da Faculdade de Tecnologia e Ciência, por terem aceitado e confiado na fase experimental deste estudo.

Ao Sr. Elpídio pela atenção, apoio e interesse durante a estruturação do projeto de pesquisa.

À professora e amiga Mônica Beltrame, por sempre ter me incentivado e apoiado desde antes do começo desta jornada.

À amiga e colega de mestrado Ana Rita Sokolonski Antón, pela dedicação e ajuda durante a fase experimental deste trabalho.

Ao amigo Max Lima, pelo auxílio na execução da análise estatística deste estudo.

Aos colegas de Mestrado, pelo incentivo e por termos caminhado juntos nesta jornada.

Às colegas de trabalho e amigas Alana Nunes, Alile Fixina, Ana Cristina Cunha e Lorena Ferreira, pelo carinho e dedicação nos momentos difíceis, e pela organização, permitindo a conciliação entre o meu trabalho e as atividades do Mestrado.

Às amigas Lucila Machado, Renata Tannous e Vânia Theodoro, pela presença e constante em todas as fases da minha vida profissional.

*É importante você acreditar que vencerá.
Aquilo que você deseja fortemente na mente acaba acontecendo.
Um desenho disforme impede a realização do objetivo.
Crie firmemente que tudo lhe sairá bem.
Alimente a esperança.
A lei universal do amor responde positivamente aos nossos anseios
desde que não lesem os outros.
Quem luta e serve, confiante na vitória,
constrói a embarcação segura em que navegará amanhã.*

Lorival Lopes, 1996

RESUMO

Este estudo avaliou *in vitro* a ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. Para a realização dos ensaios da primeira fase, adicionou-se à saliva coletada uma solução de glicose a 25%, seguindo-se a reserva de alíquotas para a preparação do grupo controle (GC₁) e de sete grupos experimentais(GExp), mediante a adição do extrato de própolis I, II e III, e dos antissépticos bucais industrializados Periogard, Listerine, Malvatricin e Parodontax. Nas experimentações da segunda fase, foram coletadas amostras de saliva em jejum (GC₂) e nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe individual de um minuto com os extratos de própolis I, II e III, a que se seguiu a adição de glicose a 25%. Nas duas fases, a partir de alíquotas das misturas, foi determinado, pelo método de glicose-oxidase, o consumo de glicose pelos microrganismos nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação a 37°C. Constataram-se diferenças estatisticamente significativas no consumo de glicose ao serem comparadas as médias dos grupos controles após 24 e 48 horas tanto na primeira quanto na segunda fase. Entre os grupos experimentais da fase 1, não foram comprovadas diferenças significativas, concluindo-se que os extratos de própolis I, II e III tiveram a mesma ação antimicrobiana, assim como revelaram efeito farmacológico similar, quando comparados aos antissépticos industrializados testados. Na fase 2, o extrato de própolis I revelou eficácia antimicrobiana mais prolongada do que a observada nos grupos em que o enxágüe foi realizado com extrato de própolis a II e III, evidenciando que a elevação da concentração provavelmente não ocasionou um aumento da potencialidade e da substantividade das soluções de própolis, tendo sido o tipo de princípio ativo antimicrobiano presente na sua composição a variável responsável pelo prolongamento desta ação terapêutica. Assim sendo, o extrato de própolis a I, em que estão presentes compostos apolares, teve uma ação antimicrobiana mais prolongada do que os extratos de própolis a II e III, que possuem em sua composição flavonóides e éster fenético do ácido caféico.

Palavras-chave: Própolis. Abelha. Saliva. Microrganismos. Metabolismo.

ABSTRACT

This study evaluated *in vitro* the action of propolis extracts in different concentrations, in comparison with the effectiveness of oral antiseptics, against microorganisms present in human saliva. For the accomplishment of the rehearsals of the first phase, glucose 25% solution was added to saliva, then individual samples were collected to prepare a control group (CG₁) and experimental groups(GExp), with addition of propolis extracts in I, II and III, and extracts of Periogard, Listerine, Malvatricin e Parodontax. In the experimentations of the second phase, samples of saliva in fast (CG₂) and after mouthrinses with extracts of propolis I, II and III were collected and later glucose solution was added. In both phases of the experiments, successive samples of the mixtures were collected and glucose consumption by microorganisms present in human saliva was determined by the glucose oxidase method in 0, 24 and 48 h of incubation preserved at 37°C. The values obtained in control group proved that there was consumption of glucose by microorganisms after 24 and 48 h of incubation in both phases of the study. However, in the first phase, among experimental groups no significant differences have been observed. We conclude that the propolis I, II and III solutions showed the same antimicrobial action, in the first phase, and similar pharmacological effect when compared to the industrialized oral antiseptics tested. It was verified that second phase experiments propolis extract I demonstrated a longer lasting antimicrobial activity than groups submitted to mouthrinses using propolis extracts II and III, inferring that a higher concentration probably did not promote a higher potentiality and substantivity of propolis solutions. On the other hand, the antimicrobial active principle present in its composition was the variable responsible for a longer therapeutic action. Propolis extracts I which contain apolar compounds showed a longer lasting antimicrobial activity than propolis extracts II and III composed by flavonoids and CAPE.

Keywords: Propolis. Bee. Saliva. Microorganisms. Metabolism.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Classificação das própolis brasileiras	25
Quadro 2	- Equipamentos utilizados nas experimentações	62
Quadro 3	- Extratos de própolis e enxaguatórios	63
Quadro 4	- Fase 1: Grupos controle e experimentais	67
Quadro 5	- Fase 2: Grupos controle e experimentais	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura do composto fenólico simples ou ácido fênico	34
Figura 2	- Núcleo básico dos flavonóides composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)	36
Figura 3	- Núcleo básico hidroxifenilpropenóico dos ácidos fenólicos	38
Figura 4	- Mecanismo da reação corada para determinação da concentração de glicose	64
Figura 5	- Fase 1: Médias do consumo de glicose (mg/dL) referentes aos grupos controle e experimentais nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação	73
Figura 6	- Fase 2: Médias do consumo de glicose (mg/dL) referentes aos grupos experimentais nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação imediatamente após o enxágüe com os extratos de própolis tendo como referencial o grupo controle	75
Figura 7	- Fase 2: Médias do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp _{11%} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe	76
Figura 8	- Fase 2: Médias do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp _{20%} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe	77
Figura 9	- Fase 2: Médias do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp _{30%} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Fase 1: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) referentes aos grupos controle e experimentais nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação	72
Tabela 2	- Fase 2: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) referentes aos grupos experimentais nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação imediatamente após o enxágüe com os extratos de própolis tendo como referencial o grupo controle	74
Tabela 3	- Fase 2: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp _{11%} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe	76
Tabela 4	- Fase 2: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp _{20%} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe	77
Tabela 5	- Fase 2: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp _{30%} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	Associação Brasileira de Própolis
ANOVA	Análise de variância
CAPE	Éster fenético de ácido caféico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração inibitória mínima
COX	Ciclooxigenase
DL50%	Dose letal 50%
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOP	Densidade óptica da solução padrão de glicose
DOT	Densidade óptica do teste
EEP	Extrato etanólico de própolis
EPM	Erro padrão da média
FTC	Faculdade de Tecnologia e Ciência
G1	Primeira fase da divisão celular
GOD	Glicose-oxidase
GTF	Glucosiltransferase
H ₂ O ₂	Água oxigenada
Hep3B	Hepatocarcinoma humano
IG	Índice gengival
IHO-S	Índice de higiene oral simplificado
NaF	Fluoreto de sódio
NO	Óxido nítrico
PMS1	Gene de reparação do DNA
RNA	Ácido ribonucléico
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidade formadora de colônia
UNITAU	Universidade de Taubaté
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	ABELHAS	20
2.2	PRÓPOLIS	22
2.2.1	Própolis brasileira	24
2.2.2	Características organolépticas	26
2.2.3	Coleta, armazenagem, comércio, patentes e falsificação	27
2.2.4	Normas e qualidade	28
2.2.5	Composição química	29
2.2.5.1	Compostos fenólicos	33
2.2.5.1.1	Flavonóides	34
2.2.5.1.2	Ácidos fenólicos	38
2.2.6	Propriedades farmacológicas	39
2.2.6.1	Atividade antiinflamatória	39
2.2.6.2	Atividade antineoplásica	42
2.2.6.3	Atividade antioxidante	43
2.2.6.4	Atividade antimicrobiana	45
2.2.7	Toxicidade e alergia	55
3	OBJETIVOS	57
3.1	OBJETIVO GERAL	58
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
4	MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	60
4.1.1	Hipótese	60
4.1.2	Variável de resposta	60
4.1.3	População da amostra	61
4.2	PROCESSO DE OBTENÇÃO DA SALIVA	61
4.3	EQUIPAMENTOS	62
4.4	ENXAGUATÓRIOS	63
4.5	TÉCNICA E MECANISMO DA REAÇÃO CORADA PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE GLICOSE	64
4.6	DETERMINAÇÃO DO FLUXO SALIVAR	65
4.7	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE TAMPONAMENTO DA SALIVA	66
4.8	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	66
4.8.1	Fase 1: ação antimicrobiana de extratos de própolis I, II e III e de Periogard, Listerine, Malvatricin e Paradontax	66
4.8.2	Fase 2: ação antimicrobiana de extratos de própolis I, II e III em diferentes tempos de experimentação após o enxágüe	67
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	69
5	RESULTADOS	70

5.1	FASE 1: AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS I, II e III E DE PERÍOGARD, LISTERINE, MALVATRICIN E PARODONTAX	71
5.2	FASE 2: AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS I, II e III EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPERIMENTAÇÃO APÓS O ENXÁGÜE	73
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXO	
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (MCO-UFBA)	103
	ANEXO B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido	105

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é um sistema de crescimento aberto em que se aloja uma elevada variedade de microrganismos que são, repetidamente, introduzidos e removidos desse sistema. Trata-se de um ambiente orgânico onde somente se estabelecem microrganismos que possuem a capacidade de aderência às superfícies dos seus constituintes anatomofisiológicos (NEVES, 2002).

A compatibilidade entre a coexistência dessa população microbiana e a saúde individual dos seres humanos decorre do desenvolvimento de mecanismos imunológicos desde o nascimento e dos processos de adaptação e readaptação contínuos que estabelecem vínculos biológicos entre o organismo do homem e os microrganismos que nele costumam se abrigar. Tal vínculo garante a condição saprófita desses microrganismos, em equilíbrio ecológico, caracterizando situações de simbiose e antibiose (NEVES, 2002).

Uma variedade de mecanismos de proteção age intra-oralmente como o epitélio que atua como barreira física, sendo que sua renovação celular contribui para a defesa do organismo. Além disso, a mucosa oral é constantemente lubrificada pela saliva, que, além de possuir função diluente e enxaguatória, contém fatores antimicrobianos, dentre os quais a lisozima, a lactoferrina e a lactoperoxidase, resultando numa barreira de proteção contra os microrganismos (CHALLACOMBE, 1994).

Entretanto determinados fatores associados a uma dieta rica e freqüente em sacarose podem causar o desequilíbrio dessa comunidade, de modo a favorecer o crescimento e o estabelecimento de bactérias odontopatogênicas responsáveis pelas principais infecções da cavidade oral, comprometendo, assim, a integridade dos tecidos que as abrigam.

O interesse do homem pela ação benéfica que pode decorrer do uso de produtos naturais tem crescido e encontrado significativa aceitação popular. Dentre eles, a própolis tem se destacado graças à sua aplicabilidade na indústria de alimentos e de cosméticos, utilizada como princípio ativo em dentifrícios, extratos e cremes dermatológicos, por exemplo, o que se

deve às diversas propriedades terapêuticas que lhe são atribuídas, tais como as propriedades antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, antitumoral e, até mesmo, anticariogênica (IKENO et al., 1991; PARK, et al., 1998).

A própolis é uma resina de coloração e consistência variada, coletada, por abelhas de diversas espécies, de algumas partes de plantas como brotos, botões florais e exsudatos resinosos, enriquecida com secreções salivares desses insetos, freqüentemente comercializada sob a forma de *sprays*, unguentos, cápsulas, loções capilares e dentifrícios (BURDOCK, 1998). Apesar da existência de antissépticos eficazes no combate aos patogênicos bucais, a própolis surge como uma alternativa natural, com propriedades antimicrobianas e princípios ativos biocompatíveis com o organismo humano, pois sua diversidade molecular parece estar em harmonia com o metabolismo dos mamíferos, o que reduz, sobremaneira, possíveis agressões teciduais, desde que se leve em consideração o binômio concentração/dosagem correta.

A própolis é considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais. A complexidade de sua composição, em termos químicos, foi revelada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis (MARCUCCI, 1995).

Os principais constituintes da própolis são os compostos fenólicos, caracterizados pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. Essas substâncias estão representadas pelas agliconas de flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres bioativos contra vários microrganismos patogênicos (BANSKOTA et al., 1998; BURDOCK, 1998). Além dos compostos fenólicos, a própolis proveniente da Mata Atlântica vem se destacando como agente antimicrobiano em razão da presença de compostos apolares ainda pouco estudados, conforme os registros de Duarte e colaboradores (2003).

A presença desses compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, explica, em parte, a importante diversidade de propriedades terapêuticas relatadas por vários pesquisadores. A possível aplicação médica e odontológica da própolis aumentou o interesse por sua composição química e sua origem (BANSKOTA et al., 2000). Porém essa característica de panacéia compromete sua aceitação, visto que os profissionais de saúde em geral tendem a pôr em dúvida sua eficácia, exatamente por lhe serem atribuídas dezenas de atividades biológicas (PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002).

O presente estudo busca avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de diferentes extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva humana, com a finalidade de se verificar a ação terapêutica desse produto natural comercializado em várias concentrações acima de 11%, tido como sem contra-indicações, exceto para os indivíduos com alta sensibilidade imunológica a produtos apícolas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ABELHAS

As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores, processo evolutivo durante o qual surgiram várias espécies. Hoje se conhecem mais de 20 mil espécies de abelhas, mas acredita-se que existam ainda 40 mil espécies não-descobertas (PEREIRA et al., 2003).

Estes insetos pertencem à Ordem dos *hymenoptera* e Superfamília *Apoidea*, compostas por várias famílias, entre as quais destaca-se a família *Apidae*, sub-família *Apinae*, Tribo Apini, com espécies altamente sociais distribuídas nas Sub-tribos Apina e Meliponina. Em Apina é encontrada a espécie *Apis mellifera* L., 1758, amplamente criada para produção de mel, pólen, geléia real, apitoxinas e própolis em todo o mundo, enquanto que em Meliponina encontram-se as abelhas sociais sem ferrão, com diversos gêneros e espécies (SILVEIRA et al., 2002).

O *habitat* das abelhas *A. mellifera* é bastante diversificado e inclui florestas tropicais, savanas, regiões montanhosas e litorâneas. A grande variedade de vegetação e de clima acabou originando diversas subespécies ou raças de abelhas com diferentes características e adaptadas às diversas condições ambientais (PEREIRA et al., 2003).

As abelhas sociais sem ferrão da Sub-tribo Meliponina são criadas principalmente para produção de mel nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e são consideradas as principais responsáveis pela polinização das árvores nas florestas tropicais. Embora em menor produção, essas abelhas produzem a geoprópolis (mistura de própolis e barro) que é utilizada pelas comunidades rurais nessas regiões para diferentes fins (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; CARVALHO et al., 2003).

A introdução da espécie *A. mellifera* no Brasil é atribuída aos jesuítas que, no século XVIII, estabeleceram suas missões nos territórios que hoje fazem fronteira entre o Brasil e o Uruguai, no noroeste do Rio Grande do Sul. Essas abelhas provavelmente se espalharam pelas matas quando os jesuítas foram expulsos da região. Em 1839, o padre Antonio Carneiro Aureliano importou colméias de Portugal e instalou-as no Rio de Janeiro; em 1841, já havia mais de 200 colméias instaladas na Quinta Imperial. Em 1845, colonizadores trouxeram abelhas da Alemanha (*A. mellifera mellifera*) e iniciaram a apicultura nos estados do Sul. Entre 1870 e 1880, Frederico Hanemann trouxe abelhas italianas para o Rio Grande do Sul. Em 1895, o padre Amaro van Emelen trouxe abelhas da Itália (*A. mellifera ligustica*) para Pernambuco (ABELHAS, [2006?b]).

Em virtude da introdução de abelhas africanas por um cientista brasileiro, em 1956, com vistas ao melhoramento genético para a produção de mel, ocorreu um escape acidental de abelhas rainhas, o que ocasionou o processo de africanização das abelhas presentes no Brasil, resultando numa rápida e ampla substituição das abelhas européias pelas africanas. Hoje, as abelhas encontradas no Brasil são híbridas das abelhas européias (*A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica*, *A. mellifera caucasica* e *A. mellifera carnica*) com abelhas africanas *A. mellifera scutellata*. Atualmente, há uma predominância, no Sul do país, de abelhas com características européias, enquanto no Norte predominam as abelhas com características africanas (PEREIRA et al., 2003).

A grande maioria das abelhas não vive em colônias com rainha e operárias, pois são abelhas solitárias. Cada fêmea, individualmente, constrói e cuida do seu próprio ninho em ocos de árvores ou embaixo da terra. Já as abelhas sociais vivem juntas em grandes colônias de indivíduos, e seus ninhos são as colméias (SANTOS, 2002).

A colméia da *A. mellifera* é um sistema de extraordinária organização e chega a ser formada por cerca de 80.000 abelhas, constituída por uma única rainha, dezenas de zangões e milhares de operárias (A VIDA..., [2006?]).

A rainha é a personagem central e a mais importante, por ser responsável pela manutenção da harmonia dos trabalhos da colméia, bem como pela reprodução da espécie. A rainha é quase duas vezes maior do que as operárias, e sua única função, do ponto de vista biológico, é a postura de ovos, uma vez que é a única abelha feminina com capacidade de reprodução. O zangão é o macho da colméia, não possui ferrão e, por não possuir órgãos de trabalho, seu principal e único papel é fecundar a abelha rainha. Já a operária é responsável por todo o trabalho realizado no interior da colméia. São as abelhas operárias que se encarregam da higiene da colméia, garantem o alimento e a água de que a colônia necessita, coletando pólen e néctar, produzem a cera com a qual constroem os favos e cuidam da defesa da família. Além dessas atividades, as operárias ainda mantêm uma temperatura estável, entre 33°C e 36°C no interior da colméia, produzem e estocam o mel que assegura a alimentação da colônia, aquecem as larvas (crias) com o próprio corpo em dias frios e produzem a própolis (PEREIRA et al., 2003; A VIDA..., [2006?]).

2.2 PRÓPOLIS

Própolis é uma palavra grega que resulta da combinação dos elementos *pro-* ('defesa') e *polis* ('cidade'). Este produto, além de proteger a colméia de insetos invasores e microrganismos — no interior da colméia podem ser encontrados insetos em perfeito estado de conservação, envolvidos em própolis, graças à sua ação antimicrobiana —, é também empregado no reparo de frestas e danos à colméia e no preparo de locais assépticos para a postura da rainha (MARCUCCI, 1996).

A própolis é oriunda de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas em brotos, flores e exsudatos de plantas, as quais são acrescentadas enzimas salivares, principalmente a glicosidase, responsável pela hidrólise dos flavonóides glicosilados em agliconas (MOREIRA, 1986; PARK, et al., 1997; TORRES et al., 2000).

Conhecem-se duas teorias sobre a procedência da própolis elaborada pelas abelhas. Uma delas é a Teoria da Origem Interna ou Endógena, apresentada em 1907 pelos cientistas alemães Kustenmacher, Philip, Weck e outros, que defendem a idéia de que a própolis é um produto da digestão do pólen pelas abelhas, já que, em sua análise, são encontrados bálsamos e óleos de membranas de pólen. Essa teoria é a menos aceita, pois na composição da própolis deveriam estar presentes substâncias nitrogenadas, açúcares e lipídios encontrados no pólen. Além disso, os flavonóides encontrados estão em forma livre (agliconas) e não sob a forma de glicosídeos, como são geralmente encontrados nos vegetais, comprovando, assim, o efeito das enzimas salivares das abelhas sobre os glicosídeos das plantas. A outra é a Teoria da Origem Externa ou Exógena, apresentada por Rosch, Evenus, Berlepsch e outros, segundo a qual as abelhas retiram a resina da casca de certos vegetais como as gimnospermas (coníferas, pinheiros, araucárias) ou de brotos e gemas de angiospermas (abacateiro, ameixeira, eucalipto, vassoura e outras) e, através do ácido 10-hidroxidocenóico e de enzimas presentes nas suas secreções mandibulares, acrescentam pólen e cera, que, compactados, formam uma pasta resinosa. Essa teoria é a mais aceita, pois já se observou que, em lugares onde há muito pólen e poucas árvores, as abelhas praticamente não produzem própolis (VERÍSSIMO, 1991).

2.2.1 Própolis brasileira

Em países de clima temperado da Europa e América do Norte, a origem botânica da própolis é pouco variada. O choupo, do gênero *Populus L.*, da família das salicáceas é a sua principal fonte. Esta espécie vegetal ainda pode ser encontrada na Ásia e no norte da África. Ela não é natural dos trópicos (PARK, et al., 2000).

No Brasil, existem diversas espécies vegetais que se prestam à retirada da resina. Embora poucas tenham sido as espécies identificadas até agora, sabe-se que o assa-peixe, a aroeira, o alecrim e o eucalipto são alguns exemplos de vegetais em que as abelhas buscam a matéria-prima para a produção de própolis. Os efeitos terapêuticos da própolis têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos nela presentes, que estão largamente distribuídos no reino vegetal (MOURA, 2000).

Se, na própolis europeia, os flavonóides predominam entre as substâncias fenólicas, pesquisas recentes sugerem que, na própolis brasileira, os ácidos fenólicos são bem mais abundantes do que os flavonóides. Essa particularidade é um dos fatores responsáveis pela enorme preferência do mercado internacional pela própolis brasileira. Embora a concentração de flavonóides na própolis brasileira seja relativamente pequena, é possível quantificá-los e utilizar os valores obtidos como parâmetro para o controle da qualidade química (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, [2003?]).

Anteriormente, a própolis era classificada pela região em que era coletada. Constatou-se, porém, que própolis de um mesmo tipo, ou seja, com características químicas semelhantes, estariam presentes em locais diferentes. Diante a biodiversidade da vegetação brasileira, Park e colaboradores (2000) coletaram ao todo 500 amostras de diferentes regiões do Brasil. Após o processamento e a análise dessas amostras quanto à aparência, coloração dos extratos, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para detectar os tipos de

flavonóides presentes e outros compostos químicos, foi possível identificar e classificar 12 grupos distintos de própolis, de acordo com suas características químicas, cinco grupos encontradas na região Sul, seis grupos na região Nordeste e um grupo na região Sudeste (QUADRO 1). Este resultado sugere que existe uma maior diversidade de própolis nas regiões Sul e Nordeste do Brasil, na mesma proporção em que varia a vegetação dessas regiões. Neste estudo, também foram observados outros tipos de própolis que apareceram com menor frequência, coletadas em ambientes com vegetação muito particular, mas que não apresentaram propriedades biológicas, não tendo sido incluídos na referida classificação.

Grupos	Cor	Substâncias solúveis (%)	Origem
Grupo 1	amarelo	63,0	Rio Grande do Sul
Grupo 2	castanho claro	57,5	Rio Grande do Sul
Grupo 3	castanho escuro	65,0	Paraná
Grupo 4	castanho claro	54,5	Paraná
Grupo 5	marrom esverdeado	58,7	Paraná
Grupo 6	marrom avermelhado	45,9	Bahia
Grupo 7	marrom esverdeado	43,8	Bahia
Grupo 8	castanho escuro	41,3	Pernambuco
Grupo 9	amarelo	46,7	Pernambuco
Grupo 10	amarelo escuro	24,1	Ceará
Grupo 11	amarelo	23,1	Piauí
Grupo 12	verde ou marrom esverdeado	61,0	São Paulo

Quadro 1 - Classificação das própolis brasileiras

Fonte: PARK, et al., 2000.

Moura (2000) avaliou os aspectos físico-químicos e biológicos das própolis produzidas pelas abelhas da espécie *A. mellifera* no Nordeste do Brasil. Analisando a própolis da Mata Atlântica da Bahia (grupo 6), observou que possui compostos de características mais apolares, com perfil cromatográfico não encontrado em nenhuma própolis brasileira estudada até o momento.

Alencar (2002) também investigou quimicamente a própolis da região da Mata Atlântica da Bahia (grupo 6) e folhas de *Hyptis divaricata*, mencionada pela sua fonte botânica, mediante o uso das técnicas de cromatografia em camada delgada de alta eficácia fase reversa e cromatografia líquida de alta eficiência fase reversa. Concluiu que a composição dos compostos fenólicos encontrados nesse tipo de própolis possibilitou uma clara diferenciação dos outros grupos de própolis encontrados no Brasil. Além disso, a origem botânica desse tipo de própolis mostrou ser a espécie vegetal *H. divaricata*.

2.2.2 Características organolépticas

A própolis é uma substância rígida, quebradiça quando fria, que se torna dúctil e maleável quando aquecida. A depender da vegetação presente no local de extração pelas abelhas operárias, do tipo e do tempo de coleta, sua coloração pode ter tonalidades que variam entre marrom escuro, marrom avermelhado ou esverdeado. Possui ponto de fusão variável entre 60°C e 70°C, podendo atingir, em alguns casos, até 100°C (MARCUCCI, 1996). Aquecida em banho-maria, a própolis divide-se em duas partes bem distintas: uma viscosa, que se acumula e precipita no fundo do recipiente, e outra líquida (cera de própolis), que sobrenada e tem numerosas aplicações apícolas. A própolis é insolúvel em água fria, mas parcialmente solúvel por outros processos como, por exemplo, os de ebulição a refluxo. Ela é

em parte solúvel em acetona, álcool, amoníaco, benzina, clorofórmio e outros solventes orgânicos apolares (MARQUES, 1989).

O sabor da própolis é geralmente acre e, às vezes, amargo. O aroma tem tons balsâmicos agradáveis, algumas vezes adocicados à semelhança do mel, cera e outros produtos com odor e sabor de canela, baunilha etc. (DEBUYSER, 1983; MARQUES, 1989). Sua fragrância característica deve-se principalmente à presença de óleos essenciais, cujos tipos até hoje determinados somam cerca de 30. Destes, o acetato de linalina, o acetato de benzila e o acetil benzóico são óleos essenciais presentes no jasmim e na lavanda (MITAMURA et al., 1996).

2.2.3 Coleta, armazenagem, comércio, patentes e falsificação

Quando as abelhas são criadas em caixas de madeira, a coleta tradicional de própolis é feita raspando-se as partes da colméia, o que acarreta a adição de madeira e, às vezes, de tinta e pregos ao produto. Quando são utilizadas telas de plástico, são colocadas em *freezer*, a fim de que, com consistência mais dura, a própolis possa ser retirada mais facilmente (PAMPLONA, 1997).

Para ser armazenada, a própolis necessita ser limpa e selecionada, tarefa de extrema importância, uma vez que abelhas poderão se decompor com o decorrer do tempo, e pregos e tintas poderão contaminar o produto com metais pesados (PAMPLONA, 1997).

A própolis brasileira é considerada a de melhor qualidade, não contém agrotóxicos ou medicamentos e, mesmo com preço elevado, tem maior procura do que suas concorrentes oriundas da China, Austrália, Nova Zelândia e de alguns países da África, ou ainda da Rússia, Ucrânia, Argentina e do Uruguai. Com o aumento da procura de própolis,

alguns produtores começaram a falsificá-la, colocando grãos de milho ou pedrinhas para as abelhas cobrirem com resina (TEIXEIRA et al., 2005).

O mercado brasileiro de produtos apícolas está avaliado atualmente em US\$ 360 milhões anuais. As pesquisas demonstram um potencial de curto prazo para acima de US\$ 1 bilhão anual (O MERCADO, 2005). Estudos sobre a produção apícola no Brasil mostram dados contraditórios quanto ao número de apicultores e colméias, produção e produtividade. Quanto aos apicultores, as pesquisas apontam os extremos entre 26.315 e 300.000; esses produtores, juntos, possuem entre 1.315.790 e 2.500.000 colméias e um faturamento anual entre R\$84.740.000,00 e R\$506.250.000,00 (PEREIRA et al., 2003).

Uma verdadeira “febre” de patentes de própolis vem sendo observada. Desde a primeira patente (romena), em 1965, até 1999, já foram depositadas cerca de 240 patentes. Até o final da década de 80, essas patentes eram dominadas pela antiga URSS e seus países satélites, principalmente a Romênia. Hoje, 43% de todas as patentes depositadas são japonesas, a primeira delas tendo surgido somente em 1987 (sobre o uso de própolis no controle de odores). Em relação ao Brasil, a primeira patente, para o uso em tratamento odontológico na prevenção de cáries e gengivites, data somente de 1995, e o país possuía, até 1999, somente três patentes (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

2.2.4 Normas e qualidade

Em função de manter a utilização de álcool de qualidade para produção de extratos de própolis e a higiene e qualidade dos frascos dos produtos, foi criada, em janeiro de 1996, a Associação Brasileira de Própolis (ABP), que vem se encarregando da divulgação da

própolis nos mercados interno e externo e do estabelecimento de normas e padrões que assegurem a qualidade do produto (PAMPLONA, 1997).

Em 1995 e 1996, foram organizadas, pela Confederação Brasileira de Apicultura, duas reuniões para estabelecer normas de qualidade para a própolis *in natura* e para a tintura, pois, sendo a própolis um produto de origem animal, tem sido submetida às regras do Ministério da Agricultura (TEIXEIRA et al., 2005).

O Ministério da Agricultura regulamentou a identificação e a qualidade do extrato de própolis, produto proveniente da extração dos componentes solúveis da própolis em álcool neutro (grau alimentício), solução hidroalcoólica ou água por processo tecnológico adequado. Para que o extrato de própolis possa ser comercializado, é necessário que abranja os seguintes requisitos físico-químicos: mínimo de 11% de extrato seco de própolis, máximo de 1% de extrato seco de cera; mínimo de 0,25% de compostos flavonóides com provas qualitativas com picos característicos de flavonóides entre 200 e 400 nm no espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível; mínimo de 0,50% de compostos fenólicos, teor alcoólico de no máximo 70°GL, máximo de metanol de 0,40 mg/l (ADELMANN, 2005).

2.2.5 Composição química

A própolis consiste basicamente de resinas e bálsamos aromáticos (50%), cera (25% a 35%), óleos essenciais (10%), grãos de pólen (5%), além de minerais, vitaminas e compostos fenólicos e é considerada um dos produtos naturais de maior variedade em sua composição: mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras (MARCUCCI, 1995).

Em termos farmacológicos, sua principal classe de constituintes é a dos compostos fenólicos, principalmente flavonóides e ácidos fenólicos. Na própolis européia, os flavonóides (20% a 25%) predominam entre as substâncias fenólicas, ao passo que pesquisas recentes sugerem que, na própolis brasileira, os ácidos fenólicos são bem mais abundantes do que os flavonóides (MARCUCCI et al., 2001).

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente relacionadas com a sua composição química. Este é o principal obstáculo para o uso da própolis em fitoterapia, tendo em vista que a sua composição varia com a vegetação da região, época da coleta, técnica empregada, assim como com a espécie de abelha e o grau de africanização da *A. mellifera* no Brasil, fatores esses importantes para definir suas propriedades físicas, químicas e biológicas (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Na Europa, a própolis apresenta uma menor variação em sua composição, característica observada em regiões de zonas temperadas, e possui como fonte botânica exsudato de brotos de espécies de *Populus* e seus híbridos, rico em flavonóides (BANKOVA et al., 1995; TORRES et al., 2000). Já na própolis brasileira, constatam-se baixas concentrações de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, e altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas e alguns terpenóides específicos. No Brasil, ainda não foi possível identificar as diversas espécies de plantas visitadas pelas abelhas para retirada de resina, mas o alecrim do campo ou vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*), o pinheiro (*Pirus sp.*), a aroeira (*Schinus terebenthifolius*) e o eucalipto (*Eucalyptus sp.*) são alguns exemplos (PAMPLONA, 1997; ABELHAS, [2006?a]), porém, os tipos de compostos aromáticos e terpenóides encontrados na própolis têm uma importância biológica que permite a determinação das espécies vegetais visitadas pelas abelhas (MARCUCCI, 1996).

Vários grupos químicos são encontrados na composição heterogênea das própolis:

a) álcool (álcool cinâmico, gliceral, hidroquinona, isobuteno, feniletil álcool, álcool prenílico);

b) aldeído (benzaldeído, aldeído capróico, p-hidroxi benzaldeído, isovanilina, protocatechualdeído, vanilina);

c) ácidos e ésteres alifáticos (ácido acético, ácido angélico, ácido butírico, ácido crotonico, ácido funárico, ácido isobutírico, ácido metilbutírico, acetato de isobutila, acetato de isopentila);

d) aminoácidos (alanina, ácido aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, histidina, hidroxipolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina);

e) ácidos aromáticos (ácido p-anísico, ácido benzóico, ácido caféico, ácido cinâmico, ácido cunâmico, ácido 3,4-dimetoxicinâmico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido gentísico, ácido hidrocinâmico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido isoferúlico, ácido 4-metoxicinâmico, ácido protocatechuico, ácido salicílico, ácido vanílico, ácido verátrico);

f) ésteres aromáticos (acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, cumarato de benzila, 3,4-dimetoxicinamato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, benzoato de cinamila, cafeato de cinamila, cumarato de cinamila, isoferulato de cinamila, benzoato de etila, cafeato de etila, benzoato de metila, 2-metil-2-butenil cafeato, 2-metil-3-butenil cafeato, 3-metil-3-butenil cumarato, 2-metil-2-butenil ferulato, 3-metil-3-butenil ferulato, 2-metil-2-butenil isoferulato, 3-metil-3-butenil isoferulato, salicilato de metila, feniletil cafeato, feniletil cumarato, feniletil isoferulato, cafeato de pentila, cafeato de pentenila, ferulato de pentenila, cafeato de prenila, cumarato de prenila, ferulato de prenila, isoferulato de prenila);

g) chalconas e dihydrochalconas (alpenetrin chalcona, naringenin chalcona, pinobansin chalcona, pinobanksin 3-acetato chalcona, pinocembrim chalcona, sakuranetin chalcona, 2', 6', a-trihidroxi-4'-methoxi chalcona, 2' 6', dihidroxi-4'-metoxidihidro chalcona, 2', 4', 6'-trihidroxidihidro chalcona);

h) flavanonas (naringenin, pinobanksin,-3-acetato, pinobanksin-3-butirato, pinobansin-3-hexanoato, pinobanksin-3-metil. éter, pinobanksin-3-pentanoato, pinobanksin-3-propanoato, pinocembrina, pinostrobina, 3,7-dihidroxi-5-metoxiflavona, 2,5-dihidroxi-7-metoxiflavona);

i) flavonas e flavonóis (acacetina, apigenina, 7-metil-éter apigenina, crisina, fisetina, galangina, 3-metil-éter galangina, izalpinina, isoraminetina, canferídeo, canferol, 3-metil-éter canferol, 7-metil-éter canferol, 7-4'-dimetil éter canferol, pectolinarigenina, quercetina, 3,7-dimetil éter quercetina, raminetina, raminocitrina, tectocrisina, hidrocarbonetos, heneicosano, hentriacontano, heptacosano, hexacosano, ésteres nonacosano, pentacosano, tricosano, tripentacontano, compostos tritriacontano, dotriacontilhexadecanoato, dotriacontil-Z-hidroxilados e octadeca-9-enoato, hexacosilhexadecanoato, hexacosil-Z-carbonílicos octadeca-9-enoato, octacosilhexadecanoato, octacosil-Z-octadeca-9-enoato, tetratriacontil-hexadecanoato, tetratriacontil-Z-octadeca-9-enoato, tricontil-hexadecanoato, triacontil-Z-octadeca-9-enoato);

j) ácidos graxos (ácido araquídico, ácido behênico, ácido cerótico, ácido láurico, ácido linoléico, ácido lignocérico, ácido montânico, ácido mirístico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido esteárico);

l) cetonas (acetofenona, p-acetofenolacetofenona, dihidroxi-acetofenona, metilacetofenona, hept-5-em-2-ona, 6-metilcetona);

m) terpenóides e outros compostos (alfa-acetoxibetulenol, beta-bisabolol, 1,8 cineola, alfa-copaeno, cimeno, limoneno, pterostilbeno, stireno, naftaleno, 4-hexanolactano, álcool sesquiterpênico, sesquiterpeno diol);

n) esteróides (acetatos de estigmasterol e calinasterol);

o) açúcares (d-ribofuranose, d-frutose, d-glucitol, d-glucose, talose, sacarose exilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol, inositol);

p) lignanas (sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofuran);

q) vitaminas (A, B1, B2, B6, C e E);

r) minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, cádmio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, vanádio, silício, alumínio, níquel, zinco, cromo, titânio, prata, molibdênio, cobalto).

2.2.5.1 Compostos fenólicos

A principal classe de constituintes da própolis que possui ação farmacológica é a dos compostos fenólicos. Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas), eles são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e suscetíveis à ação de enzimas (KING; YOUNG, 1999).

Estruturalmente, os compostos fenólicos possuem em comum um anel aromático rodeado por um ou mais grupos hidroxila (FIGURA 1). A maioria é solúvel em água e ocorre sob a forma de glicosídeos (COMPOSTOS FENÓLICOS, [2006?]).

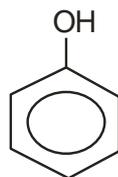


Figura 1 - Estrutura do composto fenólico simples ou ácido fênico

Fonte: MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, [2003?].

Os compostos fenólicos se originam a partir da via do ácido chiquímico, acumulam-se nos vacúolos das células vegetais e fazem parte de dois grandes grupos: os flavonóides e seus derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (SOARES, 2002; MARCUCCI, WOISKY; SALATINO, [2003?]; COMPOSTOS FENÓLICOS, [2006?]).

2.2.5.1.1 Flavonóides

Flavonóide é o nome que se dá a um grande grupo de fitoquímicos ou fitonutrientes que são polifenóis de baixo peso molecular encontrados em diversas plantas. Os seres humanos não possuem a capacidade de sintetizá-los.

Os flavonóides foram descobertos, em 1930, por Szent-György, que extraiu a cítrica da casca do limão, substância que possui a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Esta classe de produtos naturais foi inicialmente denominada vitamina P — de permeabilidade — e vitamina C₂ — algumas substâncias pertencentes a esta classe possuem propriedades semelhantes às da vitamina C —, porém esta classificação foi abandonada em 1950, tendo em vista a não confirmação destas substâncias como vitaminas (SILVA et al., 2000).

Os flavonóides são pigmentos presentes em todas as células fotossintetizadoras, encontrados em ervas, legumes, frutas, mel e, por conseqüência, em outros produtos derivados destes alimentos (HAVSTEEN, 1983, 2002; LOPES et al., 2003). As flavanonas ocorrem predominantemente em frutas cítricas, as flavonas em plantas utilizadas para condimentos, os isoflavonóides em legumes, as antocianinas e catequinas em frutas e os flavonóis em todas as frutas e vegetais (PETERSON; DWYER, 1998).

A função dos flavonóides nas plantas consiste em promover a defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros, atrair e orientar os insetos até o néctar, contribuindo enormemente para a polinização, e absorver a radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível, apresentando um papel de defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, [2003?]; FONTANA et al., 2004).

Apesar de o termo *flavonóide* derivar-se do latim *flavus*, que significa ‘amarelo’, observa-se que o grupo flavanona (ex. pinocembrina) é incolor, e que a classe das antocianinas possui substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul (LOPES et al., 2003).

Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C_{15}) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos $C_6-C_3-C_6$, em que os dois anéis C_6 são necessariamente aromáticos (anéis A e B) e conectados por uma ponte de três carbonos que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (LOPES et al., 2003) (FIGURA 2). Com exceção das chalconas, todos os flavonóides possuem um anel pirânico (com heteroátomo de oxigênio).

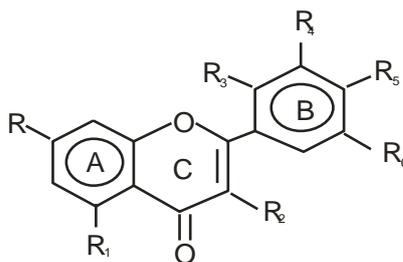


Figura 2 - Núcleo básico dos flavonóides composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)

Fonte: MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, [2003?].

Mais de 5.000 compostos flavonóides que ocorrem na natureza foram descritos e classificados a partir de sua estrutura química e se distribuem nos seguintes grupos: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas, podendo ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 1983).

As análises químicas de diversas própolis constatam em sua composição altas concentrações de flavonóides, que são responsáveis por promover no organismo dos animais quatro efeitos bioquímicos de destaque: ligação por afinidade em polímeros biológicos; ligação a íons de metais pesados; catálise de transporte de elétrons; e habilidade em seqüestrarem radicais livres. Estudos efetuados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os flavonóides possuem propriedades antioxidante e antiinflamatória, efeito vasodilatador, ação antialérgica, antitumoral, hepatoprotetora, antiúlcera, ações antiplaquetárias, bem como ações antimicrobianas e antivirais (LOPES et al., 2003).

Da diversidade de flavonóides presentes na flora, apenas alguns foram identificados na composição da própolis: o canferol, a quercetina, a isoramnetina e a galangina são flavonóis; a apigenina, a luteolina, a crisina e a tectocrisina são exemplos de

flavonas; a pinocembrina é uma flavanona e a pinobanksina é um diidroflavonol (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, [2003?]).

A maioria das propriedades farmacológicas da própolis é atribuída à presença dos flavonóides (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002), sendo cada tipo de flavonóide responsável por uma determinada propriedade:

- . ação antitumoral - quercetina, bicafeína, genisteína, tangeritina e soforanona; os flavonóides são capazes de induzir a apoptose (CHEN; WU; LIN, 2004);

- . ação antibacteriana - pinocembrina e galangina, possuindo também a pinocembrina atividade fungicida e funcionando como anestésico local (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983);

- . atividade espasmolítica - quercetina, canferide e pectolinarigenina (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983);

- . atividade antiinflamatória - acetina, galangina, que inibe a atividade da ciclooxigenase (COX) e da lipooxigenase, diminui a liberação de prostaglandina e da isoforma indutível da COX (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983; BORRELLI et al., 2002);

- . atividade antiúlcera - luteolina e apigenina (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983);

- . atividade virucida - quercetina, procianidina e pelargonidina (AMOROS et al., 1992);

- . ação antioxidante - os flavonóides minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres, pois interferem não apenas na propagação da reação, mas também na formação de radicais livres, tanto quelando os metais de transição, quanto pela inibição de enzimas envolvidas na inicialização da reação (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, [2003?]).

Já a catequina possui várias atividades biológicas, entre elas: diminuição do nível de triglicerídeos, inibição da síntese de prostaglandinas, atividade antiviral, antiinflamatória, antioxidante e anticoagulante (CHOI; YOKOZAWA; OURA, 1991).

2.2.5.1.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos, algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos, são derivados do ácido benzóico, constituídos por um núcleo básico hidroxifenilpropenóico, como demonstra a Figura 3, tipicamente C₆-C₁, incluindo o ácido salicílico, e derivados do ácido cinâmico, com estruturas C₆-C₃, geralmente esterificados com álcool etílico ou benzílico. Entre esses últimos sobressaem os ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico. Alguns ésteres do ácido caféico são alérgenos, responsabilizados pela ocorrência de dermatites em usuários mais sensíveis (PEREIRA et al., 2003).

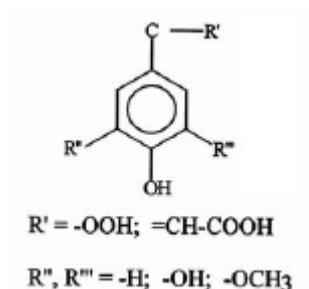


Figura 3 - Núcleo básico hidroxifenilpropenóico dos ácidos fenólicos

Fonte: MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, [2003?].

Alguns constituintes da própolis que demonstraram grande atividade antitumoral são os derivados do ácido caféico, flavonóides, ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromana-6-

propanóico, artepelin e ácido hidroxicleroda-3,(13Z)-dien-15-óico (BANSKOTA et al., 1998). O éster fenetílico do ácido caféico (CAPE) inibe vários processos associados à carcinogênese, suprimindo o crescimento de várias linhagens de células cancerígenas humanas, inclusive o carcinoma de cólon, glioblastoma multiforme, melanona, células de fibroblasto embrionárias transformadas pelo adenovírus, mas não têm ação sobre fibroblastos normais da pele humana. Células do carcinoma de cólon tratadas com CAPE também possuem uma inibição no aumento de síntese de DNA, RNA e proteínas (SU et al., 1994). Além da atividade anticancerígena, o CAPE possui atividade antiinflamatória por inibir a liberação do ácido araquidônico das membranas celulares, suprimir a atividade da COX-1 e COX-2 e inativar a expressão gênica da COX-2 (BORRELLI et al., 2002). Sua atividade vasorrelaxante também já foi demonstrada (CICALA et al., 2003).

2.2.6 Propriedades farmacológicas

2.2.6.1 Atividade antiinflamatória

Os processos inflamatórios estão associados a diversas doenças, e suas causas são variadas. Em trabalhos com camundongos e coelhos tem sido constatada uma atividade antiinflamatória de soluções hidroalcoólicas de própolis, tanto em aplicações tópicas, como através de injeções, ou mesmo via oral (IVANOVSKA et al., 1995; PARK, et al., 1996; LEDON et al., 1997; MENEZES; ALVAREZ; ALMEIDA, 1999; OZTURK et al., 2000). Alguns pesquisadores isolaram determinados compostos de própolis que apresentam conhecida atividade antiinflamatória.

No processo inflamatório, os metabólitos do ácido araquidônico exercem uma variedade de atividades biológicas. Vários estudos têm comprovado que os metabólitos da ciclooxigenase modulam a proliferação celular, o crescimento de tumores e respostas imunes, ao passo que os metabólitos da lipooxigenase podem influenciar várias respostas biológicas, inclusive quimiotaxia, secreção de hormônios, transporte de íons, estímulo de adesão de células tumorais, desenvolvimento de tumores e regulação do potencial metastático de células tumorais. Desse modo, vários estudos estabelecem os metabólitos do ácido araquidônico como moduladores da patogênese de várias doenças imunológicas e inflamatórias (RAO et al., 1995).

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos flavonóides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídios e a agregação de plaquetas, e de ativar sistemas de enzimas. Esses efeitos se devem à sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes. Além disso, os flavonóides possuem as propriedades de aumentar a permeabilidade capilar e exercem efeito inibitório na exsudação de proteínas e migração de leucócitos (BRODY, 1994).

Flavonóides como apigenina e quercetina exibem atividade antiinflamatória e apresentam inibição no crescimento de fibroblastos. Durante os processos inflamatórios, os fibroblastos têm um papel importante na granulação e formação do tecido e interação com o sistema imune. A inibição de crescimento de fibroblastos por flavonóides pode ser benéfica para o tratamento de injúrias (TATEFUJI et al., 1996).

Mirzoeva e Calder (1996) atribuíram esta propriedade antiinflamatória à presença na própolis de compostos tais como o ácido caféico, a quercetina, a narigenina e o éster fenetílico do ácido caféico (CAPE). Esta atividade antiinflamatória seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos. A participação do CAPE isolado da própolis na inibição da síntese de prostaglandinas foi também constatada

por Borrelli e colaboradores (2002). Além destes compostos, Krol, Schller e Czuba (1996) identificaram na própolis mais outros quinze compostos que conhecidamente apresentam esta atividade antiinflamatória, entre eles o ácido salicílico, a apigenina, o ácido felúrico e a galangina. A inibição na geração de óxido nítrico por macrófagos é também apontada como um dos fatores responsáveis pela atividade antiinflamatória da própolis (NAGAOKA et al., 2003). Outros estudos indicam um aumento na produção na produção de água oxigenada (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) por estas células (ORSI et al., 2000).

Quintana Diaz (1996) avaliou o efeito da própolis no tratamento de úlceras dolorosas bucais de pacientes que não fizeram uso de medicação e que já haviam sofrido destas afecções bucais anteriormente. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o tipo de solução aplicada: B1 - Propolina (veículo alcoólico); B2 - propodal (elaborado com propilenoglicol) e B3 - bálsamo (grupo controle). As soluções foram aplicadas com bolinhas de algodão estéril, sendo reaplicadas após 24 horas em todos os pacientes e 48 horas depois da primeira aplicação em pacientes com dor espontânea. Os pacientes dos grupos B1 e B2 apresentaram ausência de sintomatologia dolorosa 24 horas após a aplicação, e o grupo B3 só obteve a remissão dos sintomas no período de quatro a seis dias da primeira aplicação. Comprovou-se que a própolis possui efeitos antiinflamatórios, cicatrizantes, anestésicos, promovendo uma regressão mais rápida dos sintomas dolorosos.

Silva e colaboradores (2000) verificaram histologicamente a ação da solução de extrato alcoólico de própolis em feridas da mucosa bucal de ratos após a criação de lesão expondo o tecido conjuntivo subjacente. De acordo com o tratamento recebido, os ratos foram divididos em dois grupos: tratamento com álcool 96^oGL e solução alcoólica de própolis a 30%. Os grupos receberam curativos de seis em seis horas durante 3, 5, 10 e 14 dias, quando os animais foram sacrificados e as análises realizadas. Os resultados indicaram que a própolis não provoca ação inflamatória e induz a formação epitelial, ao contrário do que ocorreu com o

grupo controle. A própolis pode, assim, ser indicada para o tratamento e a reparação de feridas abertas por segunda intenção em mucosa bucal.

De acordo com Peruchi e colaboradores (2001), ao avaliar histologicamente a ação da solução do extrato alcoólico de própolis em feridas criadas, a própolis não provoca ação antiinflamatória dos tecidos conjuntivos, mas uma neoformação vascular e fibroplástica, induzindo a formação epitelial.

Alencar (2002) comprovou que a própolis brasileira atua na inibição da enzima hialuronidase, relacionada com a ação catalítica na hidrólise do ácido hialurônico, responsável pela liberação dos mediadores químicos, ou seja, pelo desencadeamento do processo inflamatório.

2.2.6.2 Atividade antineoplásica

A procura de novas drogas para o controle de neoplasias tem levado pesquisadores a isolar compostos contidos em amostras de própolis de diferentes procedências, pois alguns apresentam atividade inibitória no crescimento de diversos tipos de tumores (BANSKOTA et al., 1998; BURDOCK, 1998).

Mitamura (1996) constatou a atividade inibitória do PMS1, gene de reparação de mutações do DNA, sobre hepatocarcinoma humano. O efeito do PMS1 sobre neoplasia de pele sugeriu que esta atividade esteja relacionada com a inibição na síntese de DNA destas células. O CAPE isolado da própolis apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem de hepatocarcinoma humano (Hep3B), mas mostrou-se inócua quando adicionado a culturas primárias de hepatócito de camundongo.

Outro composto, a crisina, também isolada da própolis, mostrou-se efetiva em inibir o crescimento de culturas da linhagem de glioma C6 de rato; as células mantiveram-se estacionárias na primeira fase (G1) do ciclo celular (WENG; HO; LIN, 2005).

Orsolich, Kosalec e Basic (2005) isolaram compostos hidrossolúveis de própolis que, atuando sinergisticamente, potencializaram a atividade de drogas tumorocidas, inibindo assim o desenvolvimento de tumores acíticos de Ehrlich.

2.2.6.3 Atividade antioxidante

Considera-se um antioxidante biológico “qualquer substância que, presente em baixas concentrações, se comparada ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato” (BENZIE; STRAIN, 1996).

Aumentos nos níveis de radicais livres em nosso organismo podem desencadear processos patológicos, entre eles: doenças cardiovasculares, reumáticas, neurológicas, psiquiátricas; envelhecimento precoce; neoplasias; osteoporose; diabetes; inflamação (DEVASAGAYAN et al., 2004). Uma tendência que nos últimos anos vem se ampliando é a possibilidade do emprego de plantas contendo conhecidos polifenóis com propriedades antioxidantes para o controle e prevenção dessas patologias. Além dos polifenóis, a própolis contém uma extensa gama de outros compostos com a propriedade de remover de nosso organismo esses radicais livres em excesso (MARQUELE et al., 2005).

Espécies reativas de oxigênio potencialmente danosas são produzidas continuamente nas células como consequência tanto do metabolismo aeróbico normal (reações bioquímicas oxidativas) quanto por fatores externos (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002). Esses radicais livres são usualmente removidos ou inativados *in vivo* por enzimas

antioxidantes endógenas, como superóxido desmutase, peroxidase e compostos de baixo peso molecular como tocoferol, ácido ascórbico e polifenóis. Os antioxidantes de defesa têm a função de prevenir a geração de espécies reativas de oxigênio, a destruição de potenciais antioxidantes e a degradação das espécies reativas de oxigênio formadas. Dessa forma, os danos aos tecidos induzidos pelo estresse oxidativo são mínimos (BENZIE; STRAIN, 1996). De qualquer forma, as espécies reativas de oxigênio se tornam danosas quando são produzidas em excesso sob certas condições anormais, como inflamação, isquemia, e na presença de íons catalíticos.

Sob essas condições, os antioxidantes endógenos podem ser insuficientes para conter a formação dos radicais livres. Estas espécies reativas de oxigênio podem causar dano celular pela peroxidação de lipídios da membrana ou quebra de DNA (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002). Estes danos podem estar envolvidos na etiologia de várias doenças, como doença cardíaca coronária, inflamação, doenças neurodegenerativas, câncer e intoxicação por etanol (BENZIE; STRAIN, 1996; RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002). Assim sendo, a ingestão de antioxidantes através da dieta tem uma importante função na prevenção dessas doenças (VAN DEN BERG et al., 1999).

Diversos grupos de pesquisadores têm se referido à propriedade antioxidante da própolis, e muitos deles chegaram a isolar diversos compostos que seriam os responsáveis por esta propriedade (SU et al., 1994; BASNET; MATSUNO; NEIDLEIN, 1997; BANSKOTA et al., 1998; HAYASHI et al., 1999; CLAUS et al., 2000; MORENO et al., 2000). Estes pesquisadores são unânimes em atribuir aos flavonóides, principalmente ao CAPE, esta propriedade farmacológica.

Entretanto, Russo, Longo e Vanella (2002) constataram que extratos de própolis em que houve a remoção do CAPE continuaram a apresentar atividade antioxidante. O

seqüestro de radicais livres gerados por neutrófilos poderia ser um mecanismo antioxidante da própolis, que resultaria em uma atividade antiinflamatória final (MORENO et al., 2000).

2.2.6.4 Atividade antimicrobiana

A capacidade da própolis em inibir o crescimento de microrganismos é sua atividade farmacológica mais popularmente conhecida e cientificamente comprovada (POPOVA et al., 2004).

A atividade antibacteriana da própolis se deve principalmente a seus teores de flavonóides, que variam em decorrência da flora pesquisada. Há diversos tipos de flavonóides que possuem atividades farmacológicas diferentes, mas também são identificados flavonóides sem atividade terapêutica. A análise quantitativa de flavonóides totais não é suficiente para definir se uma amostra de própolis é melhor do que outra, pois o mais importante é analisar os diferentes tipos de flavonóides existentes e se possuem atividade antimicrobiana (KOO et al., 1999).

Dentre os flavonóides presentes na própolis destacam-se: quercetina, kaempferol, apigenina, isorhamnetina, rjamnetin, sakuranetina, isosakuranetina, chysin, acacetina, galangina, kaempferide (PARK, et al., 1997).

À vista da literatura pesquisada, observou-se que as bactérias G+ são mais sensíveis aos extratos de própolis do que as bactérias G-, sugerindo que a ação antibacteriana da própolis pode ser espécie-dependente. Os extratos de própolis atuam na inibição do crescimento e da divisão celular; quanto maior for a concentração do extrato de própolis,

maior será a ação antimicrobiana (BANKOVA et al., 1995; MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997; PARK, et al., 1998).

A quercetina, um tipo de flavonóide, e o CAPE são responsáveis pelo aumento de permeabilidade das membranas dos microrganismos e pela alteração no estado bioenergético da célula. Além disso, a quercetina, a naringenina, o ácido caféico e o CAPE possuem a capacidade de inibir a motilidade celular, fator importante para o potencial de virulência dos microrganismos (MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997).

Já foi comprovada a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis contra várias linhagens de bactérias Gram-positivas: *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Cellulomas funi*, *Nocardia globerula*, *Leuconostoe mesenteroides*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* e de bactérias Gram-negativas: *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes sp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Verificou-se que, de 39 linhagens de bactérias testadas, o crescimento de 25 delas foi inibido na presença de concentrações de própolis menores do que 100 µg/mL (MARCUCCI, 1996).

Observou-se que o óleo essencial extraído de três amostras de própolis (0,4 mg) coletadas por meliponíneos (*Melipona compressites*, *Tetragona clavipes* e *Melipona quadrifasciata*) possui uma fraca atividade frente à cepa 54 de *S. aureus* 209 e são inativas frente a *Escherichia coli* WF+. Utilizando-se uma amostra de própolis das Ilhas Canárias (0,4 mg) de elevado conteúdo de lignana do tipo furofurâmica, verificou-se uma atividade fraca da amostra contra os mesmos microrganismos (BANKOVA et al., 1999).

Grange e Davey (1990) observaram que os extratos etanólicos de própolis (EEP) (3 mg de sólidos totais/mL) inibiram completamente o crescimento de *S. aureus*, *S.*

epidermidis, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus*, inibiram parcialmente o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas não tiveram efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando, assim, uma inibição preferencial sobre cocos em detrimento de bacilos Gram-positivos. Além disso, constataram que uma diluição de 1:320 da amostra de própolis testada inibia totalmente a cepa de *Mycobacterium tuberculosis*.

Examinando-se o efeito de própolis provenientes da China e do Japão na cárie dental em ratos e seus efeitos inibitórios no crescimento bacteriano de *S. Sobrinus* 6715, *S. mutans* PS14, e *S. cricetus* OMZ61 (medidos através de halo de inibição) e na atividade das glucosiltransferases (GTFs) de *Streptococcus mutans*, foi demonstrado que estas própolis tiveram atividade antimicrobiana, inibiram a síntese de glucanos e inibiram parcialmente a atividade das GTFs. Houve também uma diminuição da cárie dental em ratos que receberam própolis presente na água em concentração de 1 mg/ml, sugerindo que a redução de cárie pela própolis depende não somente da ação antimicrobiana, mas também da inibição da síntese de glucanos insolúveis. Não houve efeito tóxico nos animais na concentração de própolis utilizada neste experimento (1 mg/ml) (IKENO et al., 1991).

Ferreira, Valente e Barbosa (1996) avaliaram a ação antibacteriana dos extratos alcoólicos de própolis após sofrerem diluições decimais de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000. Estes extratos foram colocados em contato com cepas bacterianas tipadas e padronizadas com aproximadamente 150 UFCs (unidades formadoras de colônia)/ml por um período de duas horas, sendo plaqueados a seguir pela técnica Pour Plate. Os resultados foram anotados por contagem de UFC/ml, comparados com o número inicial de UFCs/ml e indicaram atividade bacteriana dos extratos de própolis contra as bactérias Gram-positivas, Gram-positivas esporuladas, além de uma menor, mas não menos significativa, atividade contra bactérias Gram-negativas.

O efeito da própolis na irrigação de feridas cirúrgicas orais foi avaliado no já citado trabalho de Quintana Diaz (1996). Após intervenção cirúrgica (apicectomia, extrações múltiplas, exodontia de retidos, alveoloplastia e exodontia simples) seguindo-se as normas de assepsia e antissepsia no procedimento cirúrgico, 78 pacientes foram divididos em três grupos de acordo com o tipo de solução de irrigação da ferida: A1 - Propolina (veículo alcoólico); A2 - propodal (própolis preparada com propilenoglicol); e A3 - nenhum tratamento pós-cirúrgico (grupo controle). Os pacientes dos grupos A1 e A2 foram orientados a irrigar a ferida cirúrgica com seringa hipodérmica de 4 ml e foram acompanhados após 72 horas e após sete dias. Em ambas as ocasiões, foram realizados exame clínico e entrevista sobre o pós-operatório. Os resultados obtidos nesses pacientes mostraram que, em comparação com os pacientes do grupo A3, o sangramento pós-operatório foi menor. Depois de 72 horas, eles apresentaram menor edema no local da intervenção, melhor cicatrização e ausência de dor. O autor concluiu que os efeitos antimicrobianos, hemostáticos e antiinflamatórios das soluções à base de própolis utilizadas nesses dois grupos favoreceram uma recuperação melhor e mais rápida dos tecidos bucais envolvidos, se comparada com a do grupo controle.

O efeito da própolis na prevenção de cáries dentárias foi testado em 60 ratos machos da raça Wistar com 22 dias de idade, divididos em seis grupos: o grupo I recebeu dieta cariogênica e solução de própolis; o grupo II, ração triturada e água destilada; o grupo III, dieta cariogênica e solução de propilenoglicol (1%); o grupo IV, ração triturada e solução de propilenoglicol (1%); o grupo V, ração triturada e água destilada; e o grupo VI, dieta cariogênica e água destilada. O experimento durou 90 dias; os ratos foram sacrificados, tendo suas mandíbulas seccionadas, fixadas em formol a 10% e coradas em fucsina a 0,5%. A análise foi feita em microscópio estereoscópico. O grupo com maior número de cáries foi o grupo V, seguido pelos grupos III e I. O experimento confirmou a possível utilização de própolis para o controle de cáries (OTA et al., 1996).

Selecionando-se 12 voluntários com saúde bucal satisfatória, a quem foi aplicada diariamente a suspensão de própolis na concentração de 15 mg/ml, testou-se a atividade antibacteriana da própolis sobre *Streptococcus mutans*. Os voluntários fizeram dois bochechos diários com solução de própolis, pela manhã e à noite, após escovação dos dentes. Coletou-se saliva de cada um deles antes do início do experimento e após 7, 14, 21 e 28 dias. Como resultado, observou-se sensível diminuição desses microrganismos no sétimo e décimo quarto dias, concluindo-se que a solução de própolis sob a forma de bochecho pode ser utilizada para a redução de cáries por períodos não muito prolongados (MORAES et al., 1996).

Ota e colaboradores (1998) pesquisaram a atividade da própolis sobre bactérias recém-isoladas da cavidade bucal: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus sp*. As amostras foram semeadas em meios de cultura adequados a cada tipo de bactéria, contendo concentrações que variavam de 1 a 10 mg/ml. Os resultados mostraram atividade microbiana evidente sobre as bactérias citadas acima na seguinte ordem de sensibilidade: *S. mutans* > *Lactobacillus sp* > *S. aureus* > *S. epidermidis*.

A ação da própolis sob forma de bochechos foi testada em 17 pacientes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. No primeiro atendimento, os pacientes foram avaliados clinicamente de acordo com o índice proposto por Loe (classificação do estado clínico gengival: presença de inflamação, edema, ulceração, sangramento à sondagem e alteração de cor) e com o índice de placa e apresentaram saúde bucal satisfatória. Em seguida, foram submetidos a profilaxia sem orientação de higiene bucal. No segundo atendimento, após dez dias, os índices foram novamente levantados, tendo-se obtido índice de placa médio de 1,78 e índice gengival médio de 1,25. Foi-lhes então fornecida uma suspensão hidroalcoólica de própolis a 0,84% de concentração, e os pacientes foram orientados a bochechar a suspensão três vezes ao dia durante dez dias, após o que, quando levantados novos dados clínicos, foram constatados os índices médios de 1,35 e 1,15,

respectivamente. Aplicados os testes estatísticos, concluiu-se que, mesmo ocorrendo uma queda numérica, não houve modificação estatisticamente significativa no mecanismo de formação da placa nos sinais clínicos de gengivite (DUARTE; KFOURI, 1999).

Analisou-se o conteúdo de flavonóides agliconas da própolis da espécie *A. mellifera* coletada em duas regiões do Brasil (Minas Gerais e Rio Grande do Sul). Tendo as duas amostras apresentado composição química distinta, testou-se sua ação sobre o desenvolvimento de cáries em ratos dessalivados. Após 17 refeições diárias com própolis e ração, em intervalos de uma hora, foram observados menores índices de cárie de superfície e de sulco, bem como menor severidade de cárie no grupo de animais tratados com extrato da própolis coletada na região Sul, por possuir uma maior concentração de flavonóides do que a originária de Minas Gerais. O trabalho indicou que o efeito cariostático da própolis depende da sua composição e, conseqüentemente, da região em que a amostra é coletada (KOO et al., 1999).

Realizou-se um ensaio microbiológico para confirmar a eficácia da própolis contra microrganismos Gram-positivos, a partir do qual foi desenvolvido um dentifrício sob a forma de gel com 3% de própolis, com as seguintes propriedades: pH levemente ácido, baixa abrasividade, densidade, viscosidade e índice de espuma compatíveis com produtos do mercado. Esse dentifrício contendo própolis como agente terapêutico foi clinicamente testado em comparação com um dentifrício semelhante, porém sem própolis (placebo), em um ensaio duplo-cego envolvendo 60 adultos de ambos os sexos, com idades entre 15 e 73 anos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos. Os índices gengivais (IG) foram medidos em cada indivíduo nos tempos de 0, 15 e 30 dias, e os resultados demonstraram que o dentifrício com a própolis foi mais efetivo no controle do índice gengival do que aquele destituído do agente terapêutico, sendo uma alternativa viável como agente preventivo ou terapêutico da doença periodontal (PANZERI et al., 1999).

Analisou-se a ação antimicrobiana das própolis brasileiras classificadas por Park e colaboradores (2000) frente aos microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Com relação à atividade sobre *Staphylococcus aureus*, observou-se que a própolis do grupo 1 não inibiu o crescimento microbiano, e as própolis dos grupos 2, 9, 10 e 11 inibiram de forma bastante fraca; porém as própolis dos grupos 3, 4, 5, 8, e 12 inibiram moderadamente, ao passo que as dos grupos 6 e 7 inibiram fortemente o seu crescimento. Já em relação ao microrganismo *Streptococcus mutans*, a própolis do grupo 6 apresentou a maior atividade antimicrobiana, seguida da própolis do grupo 3, com atividade moderada, mas as demais amostras apresentaram atividade mínima ou não apresentaram atividade antimicrobiana contra este microrganismo (PARK, et al., 2000).

Utilizando-se própolis coletadas em duas regiões brasileiras, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, testou-se a ação do extrato etanólico de própolis contra a formação de glucosiltransferases (GTFs) de *Streptococcus sanguis* sobre: GTF B (sintetizada em glucano insolúvel), GTF C (em glucano solúvel e insolúvel) e GTF D (em glucano solúvel). A formação foi inibida quando aplicados extratos com concentrações entre 0,75 mg e 3,0 mg de própolis por mililitro. O extrato de própolis do Rio Grande do Sul demonstrou diferenças significativas em atividades de GTFs B e C, sendo superior ao extrato de Minas Gerais, que também mostrou um desempenho satisfatório (KOO et al., 2000).

Comparando-se amostras de própolis de abelhas africanas de Botucatu, São Paulo, coletadas durante as quatro estações climáticas, com a atividade antimicrobiana de uma solução hidroalcoólica de própolis a 30% contra *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, os resultados mostraram que esses microrganismos foram susceptíveis a pequenas concentrações de própolis, sendo o segundo deles ainda mais susceptível. Não houve diferença estatística em relação aos efeitos sazonais das concentrações de própolis testadas (SFORCIN et al., 2001).

Gebara, Lima e Mayer (2002) investigaram, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontopatogênicas, testando as cepas bacterianas *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. A concentração inibitória mínima foi determinada usando-se o método de diluição de extrato de própolis no meio de cultura em diferentes concentrações. Todos os patógenos periodontais testados foram sensíveis ao extrato de própolis, encorajando novos estudos para avaliar a utilização da própolis como um coadjuvante no tratamento periodontal.

Avaliando-se o efeito da própolis proveniente da região da Mata Atlântica da Bahia, Nordeste brasileiro, e de suas frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol) sobre o crescimento e a aderência de *Streptococcus mutans* e na atividade das glucosiltransferases (GTFs), esta nova variedade de própolis mostrou notáveis efeitos inibitórios tanto no crescimento bacteriano, quanto na aderência celular e atividade de GTF, atividade esta relacionada com os compostos apolares (DUARTE et al., 2003).

Kather e colaboradores (2003?) utilizaram algumas soluções de enxaguatórios bucais para controle químico da placa bacteriana, sendo duas em uso no mercado (Listerine e Periogard), e uma solução teste de Propolina a 20% (solução aquosa de própolis). Participaram da pesquisa alunos do quarto ano de Odontologia da Universidade de Taubaté (UNITAU), distribuídos em quatro grupos: grupo I - controle; grupo II - com uso de Listerine; grupo III - com Periogard; grupo IV - com Propolina a 20%. Todos os grupos foram submetidos a: alimentação padronizada; bochechos de três em três horas, iniciados de placa zero; e 24 horas sem escovação, utilizados apenas os bochechos. A evidenciação com solução líquida de Replac foi feita após 24 horas, e a contagem de superfícies coradas foi realizada pelo índice de O'Leary. Os resultados obtidos foram os que seguem: grupo I - $63,25 \cong 4,04$ (faces coradas); grupo II - $43,0 \cong 4,74$ (faces coradas); grupo III - $26,25 \cong 1,5$ (faces coradas);

e grupo VI - $27,25 \cong 3,11$ (faces coradas). Concluiu-se que as soluções mais eficientes foram Periogard e Propolina a 20%, tendo o Periogard apresentado um menor desvio padrão.

O efeito, em humanos, de uma solução de própolis adicionada de fluoreto de sódio (NaF) a 0,05% sobre níveis salivares de *Streptococcus mutans* foi analisado em comparação com o das soluções de NaF a 0,05% (controle) e NaF a 0,2%. Selecionaram-se 46 pacientes de 6 a 9 anos de idade com, no mínimo, três lesões de cárie ativa e níveis salivares de *Streptococcus mutans* superior a 10⁵ UFCs/ml de saliva. A concentração bacteriana mínima do extrato de própolis, determinada pelo método de diluição, foi de 2,5%. As crianças foram divididas em três grupos conforme os bochechos recomendados: grupo I - com NaF a 0,05% (controle); grupo II - com NaF a 0,2%; grupo III - com solução de própolis a 5% adicionada de NaF a 0,05%. Os bochechos foram diários por 15 dias e as contagens de *Streptococcus mutans* foram realizadas 24 horas, 7 e 15 dias após. Os testes de Fridman e Kruskal-Wallis revelaram, em relação aos valores iniciais, que houve diferença significativa ($p = 0,01$) nos níveis de *Streptococcus mutans* nas primeiras 24 horas após os bochechos apenas no grupo III. Quando comparados, o grupo III apresentou diferença significativa ($p = 0,01$) nos níveis de *Streptococcus mutans* em relação aos outros dois somente ao final do experimento. Tais resultados sugeriram que o uso de própolis como agente antimicrobiano pode reduzir os níveis salivares de *Streptococcus mutans* (ZARATE et al., 2000).

Comparou-se, *in vitro*, a ação antimicrobiana dos extratos de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), sálvia (*Salvia officinalis*) e própolis sobre a microbiota da placa dentária supragengival e saliva não estimulada de 25 indivíduos com periodontite crônica. As amostras de placa bacteriana e de saliva foram semeadas em placas de Petri com ágar-soja tripticaseína, e colocados discos embebidos com extratos de sálvia, cravo-da-índia e própolis nos meios de cultura, além de clorexidina a 0,12% (grupo controle positivo) e água destilada (grupo controle negativo). Os resultados demonstraram que as maiores médias de tamanho

dos halos de inibição foram obtidas com a clorexidina, seguida de própolis, cravo-da-índia e sálvia, tanto em placas semeadas com saliva, quanto semeadas com placa bacteriana. Além disso, a própolis demonstrou ter ação antimicrobiana significativamente maior sobre a microbiota da placa dentária supragengival do que sobre a microbiota da saliva (FIGUEIREDO et al., 2004).

Avaliou-se a ação de uma solução antisséptica de extrato de própolis sobre os índices de acúmulo de biofilme oral — índice de higiene oral simplificado (IHO-S) — e de doença gengival — índice gengival (IG) — e sobre a contagem do número de unidades formadoras de colônia em meio sólido, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) da atividade antimicrobiana de *S. mutans* em meio de cultura. A partir da CIM do extrato, foi confeccionada uma solução de própolis (6,25%) para bochecho e utilizada como solução teste em comparação com um controle positivo, com clorexidina (0,12%). Através de um ensaio clínico cruzado, quinze crianças utilizaram a solução de própolis em bochechos durante 15 dias consecutivos e, com intervalo de 21 dias, fizeram uso de bochechos com clorexidina. Foram avaliados o IHO-S e o IG antes e 24 horas após o uso das soluções; realizou-se a contagem de *S. mutans* de amostras da saliva antes e 24 horas, 7, 15 e 21 dias depois do final de ambos os bochechos. Os resultados demonstraram redução significativa do número de *S. mutans* nos tempos de 24 horas, 7 e 15 dias após o uso da solução de própolis, que não diferiu da obtida com a solução de clorexidina. Concluiu-se que a solução de extrato de própolis apresentou satisfatória atividade antimicrobiana, semelhante à ação da clorexidina, além de atuar sobre condições clínicas como a presença de biofilme oral e doença gengival (ALMEIDA et al., 2006).

Oppermann e Noradi (2006) avaliaram a capacidade de inibição da placa bacteriana supragengival, observada 24 horas após a aplicação de uma solução de própolis a 30% em álcool a 70° (solução 1) comparada com a de uma solução de álcool a 70% (solução

2) e em relação ao controle. A amostra experimental foi constituída por vinte voluntários acadêmicos de Odontologia. De um total de 2.272 superfícies dentárias, 1.439 constituíram as experimentais. Foram aplicados os seguintes agentes, intercalados por períodos de uma semana: solução hidroalcoólica de própolis a 30° (solução 1) e solução de álcool a 70° (solução 2); a um terceiro grupo não foi aplicada nenhuma solução (controle). Vinte e quatro horas após a aplicação dos agentes experimentais, as superfícies com placa corada foram registradas. De um total de 1.439 superfícies experimentais, 659 permaneceram não coradas 24 horas após o uso da solução 1, 301 após o uso da solução 2 e 251 no grupo controle. Os resultados demonstraram redução significativa da placa supragengival, tanto nas faces livres quanto proximais, após o uso da solução de própolis, em comparação com o uso da solução 2 e com o controle.

2.2.7 Toxicidade e alergia

Apesar da biodiversidade da vegetação e da falta de padronização na composição da própolis comercializada, pode-se afirmar que os extratos de própolis cujos principais constituintes são os flavonóides possuem uma toxicidade relativamente baixa. Alguns pesquisadores relataram que, utilizando-se 2.050 ratos, foi observada dose letal (DL50) superior a 7.340 mg/kg, e que gatos toleram a administração subcutânea de 100 mg/kg de extrato etéreo de própolis (BURDOCK, 1998).

Verificou-se ainda que soluções de própolis até 20% em acetona não causaram irritação em porcos-da-índia e que extratos de própolis aplicados puros e em pomadas não causaram irritação em coelhos. Outros experimentos demonstraram que extratos alcoólicos de própolis (1.875 a 2.470 mg/kg/dia) administrados na água de ratos e cobaias por 30 ou 60 dias

não demonstraram alterações em aparência clínica, comportamento, peso e mortalidade (BURDOCK, 1998).

Geralmente, as pessoas alérgicas a picadas de abelhas também são alérgicas a própolis, mel, geléia real e pólen, o que se deve à presença de secreções glandulares das abelhas nos produtos apícolas em forma de enzimas. Registre-se que apenas uma pessoa em cem é alérgica a picadas de abelhas (BREYER, 1980; BURDOCK, 1998).

Alguns autores relataram que os constituintes dos brotos de álamo são os possíveis responsáveis pelas alergias à própolis, principalmente derivados do ácido caféico (BURDOCK, 1998). A própolis pode induzir dermatites alérgicas e, segundo Hausen e colaboradores (1992), o principal alergênico é o cafeato de 3-metil-but-2-enil, composto responsável pela atividade antiviral de algumas própolis; o flavonóide tectocrisina foi considerado um segundo alérgeno, mas com atividade muito fraca. Além disso, foram observadas as propriedades alérgicas dos ésteres fenetílicos (CAPE) e prenílicos do ácido caféico (MARCUCCI, 1995).

Castro e Higashi (1995) afirmaram que a própolis possui toxicidade oral aguda baixa, depois de observarem que, em ratos que ingeriram solução de própolis por duas semanas, 60 dias e 90 dias, nenhum efeito colateral foi observado.

3 OBJETIVOS

O presente estudo tem os objetivos a seguir explicitados:

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de diferentes extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva total de humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar *in vitro*, através do consumo de glicose, a eficácia antisséptica de três extratos de própolis sobre os microrganismos presentes na saliva total de humanos, em comparação com os produtos industrializados Periogard, Listerine, Malvatricin e Parodontax.

Determinar *in vitro*, através do consumo de glicose, a eficácia antisséptica de três extratos de própolis sobre os microrganismos presentes na saliva total de humanos coletada em diferentes tempos de experimentação após o enxágüe com as soluções.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 **Hipótese**

Fase 1: ação antimicrobiana de antissépticos em oito níveis, sendo sete experimentais e um controle negativo.

Fase 2: ação antimicrobiana do extrato de própolis em quatro níveis, sendo três experimentais e um controle negativo.

4.1.2 **Variável de resposta**

Determinação das taxas residuais de glicose resultantes da atividade antisséptica de enxaguatórios sobre o metabolismo celular dos microrganismos presentes na saliva total de humanos a partir dos grupos experimentais, com base em grupos controles.

Os voluntários que integraram a amostragem foram aleatoriamente distribuídos por blocagem, caracterizando-se, assim, o estudo duplo-cego.

4.1.3 População da Amostra

Para a realização desta pesquisa de natureza experimental e laboratorial, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Climério de Oliveira, Universidade Federal da Bahia (UFBA) (ANEXO A), foram selecionados 10 doadores voluntários de saliva para a primeira fase e 30 doadores voluntários de saliva para a segunda fase, atendendo-se às exigências relativas às condições satisfatórias de saúde geral e, particularmente, de saúde bucal, ou seja: 1 - ausência de lesões de cárie e de periodontopatias; 2 - rigoroso controle de placa bacteriana e de possíveis sangramentos gengivais; 3 - ausência de aparelho ortodôntico; 4 - presença de, no mínimo, 24 dentes rigorosamente hígidos ou adequadamente tratados clinicamente; e 5 - velocidade de fluxo e de capacidade de tamponamento salivar normais.

A escolha de doadores recaiu sobre universitários do Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e da Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC), visando a assegurar o grau de cooperação necessário à realização das experimentações deste trabalho.

Após as experimentações, os voluntários receberam atendimento em consultório odontológico para execução de profilaxia oral e orientação quanto a higienização bucal, além de acompanhamento clínico após 15 dias.

4.2 PROCESSO DE OBTENÇÃO DA SALIVA

Uma vez selecionados, os voluntários foram devidamente informados sobre os objetivos e a metodologia traçados para a realização do presente trabalho e, após firmarem o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (ANEXO B), foram orientados a não realizar qualquer tipo de profilaxia oral a partir da última refeição realizada às 18h da noite que antecedeu a coleta da saliva, marcada para o turno da manhã de data previamente determinada. Para tanto, foi solicitada a suspensão do uso de fio dental, escova dental,

dentífrício, antisséptico ou outro instrumento de higiene oral. Essas orientações foram dadas aos doadores das duas fases do experimento, o que asseguraria a ausência de profilaxia oral durante o período de 12 a 14 horas.

A escolha desse espaço de tempo sem a realização da profilaxia oral rotineira teve a finalidade de permitir que se avaliasse a ação da própolis e dos produtos antissépticos industrializados em condições não habituais aos indivíduos que cuidam satisfatoriamente da higiene oral, uma vez que a concentração de microrganismos na saliva aumentaria sobremaneira (JORGE, 1998).

Os doadores compareceram ao Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA no horário predeterminado para a coleta das amostras de saliva em coletores plásticos esterilizados, devidamente acondicionados em banho de gelo moído, até o início das análises. Para esse procedimento, lhes foi solicitado, na primeira fase, que acumulassem a saliva no meio bucal e a coletassem no recipiente apropriado seguidas vezes, até alcançar o volume de, aproximadamente, 25 mL. Na segunda fase, solicitou-se que recolhessem 15 mL de saliva, fracionados, entretanto, em cinco coletas parciais de 3mL cada, de acordo com os tempos de ensaio predeterminados no protocolo experimental.

4.3 EQUIPAMENTOS

Equipamentos	Fabricante	Modelo
Fotocolorímetro microprocessado	Analyser	500 M
Balança analítica	Gehaka	AG 200
Estufa microbiológica	Fanem	002 CB
Potenciômetro digital	Digimed	DMPH-2
Microcomputador	Daten	Pentium IV

Quadro 2 - Equipamentos utilizados nas experimentações

4.4 ENXAGUATÓRIOS

Para a realização do presente estudo, foram avaliados os extratos de própolis I, II e III, frente à ação de quatro antissépticos disponíveis no mercado da cidade de Salvador, estado da Bahia (Periogard, Listerine, Malvatricin e Parodontax). O Quadro 3 expressa os produtos avaliados, respectivas procedências, princípios ativos e concentrações.

Enxaguatório	Registro	Fabricante	Princípio ativo informado	Concentração
Extrato de própolis I	Ministério da Agricultura Nº. 0001/4675	NaturApi Produtos Naturais e Apícolas Ltda.	Extrato seco de própolis do grupo 6, proveniente da Mata Atlântica da Bahia Compostos apolares*	11%
Extrato de própolis II	Ministério da Agricultura Nº. 0001/4675	Apis Flora Ind. e Com. Ltda.	Extrato seco de mistura de própolis proveniente dos estados de Minas Gerais e Paraná Flavonóides*	20%
Extrato de própolis III	Ministério da Agricultura Nº. 0063/1204	Vita Hervas Indústria Brasileira	Extrato seco de própolis proveniente da região Sudeste Flavonóides*	30%
Periogard	Ministério da Saúde Nº. 2.20520197	Colgate-Palmolive Divisão da Kolynos do Brasil Ltda.	Digluconato de clorexidina	0,12%
Listerine	Ministério da Saúde Nº. 2.232960003	Warner-Lambert Co. Morris Plains	Timol Eucaliptol Salicilato de metila Mentol	0,640% 0,092% 0,060% 0,042%
Malvatricin	Ministério da Saúde Nº. 101430024	Laboratório Daudt Oliveira Ltda.	Quinosal Tirotricina Tintura de malva	15 mg 1,50 mg 0,005 ml
Parodontax	Ministério da Saúde Nº. 2.00080172	Smithkline Beecham Consumer Healthcare Reino Unido	Gluconato de clorexidina	0,20%

Quadro 3 - Extratos de própolis e enxaguatórios

Nota: * = concentração não informada pelo fabricante.

A escolha do extrato de própolis a 11%, 20% e 30% deveu-se à constatação de serem essas as concentrações em que mais freqüentemente é comercializado esse produto na cidade de Salvador, Bahia.

4.5 TÉCNICA E MECANISMO DA REAÇÃO CORADA PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE GLICOSE

O método empregado para determinar a taxa de glicose tem como fundamentação o princípio da reação corada (GLICOSE ENZIMÁTICA, [2007?]), conforme as equações expressas a seguir:

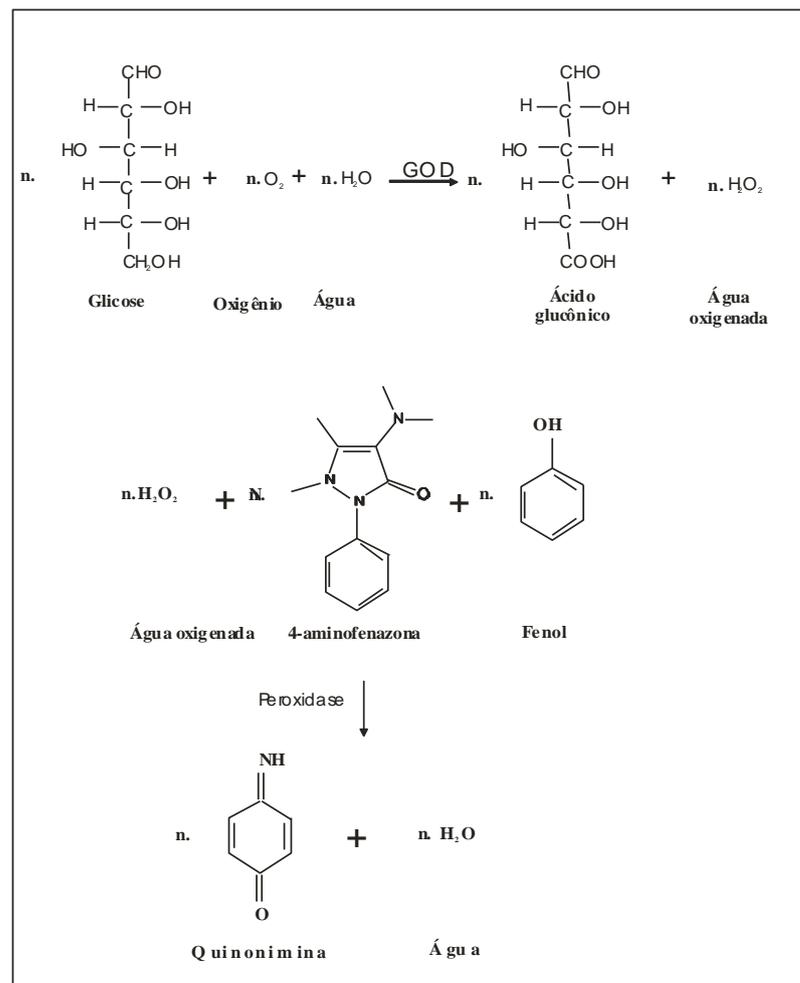


Figura 4 - Mecanismo da reação corada para determinação da concentração de glicose

Fonte: GLICOSE ENZIMÁTICA, [2007?].

Com base nesse método, a determinação da concentração inicial e residual de glicose fundamenta-se na reação colorimétrica resultante da oxidação enzimática desse carboidrato pela glicose-oxidase. O peróxido de hidrogênio formado reage sob a catálise da peroxidase com o fenol e o 4-aminofenazona, originando a quinonimina, que é um cromógeno vermelho-violeta. A intensidade de cor e, por conseguinte, a absorbância, foi determinada através de fotolorímetro microprocessado, marca Analyser, modelo 500M, no comprimento de onda de 520nm. Esse método colorimétrico empregado para a dosagem de glicose caracteriza-se pela possibilidade de a intensidade de cor obtida expressar, em densidade óptica (DO), valores em mg/dL diretamente proporcionais à concentração desse carboidrato presente em cada amostra, por tratar-se de uma dosagem linear limitada a 400 mg/dL. Ao se considerar que essa reação é linear, procedeu-se à aplicação da seguinte fórmula:

$$\frac{DOT}{DOP} \times 100 = \text{mg/dL}$$

DOT = densidade óptica do teste

DOP = densidade óptica da solução padrão de glicose

100 mg/dL = concentração da solução padrão de glicose

4.6 DETERMINAÇÃO DO FLUXO SALIVAR

Foi realizado o exame complementar para determinação do fluxo salivar de todos os participantes do presente estudo, tendo-se considerado como normal a velocidade do fluxo salivar entre 1 e 2 mL/min, com base na técnica preconizada por Krasse (1988).

4.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE TAMPONAMENTO DA SALIVA

Paralelamente, tomou-se como referencial a técnica de medida da capacidade de tamponamento salivar estabelecida por Krasse (1988), considerando-se como normal o pH final situado entre 5 e 7, determinado na saliva de todos os doadores selecionados.

4.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.8.1 Fase 1: ação antimicrobiana dos extratos de própolis I, II e III e de Periogard, Listerine, Malvatricin e Parodontax

Na primeira fase do estudo, realizada *in vitro*, tendo como fundamento o método de glicose-oxidase, o protocolo experimental foi elaborado com o objetivo de determinar o possível efeito antimicrobiano de diferentes extratos de própolis (I, II e III) em comparação com o dos enxaguatórios bucais contendo os princípios ativos clorexidina (Periogard e Parodontax), timol (Listerine) e tirotricina (Malvatricin).

Às amostras da saliva coletadas em jejum adicionou-se a solução de glicose a 25%, mantendo-se fixa a proporção de quatro partes de saliva total para uma da solução de glicose. A seguir, foram retiradas dessa mistura alíquotas de 4,0 mL para constituírem o grupo controle (GC₁) e os sete grupos experimentais, adicionando-se a esses últimos 0,25 mL de extrato de própolis I, II e III (GExp₁, GExp₂ e GExp₃, respectivamente) ou dos antissépticos Periogard, Listerine, Malvatricin e Parodontax (GExp₄, GExp₅, GExp₆ e GExp₇, respectivamente) (QUADRO 4). Findo esse procedimento, os grupos controle e experimentais

foram incubados a 37°C, durante 48 horas, em estufa microbiológica termorregulável, em aerobiose. Foram coletadas alíquotas para medição, pelo método de glicose-oxidase, do consumo de glicose pelos microrganismos presentes na saliva humana (GLICOSE ENZIMÁTICA, [2007?]), nos tempos de 0, 24 e 48 horas e expressos em mg/dL os valores encontrados.

Grupo	Número de amostras	Produto
GC ₁	10	—
GExp ₁	10	Extrato de própolis I
GExp ₂	10	Extrato de própolis II
GExp ₃	10	Extrato de própolis III
GExp ₄	10	Periogard
GExp ₅	10	Listerine
GExp ₆	10	Malvatricin
GExp ₇	10	Parodontax

Quadro 4 - Fase 1: Grupos controle e experimentais

4.8.2 Fase 2: ação antimicrobiana de extratos de própolis I, II e III em diferentes tempos de experimentação após o enxágüe

Na segunda fase, os extratos de própolis testados foram os mesmos utilizados na primeira fase do estudo, assim como foi avaliada a ação antimicrobiana através da dosagem de glicose pelo método já empregado.

O protocolo experimental elaborado para esta fase do estudo, realizada *in vitro*, manteve os mesmos referenciais utilizados na primeira fase e objetivou avaliar, particularmente, o efeito antimicrobiano residual após o enxágüe realizado com os extratos de própolis I, II e III.

As amostras de saliva dos voluntários foram coletadas em jejum, e, após a reserva de alíquotas desse fluido para a realização dos ensaios com o grupo controle negativo (GC₂), os doadores foram divididos em três grupos, de acordo com o extrato de própolis utilizado no enxágüe bucal.

A seguir, os voluntários realizaram o enxágüe durante um minuto, com o respectivo extrato de própolis diluído em água, de acordo com as normas de cada fabricante. Imediatamente após o enxágüe, foi coletada a segunda amostra de saliva (equivalente a um controle positivo), seguida de três coletas seqüenciais, uma, duas e três horas após o bochecho, cujas amostras constituíram os grupos experimentais aqui identificados como GExp_I, GExp_{II} e GExp_{III} de acordo com o extrato de própolis utilizado. O Quadro 5 expressa os grupos controle e experimentais com respectivos números de amostras e o extrato de própolis usado.

Grupo	Número de amostras	Produto
GC ₂	30	—
GExp _I	10	Extrato de própolis I
GExp _{II}	10	Extrato de própolis II
GExp _{III}	10	Extrato de própolis III

Quadro 5 - Fase 2: Grupos controle e experimentais

Tanto às amostras da saliva submetidas à ação das diferentes concentrações de própolis (GExp_I, GExp_{II} e GExp_{III}) quanto à amostra que constituiu o grupo controle (GC₂) foi adicionada a solução de glicose a 25% na mesma proporção estabelecida na primeira fase, seguindo-se a imediata reserva de alíquotas de cada grupo para a determinação da taxa de glicose residual no tempo zero de experimentação. Novas dosagens de glicose residual foram realizadas em alíquotas retiradas dos grupos controle e experimentais após 24 e 48 horas de incubação a 37°C.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados das experimentações são aqui apresentados através das respectivas médias e erros padrões das médias (EPM). As médias dos diversos grupos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguindo-se a aplicação do teste paramétrico de Bonferroni.

5 RESULTADOS

Uma vez cumpridas as condições exigidas para a seleção dos voluntários, todos foram submetidos ao exame salivar. Os resultados obtidos confirmaram o controle rigoroso da amostra, já que os doadores de saliva apresentaram média de fluxo considerada normal, isto é, de $1,8 \pm 0,3$ mL/min, assim como foi considerada satisfatória a capacidade de tamponamento salivar, pois sua média se situou em $5,8 \pm 0,2$, atendendo-se ao estabelecido por Krasse (1988).

Os resultados das experimentações são aqui apresentados através de médias e erros padrões das médias (EPM). Às médias dos diversos grupos, comparadas através da análise da variância (ANOVA) de medidas repetidas, seguiu-se a aplicação do teste paramétrico de Bonferroni.

5.1 FASE 1: AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS I, II e III E DE PERIOGARD, LISTERINE, MALVATRICIN E PARODONTAX

De acordo com o protocolo experimental, avaliou-se, na primeira fase do presente trabalho, a eficácia dos extratos de própolis I, II e III em comparação com a ação dos produtos industrializados Periogard, Listerine, Malvatricin e Parodontax.

Diante dos resultados obtidos nessa fase, ao serem comparadas as taxas residuais de glicose correspondentes ao grupo controle (GC₁) — no qual não houve adição de enxaguatório algum —, no tempo zero de incubação a 37°C e nos intervalos limitados a 24 e

48 horas, constatou-se ter havido diferença estatisticamente significativa, uma vez cumpridos esses espaços de tempo, conforme os dados da Tabela 1 e da Figura 5.

Nos grupos experimentais (GExp₁, GExp₂, GExp₃, GExp₄, GExp₅, GExp₆ e GExp₇), ao serem confrontados os valores médios das taxas residuais de glicose determinados nos tempos de 0, 24 e 48 horas, não foram comprovadas diferenças estatisticamente significativas, de acordo com os valores registrados nas mencionadas Tabela 1 e Figura 5.

Tabela 1 - Fase 1: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) referentes aos grupos controle e experimentais nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação

Grupo	T e m p o		
	0h	24h	48h
GC ₁	253,4 ± 6,10	222,3 ± 4,18*	205,9 ± 4,80*
GExp ₁	271,0 ± 9,18	270,2 ± 9,54	269,3 ± 8,24
GExp ₂	264,5 ± 3,43	257,9 ± 3,54	232,7 ± 5,98
GExp ₃	240,7 ± 3,73	246,4 ± 6,18	221,2 ± 6,20
GExp ₄	267,5 ± 11,36	251,9 ± 14,27	248,0 ± 8,21
GExp ₅	252,5 ± 14,88	240,9 ± 13,79	240,0 ± 7,26
GExp ₆	260,4 ± 12,38	251,5 ± 12,99	248,2 ± 10,17
GExp ₇	247,1 ± 14,36	242,8 ± 14,87	243,9 ± 12,33

Notas: GC₁: grupo controle; GExp₁: extrato de própolis I; GExp₂: extrato de própolis II; GExp₃: extrato de própolis III; GExp₄: Periogard; GExp₅: Listerine; GExp₆: Malvatricin; GExp₇: Parodontax; * = diferença estatística significativa entre as taxas de glicose determinadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

Valor de $p < 0,05$.

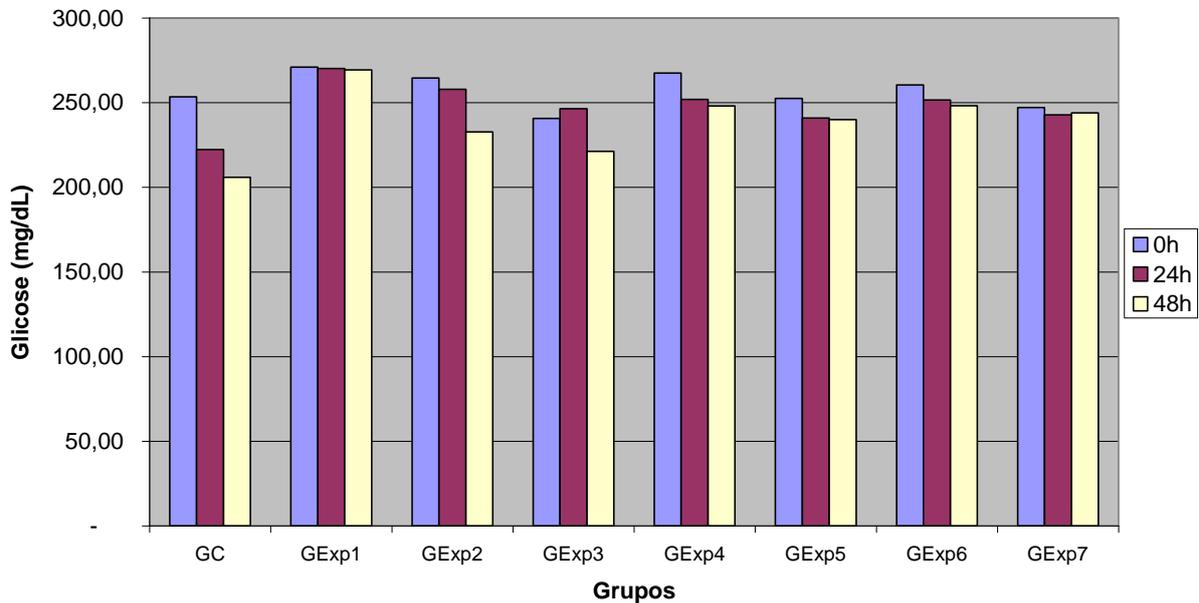


Figura 5 - Fase 1: Médias do consumo de glicose (mg/dL) referentes aos grupos controle e experimentais nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação

5.2 FASE 2: AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS I, II e III EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPERIMENTAÇÃO APÓS O ENXÁGÜE

Na segunda fase do trabalho, avaliou-se a eficácia dos extratos de própolis I, II e III frente aos microrganismos presentes na saliva total de humanos.

Nas amostras que constituíram o grupo controle (GC_2), caracterizadas pela saliva coletada sem qualquer ação dos mencionados extratos de própolis, observou-se que houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias das taxas residuais de glicose atribuídas a esse grupo após 24 e 48 horas, conforme está demonstrado na Tabela 2.

Entretanto, ao serem comparadas entre si as taxas de glicose referentes aos grupos experimentais (GExp_I, GExp_{II} e GExp_{III}) cujas amostras de saliva foram coletadas imediatamente após o bochecho com os referidos extratos de própolis, não se constataram diferenças estatisticamente significativas em cada um dos tempos referenciais de experimentação após o enxágüe, ou seja, com 24 e 48 horas, respectivamente (TABELA 2; FIGURA 6).

Tabela 2 - Fase 2: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) referentes aos grupos experimentais nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação imediatamente após o enxágüe com os extratos de própolis tendo como referencial o grupo controle

Grupo	T e m p o		
	0h	24h	48h
GC ₂	128,8 ± 1,22	110,6 ± 1,32*	97,0 ± 1,32*
GExp _I	128,8 ± 1,90	129,6 ± 1,45	113,5 ± 5,55
GExp _{II}	128,8 ± 2,52	125,4 ± 3,33	124,2 ± 3,47
GExp _{III}	126,8 ± 1,05	131,4 ± 3,41	113,4 ± 3,13

Notas: GC₂ = saliva coletada em jejum com adição de glicose a 25%; GExp_I = saliva coletada imediatamente após o enxágüe com extrato de própolis I com adição de glicose a 25%; GExp_{II} = saliva coletada imediatamente após o enxágüe com extrato de própolis II com adição de glicose a 25%; GExp_{III} = saliva coletada imediatamente após o enxágüe com extrato de própolis a III com adição de glicose a 25%; * = diferença estatística significativa entre as taxas de glicose determinadas nos tempos de 0 e 24 horas e 24 e 48 horas.

Valor de $p < 0,05$.

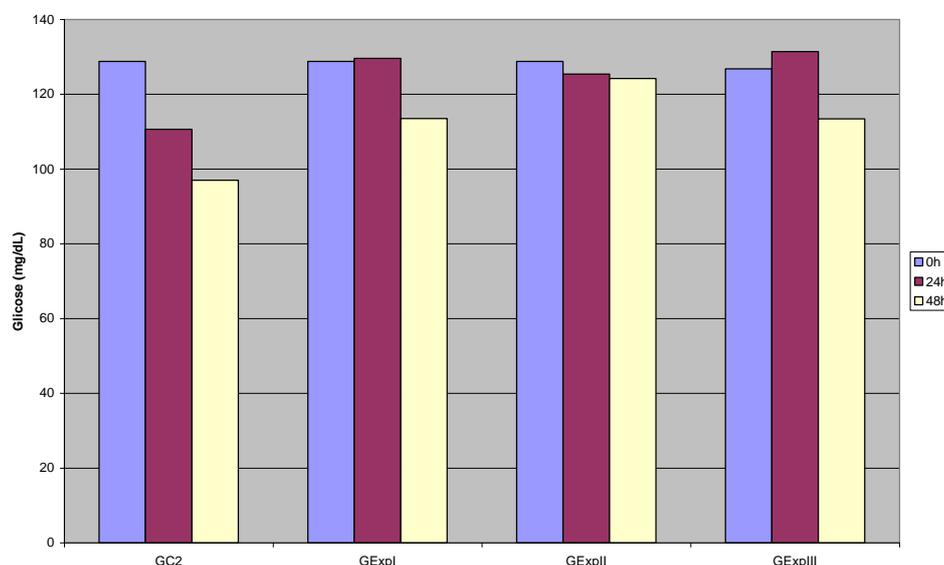


Figura 6 - Fase 2: Médias do consumo de glicose (mg/dL) referentes aos grupos experimentais nos tempos de 0, 24 e 48 horas de incubação imediatamente após o enxágüe com os extratos de própolis tendo como referencial o grupo controle

No GExpl_I, ao serem confrontados os valores médios das taxas residuais de glicose correspondentes às amostras de saliva coletadas uma e duas horas após o bochecho, nos tempos referenciais de 0, 24 e 48 horas, não foram comprovadas diferenças estatisticamente significativas entre os citados tempos de incubação dentro do mesmo horário de coleta. Porém, ao serem comparadas entre si as médias das taxas residuais de glicose obtidas nos tempos de 24 e 48 horas e 0 e 48 horas nas amostras de saliva coletadas três horas após o enxágüe, evidenciaram-se significativas diferenças estatísticas referentes a esse grupo (TABELA 3; FIGURA 7).

Tabela 3 - Fase 2: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp_{11%} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe

Coleta	D o s a g e m		
	0h	24h	48h
0h	128,8 ± 1,90	129,6 ± 1,45	113,5 ± 5,55
1h	129,9 ± 2,59	131,3 ± 1,82	114,6 ± 5,68
2h	129,1 ± 3,02	131,7 ± 2,55	110,9 ± 6,31
3h	129,0 ± 2,80	129,2 ± 1,76	105,4 ± 4,04**

Notas: 0h, 1h, 2h, 3h = hora da coleta de saliva após o bochecho com extrato de própolis; 0h, 24h, 48h = tempo de incubação e dosagem de glicose; ** = diferença estatística significativa entre as taxas de glicose determinadas nos tempos de 24 e 48 horas e 0 e 48 horas.

Valor de $p < 0,05$.

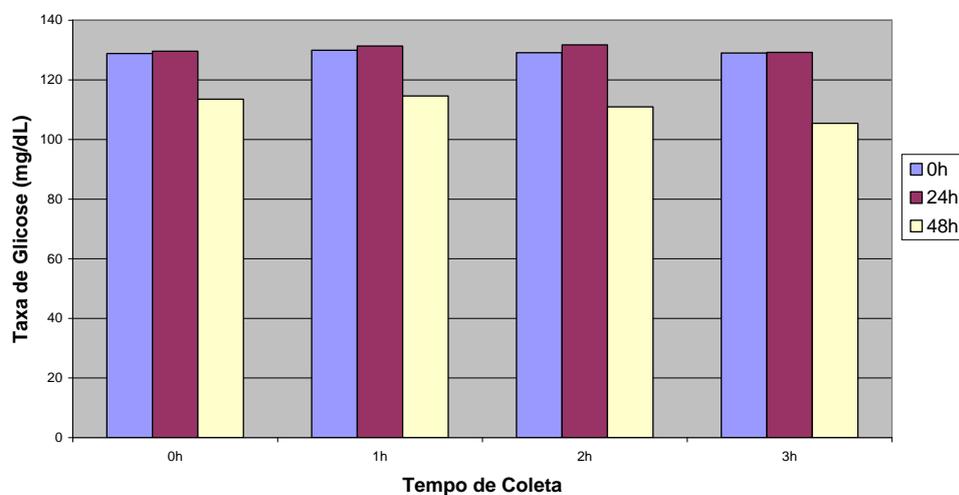


Figura 7 - Fase 2: Médias do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp_I nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe

No tocante aos outros dois grupos experimentais (GExp_{II} e GExp_{III}), em relação às amostras da saliva coletadas com uma, duas e três horas após o bochecho, ao se confrontarem as taxas residuais de glicose determinadas entre 0 e 24 horas e entre 24 e 48 horas, não se

constatarem diferenças estatisticamente significativas. Entretanto, ao serem comparadas as taxas de glicose determinadas nos tempos de 0 e 48 horas ficou evidenciado que houve redução da concentração de glicose, como demonstram as Tabelas 4 e 5 e as Figuras 8 e 9.

Tabela 4 - Fase 2: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExpII nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe

Coleta	D o s a g e m		
	0h	24h	48h
0h	128,8 ± 2,52	125,4 ± 3,33	124,2 ± 3,47
1h	128,6 ± 2,50	115,2 ± 5,24	105,5 ± 7,12*
2h	128,1 ± 2,21	115,5 ± 4,98	107,6 ± 6,38*
3h	126,8 ± 2,14	114,1 ± 4,57	102,8 ± 4,79*

Notas: 0h, 1h, 2h, 3h = hora da coleta de saliva após o bochecho com extrato de própolis; 0h, 24h, 48h = tempo de incubação e dosagem de glicose; * = diferença estatística significativa entre as taxas de glicose determinadas nos tempos de 0 e 48 horas.

Valor de $p < 0,05$.

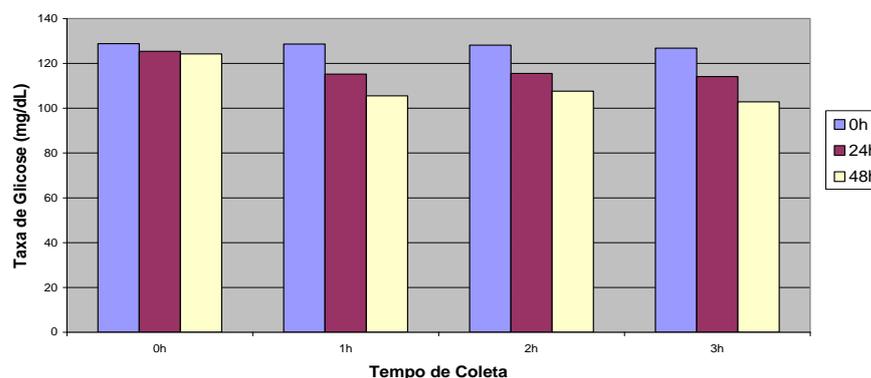


Figura 8 - Fase 2: Médias do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExpII nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe

Tabela 5 - Fase 2: Médias e EPMs do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp_{III} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe

Coleta	D o s a g e m		
	0h	24h	48h
0h	126,8 ± 1,05	131,4 ± 3,41	113,4 ± 3,13
1h	128,4 ± 1,59	129,5 ± 1,23	107,5 ± 4,44*
2h	126,6 ± 1,32	129,4 ± 1,63	111,2 ± 3,64*
3h	127,5 ± 1,30	126,7 ± 1,25	106,5 ± 2,28*

Notas: 0h, 1h, 2h, 3h = hora da coleta de saliva após o bochecho com extrato de própolis; 0h, 24h, 48h = tempo de incubação e dosagem de glicose; * = diferença estatística significativa entre as taxas de glicose determinadas nos tempos de 0 e 48 horas.

Valor de $p < 0,05$.

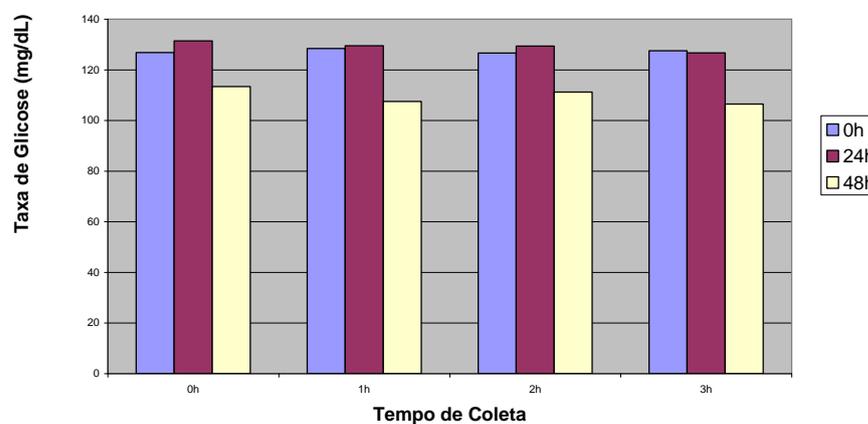


Figura 9 - Fase 2: Médias do consumo de glicose (mg/dL) pelos microrganismos presentes na saliva do GExp_{III} nos tempos de zero, uma, duas e três horas após o enxágüe

6 DISCUSSÃO

Os estudos realizados através de observações clínicas e experimentais visando a investigar a eficácia dos antissépticos exigem a adoção de medidas complementares, dentre as quais se destacam, entre outros procedimentos: determinação dos índices de placa, de sangramento, de retenção e de inserção clínica; medida da velocidade do fluxo salivar e da capacidade de tamponamento da saliva e/ou realização da contagem de microrganismos.

O grau de saúde bucal, as taxas de fluxo salivar e a capacidade de tamponamento da saliva dos voluntários envolvidos no presente estudo foram considerados normais, de acordo com os resultados aqui registrados. A seleção de indivíduos com saúde geral e bucal satisfatórias visou a padronizar as amostras de saliva, visto que os pacientes portadores de cáries, gengivite, periodontite ou outras enfermidades infecciosas poderiam dificultar a exigência de similaridade entre os partícipes integrantes da amostra, em razão da influência do estágio de desenvolvimento dessas doenças.

Muito embora mereçam destaque as diferentes metodologias utilizadas nos trabalhos experimentais realizados por diversos pesquisadores, entre os quais os de Giertsen, Scheie e Rolla (1988), que tratam da inibição do metabolismo glicolítico dos microrganismos da placa bacteriana, optou-se pelo desenho de um protocolo experimental simplificado, o mais próximo possível da realidade vivida pelos usuários dos produtos antissépticos, particularmente na segunda fase do trabalho, traçado, exclusivamente, para a realização do presente estudo. Essa opção decorreu de não se ter identificado protocolos bioquímicos experimentais que atendessem, plenamente, às condições previamente estabelecidas para a realização dos ensaios, em que pese a extensa revisão bibliográfica realizada.

Esta foi a principal razão de se ter levado em conta a cooperação do paciente no que diz respeito à higiene bucal e ao estado de hígidez em geral, uma vez que esses fatores

podem ocasionar diferenças significativas na concentração e virulência dos microrganismos. Além disso, a seleção de pacientes com o mínimo de 24 unidades dentárias visou a assegurar uma concentração satisfatória de microrganismos presentes na cavidade bucal, pois a oscilação no número de unidades dentais presentes interfere de forma marcante na microbiota bucal, já que os microrganismos necessitam de superfícies de retenção para se manterem nas estruturas da cavidade oral. Segundo Jorge (1998), o número de unidades dentais implica na concentração de lactobacilos e estreptococos, cuja tendência é a diminuição ou, até mesmo, o desaparecimento, quando as mesmas são extraídas.

A determinação do poder de inibição do consumo de glicose pelos microrganismos presentes na saliva humana total, submetida, após a coleta, à ação individual dos extratos de própolis e dos antissépticos, objetos da primeira fase da pesquisa, teve como referencial o grupo controle (GC₁), caracterizado pela ausência de um dos extratos de própolis ou um dos antissépticos testados. Objetivando revelar o possível poder inibidor dessas substâncias, foi desenvolvida uma metodologia experimental *in vitro*, cujos resultados possivelmente contribuirão para subsidiar a literatura científica, dado que os protocolos desenhados em diversos estudos têm contemplado, prioritariamente, as observações e experimentações de natureza clínica.

Conforme está amplamente documentado na literatura científica, os microrganismos utilizam a glicose para a manutenção de diversos processos metabólicos vitais. Um importante mecanismo é a via glicolítica, cujo principal objetivo é a obtenção de energia, além da colonização e aderência aos tecidos da cavidade bucal, produzindo-se, a partir do piruvato formado, ácidos, dentre os quais o lático, responsáveis pela desmineralização do esmalte dental, particularmente nas fases de subsaturação iônica da saliva (SMITH et al, 1985; NIKIFORUK, 1986; THYLSTRUP, FEJERSKOV, 1995; NELSON; COX, 2002).

Levando-se em conta essas informações, o traçado do protocolo experimental tomou como referência o consumo de glicose pelos microrganismos presentes na saliva total, influenciada, ou não, pelos antissépticos, mediante a determinação das taxas residuais de glicose, com base na técnica enzimática de relevante precisão, fundamentada na atividade catalítica da glicose-oxidase, devidamente descrita no item 4 deste trabalho.

Nos diferentes tempos de experimentação, constatou-se, no grupo controle da primeira fase (GC_1), diferença estatisticamente significativa em relação às taxas de glicose determinadas nos tempos de 0 ($253,4 \pm 6,10$), 24 ($222,3 \pm 4,18$) e 48 horas ($205,9 \pm 4,80$) de incubação a 37°C . Esse decréscimo da taxa de glicose com o decorrer do tempo de incubação resultou certamente do consumo desse substrato pelos microrganismos presentes na saliva de humanos, o que comprova a confiabilidade da metodologia adotada no presente estudo.

As taxas de glicose determinadas nos grupos experimentais da primeira fase (G_{Exp1} , G_{Exp2} , G_{Exp3} , G_{Exp4} , G_{Exp5} , G_{Exp6} e G_{Exp7}), conforme está registrado na Tabela 1 e na Figura 5, não revelaram diferenças estatisticamente significativas ao serem comparadas entre si nos três tempos de dosagem de glicose, ou seja, 0, 24 e 48 horas. Esses resultados indicam claramente que não houve consumo de glicose nos grupos experimentais nessa fase 1, face à presença tanto dos extratos de própolis I, II e III estudados, como dos antissépticos utilizados (Periogard, Listerine, Malvaticin e Parodontax), sugerindo, assim, um idêntico efeito antimicrobiano dos mesmos.

No tocante à ação dos enxaguatórios bucais à base de própolis, a análise dos resultados dos grupos experimentais da primeira fase, indicando não ter havido consumo algum de glicose, confirma que esse produto possui ação antimicrobiana contra os patógenos bucais (IKENO et al., 1991; MORAES et al., 1996; OTA et al., 1996; PAMPLONA, 1997; OTA et al., 1998; KOO et al., 1999). Os resultados obtidos estão, portanto, de acordo com os trabalhos que apontam a ação antimicrobiana da própolis sobre a microbiota bucal, *in vitro*,

representada, particularmente, pelos microrganismos *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus cricetus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus sp*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (IKENO et al., 1991; MARCUCCI, 1996; MORAES et al., 1996; OTA et al., 1998; PARK, et al., 2000; ZARATE et al., 2000; SFORCIN et al., 2001; GEBARA; LIMA; MAYER, 2002; DUARTE et al., 2003). Há que se ter em conta que, ao inibir a atividade da glicosiltransferase, a própolis tem propriedade antibacteriana, comprometendo a biossíntese dos glucanos, conforme referem diversos pesquisadores (OTA et al., 1998; PARK, et al., 1998; KOO et al., 2000). Além disso, alguns flavonóides e o CAPE são compostos fenólicos que possuem a capacidade de inibir o crescimento e a divisão celular, aumentar a permeabilidade da membrana e interferir na motilidade dos microrganismos (MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997).

O fato de as propriedades biológicas da própolis estarem diretamente relacionadas com a sua composição química, que varia com o tipo de vegetação da região, a época da coleta, a técnica empregada, a espécie de abelha e o grau de africanização da *A. mellifera* no Brasil, induz a se admitir que a ação antimicrobiana esteja intimamente relacionada com a concentração e os tipos de flavonóides, o CAPE, e mais especificamente em se tratando da própolis do grupo 6 (Mata Atlântica), a qual possui relevante concentração de compostos apolares (SFORCIN et al., 2001; PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002).

Ao se analisarem os resultados obtidos em dois grupos experimentais (GExp₄ e GExp₇), deve-se registrar que a inibição causada pela clorexidina independeu da concentração desse produto — GExp₄ (Periogard: clorexidina a 0,12%) e GExp₇ (Parodontax: clorexidina a 0,20%) —, uma vez que a diferença entre as taxas de glicose atribuídas a esses grupos não foi estatisticamente significativa nos três tempos referenciais de experimentação (0, 24 e 48

horas), como mostram a Tabela 1 e a Figura 5. É importante que continuem sendo traçados novos desenhos experimentais, visando a confirmar, ou não, a possível proximidade da eficácia das concentrações 0,12% e 0,20%, visto que a clorexidina em baixas concentrações foi considerada neste estudo bastante eficaz. Resguardada a compatibilidade entre as doses clínicas necessárias e as respostas orgânicas esperadas, se esses resultados vierem a ser confirmados *in vivo*, poder-se-á orientar a prescrição dessas soluções em doses mais baixas (0,12%), dado que se terá assegurada a mesma eficácia.

A inibição provocada pelo Listerine (GExp₅ - 0h: $252,5 \pm 14,88$; 24h: $240,9 \pm 13,79$; 48h: $240,0 \pm 7,26$) e pelo Malvatricin (GExp₆ - 0h: $260,4 \pm 12,38$; 24h: $251,5 \pm 12,99$; 48h: $248,2 \pm 10,17$) na primeira fase do estudo deveu-se, provavelmente, à presença dos princípios ativos que constituem esses antissépticos frente aos microrganismos presentes na saliva total de humanos empregada na realização das experimentações. Avaliados os componentes ativos do Listerine — timol, eucaliptol, salicilato de metila e mentol — e do Malvatricin — quinosal, tirotricina e tintura malva —, observa-se que o timol e a tirotricina são os principais componentes químicos antimicrobianos efetivos. O timol tem propriedade desinfetante e fungicida, enquanto a tirotricina é um antibiótico com ação bactericida, principalmente sobre microrganismos Gram-positivos (ARAÚJO, 1996). Provavelmente, a inibição bacteriana detectada na primeira fase deste estudo resultou do contato direto desses princípios ativos com a saliva total durante todo o período de incubação. Segundo Kubert e colaboradores (1993), essas exposições de cepas bacterianas por curto espaço de tempo produzem mudanças morfológicas significativas que podem estar associadas à morte bacteriana, o que ajuda a explicar a alteração das atividades associadas à superfície dessas células.

Os extratos de própolis I, II e III revelaram inibição do consumo de glicose, isto é, efeito antibacteriano, similarmente à ação dos produtos industrializados Periogard, Listerine,

Malvatricin e Parodontax, fármacos largamente utilizados como antissépticos bucais (SWERTS et al., 2002; SWERTS; COSTA; FIRINI, 2005). Há de se enfatizar que a ação da própolis, enquanto antisséptico, apresenta a vantagem de ser esse agente um produto natural, com maior diversidade molecular, ou seja, de possuir inúmeras substâncias terapêuticas compatíveis com o metabolismo dos mamíferos em geral, o que reduz a possibilidade de causar reações adversas aos tecidos bucais, em comparação com os produtos industrializados testados (SWERTS, COSTA, FIRINI, 2005). Não se pode perder de foco que essa ação benéfica ao homem está diretamente vinculada à concentração e composição desse produto.

Na segunda fase da presente pesquisa, modificou-se a metodologia mediante a intervenção direta dos extratos de própolis I, II e III na cavidade bucal através de enxágües.

Para a análise dos dados referentes à ação inibidora dos extratos de própolis I, II e III foi considerado o referencial das taxas de glicose atribuídas ao grupo controle (GC₂), equivalente à saliva dos voluntários coletada antes da realização do bochecho com os extratos de própolis.

De acordo com o protocolo experimental, a determinação da eficácia inibidora bacteriana dos extratos de própolis I, II e III foi calculada em função da concentração de glicose determinada no GC₂, nos tempos de incubação de 0, 24 e 48 horas. Para cada grupo experimental (GExp_I, GExp_{II} e GExp_{III}) avaliou-se, bioquimicamente, a possibilidade de continuidade da inibição dos microrganismos presentes na saliva total, coletada zero, uma, duas e três horas após o enxágües.

Através da determinação das taxas de glicose pôde-se estimar a eficácia no GC₂, mediante a queda da taxa deste carboidrato, ao serem comparados os valores detectados no tempo zero com aqueles dosados após 24 e 48 horas de incubação (0h: $128,8 \pm 1,22$; 24h: $110,6 \pm 1,32$; 48h: $97,0 \pm 1,32$). Essas diferenças indicam um nítido consumo de glicose na saliva total que não sofreu a influência de enxágües com os extratos de própolis. Os resultados

obtidos comprovam a confiabilidade da metodologia adotada neste estudo, através do consumo de glicose na manutenção do metabolismo energético dos microrganismos presentes na saliva total.

Mediante a análise do grupo controle e dos grupos experimentais, constatou-se que, no tempo zero, as diferenças não são consideradas estatisticamente significativas, visto que é neste tempo que a saliva entra em contato com a glicose, nos vários tempos de sua coleta.

A avaliação dos resultados do grupo experimental em que foi utilizada o extrato de própolis I (GExp₁) revelou não ter havido consumo de glicose com 24 horas de incubação da saliva total coletada imediatamente após o enxágüe e com uma, duas e três horas depois do bochecho com esse extrato, uma vez que as taxas de glicose correspondentes ao GExp₁, ao serem comparadas com as taxas residuais atribuídas ao grupo controle (GC₂), caracterizam a eficácia do extrato de própolis I, conforme Tabela 3 e Figura 7. Esse produto natural, proveniente da região da Mata Atlântica e classificado como do grupo 6, que em sua forma bruta é utilizado na fabricação do extrato, rico em compostos apolares, segundo o fabricante, foi o empregado na realização das experimentações do presente estudo. Provavelmente, esses compostos apolares foram os responsáveis pela inibição da atividade dos microrganismos presentes na saliva, conforme relatam Moura (2000), Alencar e colaboradores (2002), e Duarte e colaboradores (2003). Entretanto o mecanismo de ação antimicrobiana da própolis do grupo 6 ainda não está claro e, aparentemente, é bastante complexo, podendo resultar do efeito sinérgico com outros compostos presentes, ainda de acordo com Duarte e colaboradores (2003).

O Ministério da Agricultura, órgão responsável pela regulamentação da identificação e qualidade da própolis, determina que na composição dos extratos de própolis haja uma concentração mínima de 0,25% de flavonóides, por ser um dos principais

responsáveis pela ação antimicrobiana da própolis mundial, mas não constam nessa regulamentação dados sobre os compostos apolares presentes na própolis proveniente da Mata Atlântica, que não possui na sua composição flavonóides agliconas, segundo os relatos de Adelman (2005). Há que se destacar, também, que os fabricantes dos extratos de própolis não especificam detalhadamente a composição desses produtos naturais de diferentes procedências.

A ação antimicrobiana prolongada do extrato de própolis I testada nas amostras de saliva coletadas com zero, uma, duas e três horas de enxágüe evidenciou a potencialidade farmacológica desse produto, além de sua extensão até três horas após o enxágüe. Para um antisséptico bucal prolongar o seu efeito na cavidade bucal se faz necessário que os seus princípios ativos fiquem aderidos à superfície bucal e sejam gradativamente liberados. Como o extrato de própolis I (rico em compostos apolares) teve uma ação antimicrobiana mais prolongada do que os extratos de própolis II e III (ricos em flavonóides e CAPE), pode-se inferir que provavelmente os compostos apolares possuem uma aderência mais prolongada aos tecidos bucais do que os flavonóides e o CAPE, sendo seu efeito antimicrobiano também mais duradouro. Essa possibilidade de permanência resulta na liberação gradativa desses compostos dos respectivos sítios de ligação (substantividade), assegurando, assim, maior tempo de aderência desses produtos no meio bucal e prolongando, em consequência, o contato entre esses agentes químicos e os microrganismos-alvos (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995).

Ao se avaliar esse mesmo grupo experimental (GExp_I) após 48 horas de incubação, comprovou-se não ter havido consumo de glicose nas amostras de saliva coletadas em zero, uma e duas horas após o enxágüe. Contudo, ao serem confrontados os resultados obtidos para as amostras de saliva coletadas três horas após o bochecho com as taxas de glicose determinadas no tempo zero e após 48 horas de incubação, observou-se ter havido

consumo desse açúcar. O decréscimo das taxas residuais desse substrato revelou que, três horas após o enxágüe, a substantividade do extrato de própolis I sofreu redução, provavelmente causada pela renovação constante do fluido salivar no meio bucal, seguida, em consequência, de redução gradativa da concentração desse produto natural, em decorrência da deglutição da saliva pelos participantes da amostra. Isto permite que os microrganismos voltem a se multiplicar e retomem o seu metabolismo energético, ainda que de forma lenta, no tempo de três horas após o enxágüe. No meio bucal, a atividade antimicrobiana retorna certamente à sua regularidade, a partir da adaptação e multiplicação gradativa dos microrganismos, graças à redução das taxas de própolis aos níveis considerados próximos a zero (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1995).

Os resultados atribuídos aos grupos experimentais em que os voluntários bochecharam com o extrato de própolis II e III (GExp_{II} e GExp_{III}, respectivamente) demonstraram que não houve consumo de glicose após 24 horas de incubação da saliva total coletada imediatamente após o enxágüe ou após uma, duas e três horas (TABELA 4; TABELA 5; FIGURA 8; FIGURA 9). Esse fenômeno é sugestivo de atividade antimicrobiana efetiva. Todavia, ao se confrontarem os resultados obtidos após 48 horas de incubação, observou-se ter havido consumo de glicose referente à coleta da saliva realizada com uma, duas ou três horas após o enxágüe com esses extratos. Esse achado parece demonstrar menor potencialidade/substantividade dos extratos de própolis II e III em comparação com o extrato de própolis I, que só revelou essa redução nas amostras de saliva coletadas três horas após o enxágüe.

O extrato de própolis II é proveniente de uma mistura de várias própolis coletadas nos estados de Minas Gerais e Paraná, ao passo que o extrato de própolis III é proveniente do Sudeste do Brasil. Ambos possuem em sua composição os flavonóides agliconas, considerados responsáveis pela atividade antimicrobiana da própolis conjuntamente com o

CAPE, conforme informações dos fabricantes. Estes não esclarecem, porém, a classificação quanto ao tipo de própolis e quais os flavonóides presentes nos extratos e suas respectivas concentrações que justifiquem a ação antimicrobiana. Até então, a efetiva ação antimicrobiana aceita cientificamente é atribuída aos flavonóides pinocembrina, galangina, quercetina, procianina, naringenina e gonidina (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983; MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997).

Ao se observar a ação antimicrobiana da própolis, mediante a inibição do consumo de glicose, as concentrações dos extratos de própolis I (11%), II(20%) e III(30%) parecem não ter se constituído no fator determinante para a maior potencialidade/substantividade dessa atividade. A composição desse produto biológico parece ter sido significativamente mais importante na determinação dessa ação terapêutica, de acordo com os achados resultantes do protocolo experimental estabelecido para a realização do presente trabalho. A própolis contendo compostos apolares demonstrou ser mais eficaz contra os microrganismos presentes na saliva total de humanos do que as outras duas constituídas de flavonóides, de acordo com as restritas informações sobre sua composição prestadas pelos respectivos fabricantes. Banskota e colaboradores (1998) e Bankova e colaboradores (1999) propõem a realização de testes químicos combinados com testes biológicos, especialmente antimicrobianos, objetivando avaliar e consolidar a eficácia farmacológica da própolis de diferentes origens botânicas, com vistas ao controle de qualidade desses produtos.

O fato de os fabricantes informarem restritamente a composição desses produtos indica a importância da realização de diversos estudos, dentre os quais os bioquímicos, que tenham por finalidade explicitar essa composição, para que se possa usufruir dos benefícios desse produto natural, tendo-se em conta sua prescrição nas mais baixas concentrações ou a indicação de extratos mais concentrados, desde que seja justificável sua indicação em função da ação terapêutica dos seus componentes. Assim, faz-se necessária uma rigorosa avaliação e

ampla divulgação da composição da própolis a ser comercializada em função de sua procedência, da concentração de seus princípios ativos e da sua potencialidade e substantividade, com o intuito de serem asseguradas suas propriedades terapêuticas, particularmente na Odontologia, no tocante aos enxaguatórios e dentifrícios.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo bioquímico experimental realizado *in vitro*, pode-se concluir que:

1º) os extratos de própolis I, II e III revelaram a mesma eficácia antimicrobiana, em comparação com a dos produtos industrializados Periogard, Listerine, Malvatricin e Parodontax;

2º) o extrato de própolis I é o mais indicado clinicamente em Odontologia, uma vez que, além de sua concentração ser mais baixa, possui eficácia antimicrobiana mais prolongada em comparação com os extratos de própolis II e III, o que decorre da presença de compostos apolares em sua composição.

REFERÊNCIAS

ABELHAS. [2006?a]. Disponível em: <<http://br.geocities.com/guipichonelli/abelhas.html>>. Acesso em: 16 jun. 2006.

ABELHAS. [2006?b]. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/abelha8.htm>>. Acesso em: 19 nov.2006.

ADELMANN, J. **Própolis**: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. 2005. 186f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ALENCAR, S.M. de. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 68f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALMEIDA, E.C. de; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v.8, n.2, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010479302002000200002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 6 nov. 2006.

ALMEIDA, R.V.D. et al. Efeito clínico da solução anti-séptica à base de própolis em crianças com cáries ativas. **Pesq. Bras. Odontopediatr. Clín. Integr.**, João Pessoa, v.6, n.1, p.87-92, jan./abr. 2006.

AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture: comparison with the antiviral activity of propolis. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.55, n.12, p.1732-1740, Dec. 1992.

BANKOVA, V. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.70, n.2, p.190-193, Apr. 1999.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z. Naturforsch. C**, Tübingen, v.50, n.3/4, p.167-172, Mar./Apr. 1995.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. A study on flavonoids of propolis. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.46, n.12, p.471-474, July 1983.

BANSKOTA, A.H. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.61, n.7, p.896-900, July 1998.

BASNET, P.; MATSUNO, T; NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. **Z. Naturforsch. C**, Tübingen, v.52, n.11/12, p.828-833, Nov./Dec. 1997.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.239, n.1, p.70-76, July 1996.

BORRELLI, F. et al. A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.73, p.S53-63, Nov. 2002. Suppl.1.

- BREYER, E.U. **Abelhas e saúde**. União da Vitória: Uniporto Graf. Ed., 1980.
- BRODY, T. **Nutritional biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1994.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food Chem. Toxicol.**, Exeter, v.36, n.4, p.347-363, Apr. 1998.
- CARVALHO, C.A.L. de; ALVES, R.M. de O.; SOUZA, B. de A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. Salvador-BA: SEAGRI-BA, 2003. 42p.
- CASTRO, S.L. de; HIGASHI, K.O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v.46, n.1, p.55-58, Apr. 1995.
- CHALLACOMBE, S.J. Immunologic aspects of oral candidiasis. **Oral Surg.Oral. Med. Oral.Pathol.**, St. Louis, v.78, n.2, p.202-210, Aug. 1994.
- CHEN, C.N.; WU, C.L.; LIN, J.K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, bid and cytochrome *c* release in human melanoma cells. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.67, n.1, p.53-66, Jan. 2004.
- CHOI, J.S.; YOKOZAWA, T.; OURA, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.54, n.1, p.218-224, Jan./Feb. 1991.
- CICALA, C. et al. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. **Life Sci.**, Oxford, v.73, n.1, p.73-80, May 2003.
- CLAUS, R. et al. Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v.50, n.4, p.373-379, Apr. 2000.
- COMPOSTOS fenólicos. [2006?] Disponível em: <<http://br.geocites.com/plantastoxicas/fenolicos.html>>. Acesso em: 20 set. 2006.
- DEBUYSER, E. **La propolis**. Nantes: Université de Nantes, 1983.
- DEVASAGAYAM, T.P. et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **J. Assoc. Physicians India**, Bombay, v.52, p.794-804, Oct. 2004.
- DUARTE, C.A.; KFOURI, L.S. Ação da própolis sob a forma de bochechos na formação da placa bacteriana. **RGO**, Porto Alegre, v.47, n.2, p.82-84, abr./jun. 1999.
- DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.26, n.4, p.527-531, Apr. 2003.
- FERREIRA, R.de C.V.; VALENTE, P.H.M.; BARBOSA, A.D. Atividade antibacteriana da propolis. **Lecta-USF**, Bragança Paulista, v.14, n.2, p.65-93, jul./dez. 1996.
- FIGUEIREDO, L.C. et al. Ação antimicrobiana de extratos vegetais sobre a microbiota da placa dentária e saliva: estudo *in vitro*. **R. Odontol. UNICID**, São Paulo, v.16, n.1, p.15-20, jan./abr. 2004.

FONTANA, J.D. et al. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In: SPENCER, J. F. T.; SPENCER, A.L.R. de. **Environmental microbiology: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2004. p.203-218.

GEBARA, E.C.E.; LIMA, L.A.; MAYER, M.P.A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.33, n.4, p.365-369, out./dez., 2002.

GLICOSE ENZIMÁTICA. [2007?]. Disponível em: <<http://www.invitro.com.br/principal/produto/bulaspdf/quimicaclinica/enzimatica/glicose.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2007.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J. Royal Soc. Med.**, London, v.83, n.3, p.159-160, Mar. 1990.

HAUSEN, B.M. et al. Propolis allergy (IV): studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. **Contact Derm.**, Copenhagen, v.26, n.1, p.34-44, Jan. 1992.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther**, Oxford, v.96, n.2/3, p.67-202, Nov./Dec. 2002.

HAVSTEEN, B.H. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.32, n.7, p.1141-1148, Apr. 1983.

HAYASHI, K. et al. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4 dihydroxy-5-prenylcinnamic acid: a novel potent antioxidant. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.47, n.11, p.1521-1524, Nov. 1999.

IKENO, K. et al. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res.**, Basel, v.25, n.5, p.347-351, June 1991.

IVANOVSKA, N.D. et al. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v.47, n.3, p.145-147, July 1995.

KATHER, J. et al. **Formação de placa bacteriana após o uso de enxaguatórios bucais**. [2003?]. Disponível em: <[html//www.bichoonline.com.br](http://www.bichoonline.com.br)>. Acesso em: 15 jul. 2003.

KERR, W.E., CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **Abelha urucu: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v.99, n.2, p.213-218, Feb. 1999.

KOGANOV, M.M.; DUEVA, O.V.; TSORIN, B.L. Activities of plant-derived phenols in a fibroblast cell culture model. **J. Natural Products**, Cincinnati, v.62, n.3, p.481-483, Mar. 1999.

KOO, H. et al. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development desalivated rats. **Caries Res.**, Basel, v.33, n.5, p.393-400, Sept./Oct. 1999.

- KOO, H. et al. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. **Caries Res.**, Basel, v.34, n.5, p.418-426, Sept./Oct. 2000.
- KROL, W.; SCHLLER, S.; CZUBA, Z. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and phenolic components. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v.55, n.1, p.19-25, Dec. 1996.
- LEDON, N. et al. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. **Zhongguo yao li xue bao**, Beijing, v.18, n.3, p.274-276, May 1997.
- LOPES, R.M. et al. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotechnol. Ci. Desenv.**, Brasília, DF, 2003. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.com.br/>>. Acesso em: 24 fev. 2005.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutics activity. **Apidologie**, Paris, v.26, n.2, p.83-99, mars/avril 1995.
- MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quím. Nova**, São Paulo, v.19, n.5, p.529-535, set./out. 1996.
- MARCUCCI, M.C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with phamacological activies. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v.74, n.2, p.105-112, Feb. 2001.
- MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. **Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis**. [2003?] Disponível em: <www.roberg.com.br/PaginaTrabalhoCientifico06.htm>. Acesso em: 31 jul. 2006.
- MARQUELE, F.D. et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v.39, n.3/4, p.455-462, Sept. 2005.
- MARQUES, N.A. **Apicultura em marcha**. Tubarão: Dehon, 1989.
- MAZZUCO, H. et al. Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v.53, n.1, jan./abr. 1996. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161996000100001&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 6 nov. 2006.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, jul./set. 2005.
- MENEZES, H.; ALVAREZ, J.M.; ALMEIDA, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittelforsch**, Aulendorf, v.49, n.8, p.705-707, Aug. 1999.
- O MERCADO. 2005. Disponível em: <<http://www.uniflora.ind.br/conteudo/omercado.asp>>. Acesso em: 19 set. 2005.
- MIRZOEVA, O.K.; CALDER, P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during inflammatory response. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, Edinburgh, v.55, n.6, p.441-449, Dec. 1996.

MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol. Res.**, Jena, v.152, n.3, p.239-246, Sept. 1997.

MITAMURA, T. et al. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. **Anticancer Res.**, Athens, v.16, n.5A, p.2669-2672, Sept./Oct. 1996.

MORAES, E. et al. Influência da própolis na contagem de estreptococos do grupo *mutans*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS, 13, 1996, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: SBPqO, 1996. p.111.

MOREIRA, T.F. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **R. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v.1, n.1, p.12-19, 1986. Disponível em: <http://www.sbfgnosia.org.br/admin/pages/revista/artigo/arquivos/196-1986_12_19.pdf>. Acesso em: 20 set. 2006.

MORENO, M.I.N. et al. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v.71, n.1/2, p.109-114, July 2000.

MOURA, F.F. **Determinação das propriedades físico-químicas e biológicas da própolis produzida por *Apis mellifera* na região nordeste do Brasil.** 2000. 69f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

NAGAOKA, T. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.26, n.4, p.487-491, Apr. 2003.

OPPERMANN, R.V.; NORADI, D. O efeito da aplicação de solução alcoólica de própolis sobre a formação da placa bacteriana. **Stomatos: R. Curso Odontol. ULBRA**, Canoas, 2006. Disponível em: <[html// www.dentalreview.com.br](http://www.dentalreview.com.br)>. Acesso em: 18 set. 2006.

ORSI, R.O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v.6, n.2, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79302000000200006&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 6 nov 2006.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.28, n.4, p.694-700, Apr. 2005.

OTA, C. et al. Atividade da própolis sobre as bactérias isoladas da cavidade bucal. **Lecta-UFS**, Bragança Paulista, v.16, n.1, p.73-77, jan./jun. 1998.

OTA, C. et al. Influência da própolis na cárie em molares de ratos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS, 13, 1996, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro: SBPqO, 1996. p.222.

OZTURK, F. et al. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. **Ophthalmic Res.**, Basel, v.32, n.1, p.13-18, Jan./Feb. 2000.

PAMPLONA, B. Própolis: composição e atividades terapêuticas. **R. Racine**, São Paulo, v.7, n.37, p.49-53, mar./abr.1997.

PANZERI, H. et al. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliações físicas, microbiológicas e clínicas. **R. ABO Nac.**, Rio de Janeiro, v.7, n.1, p.26-30, fev./mar. 1999.

PARK, E.H. et al. Antiinflammatory activity of propolis. **Arch. Pharm. Res.**, Seoul, v.19, n.5, p.337-341, July 1996.

PARK, Y.K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. **Curr. Microbiol.**, New York, v.36, n.1, p.24-28, Jan. 1998.

PARK, Y.K. et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v.40, n.1, p.97-106, mar. 1997.

PARK, Y.K. et al. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Sci.**, Tokyo, v.21, n.2, p.85-90, Mar. 2000.

PEREIRA, A. dos S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, São Paulo, v.25, n.2, p.321-326, mar./abr. 2002.

PEREIRA, F.M. et al. **Sistemas de produção**: produção de mel. Campinas: EMBRAPA., jul. 2003. Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico2.html>>. Acesso em: 15 mar. 2005.

PERUCHI, C.M. de S. et al. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en la dorso de ratones: estudio histológico. **R. Fac. Odontol. Univ. Chile**, Santiago, v.19, n.2, p.23-24, jul./dic. 2001.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutr. Res.**, Tarrytown, v.18, n.12, p.1995-2018, Dec. 1998.

POPOVA, M. et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochem. Anal.**, Chichester, v.15, n.4, p.235-240, July/Aug. 2004.

QUINTANA DIAZ, J.C. Efectos del propóleos en los tratamientos quirúrgicos y las úlceras bucales. **R. Cubana Estomatol.**, La Habana, v.33, n.1, p.34-39, enero/abr. 1996.

RAO, C.V. et al. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. **Cancer Res.**, Baltimore, v.55, n.11, p.2310-2315, June 1995.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.73, p.S21-S29, Nov. 2002. Suppl.1.

- SANTOS, I.A. dos. A vida de uma abelha solitária. **Ci. Hoje**, São Paulo, n.179, p.60-62, 2002. Disponível em: <<http://eco.ib.usp.br/beelab/solitarias.htm>>. Acesso em: 20 set. 2006.
- SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J. Venom. Anim. Toxins.**, Botucatu, v.7, n.1, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79302001000100009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 6 nov. 2006.
- SILVA, E.B. et al. Efeito da ação da própolis na lâmina própria da mucosa bucal de ratos: estudo histológico. **ROBRAC: R. Odontol. Bras. Central**, Goiânia, v.9, n.28, p.4-8, dez. 2000.
- SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileira: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Composição e Arte, 2002. 253p.
- SOARES, S.E. Phenolic acids as antioxidants. **R. Nutr.**, Campinas, v.15, n.1, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732002000100008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 out. 2006.
- SU, Z.Z. et al. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type-5 adenovirus transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. **Cancer Res.**, Baltimore, v.54, n.7, p.1865-1870, Apr. 1994.
- TATEFUJI, T. et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophages spreading and mobility. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.19, n.7, p.966-970, July 1996.
- TEIXEIRA, E.W. et al. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, Oxford., v.2, n.1, p.85-92, Mar. 2005.
- THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 2. ed. Trad. Sérgio Weyne, Rui Oppermann. São Paulo: Santos, 1995, Cap. 3-6, p. 45-136.
- TORRES, C.R.G. et al. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Pós-Grad. R. Fac. Odontol. São José dos Campos**, São José dos Campos, v.3, n.2, jul./dez., 2000.
- VAN DEN BERG, R. et al. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chem.**, Washington, DC, v.66, n.4, p.511-517, Sept. 1999.
- VERÍSSIMO, M.T. **Curso sobre tecnologia, industrialização e análises de própolis**. Florianópolis: Secretaria de Agricultura e do Abastecimento, 1991.
- A VIDA das abelhas. [2006?] Disponível em: <<http://www.angelfire.com/wy/shangrila/vida.html> >. Acesso em: 20 set. 2006.
- WENG, M.S.; HO, Y.S.; LIN, J.K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.69, n.12, p.1815-1827, June 2005.

ZARATE, P. et al. Comparação entre própolis e flúor na redução de *S. mutans* salivares. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.14, p.145, 2000. Suplemento.

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFBA)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG 0003460, April 1, 2004 – IRB 00004123, April 8, 2007

Rua Padre Feijó 240, Canela - Ambulatório Magalhães Neto 3.º andar, Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
Cep.: 40.160-170 - Salvador, BA. Telefax: (71) 203-2740 E-MAIL: cep_mco@yahoo.com.br

PARECER/RESOLUÇÃO N.º 93/2006

Registro CEP. 99 – 08.08.06.

Título do Projeto. “Avaliação *in vitro* da ação farmacológica e bioquímica da própolis frente aos microrganismos presentes na saliva total de humanos”.

Patrocínio/Financiamento. Recurso próprios.

Pesquisadora Responsável. **Cíntia Coelho Simões**, Mestre em Odontologia e concluinte do Curso de Pós-graduação em Medicina e Saúde em Odontologia. **Professor-Orientador.** **Roberto Paulo Correia de Araújo**, Livre Docente. “Currícula Vitae” apensos.

Instituição. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, **ICS/UFBA**.

Área do Conhecimento. 4.02, Nível N, Grupo III.

Objetivos. Avaliar, *in vitro*, a atividade bioquímica, microbiológica e farmacológica de diferentes concentrações de extrato de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva total de seres humanos, comparativamente à eficácia aos produtos industrializados digluconato de clorexidina, tirotricina e timol. **Específicos.** Determinar, *in vitro*, a eficácia de diferentes concentrações de extrato de própolis, em comparação aos produtos industrializados Listerine, Malvatricim, Paradontax e Periogard, através do teste bioquímico de consumo de glicose pelos microrganismos presentes na saliva total de humanos; determinar *in vivo in vitro* a eficácia anti-séptica das diferentes concentrações de extrato de própolis, através do consumo de glicose pelos microrganismos presentes na saliva de seres humanos, coletada imediatamente após o enxágüe e com 1, 3 e 5 horas após o mesmo, nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

Sumário. O Presente estudo de natureza experimental, laboratorial, avaliará a ação, *in vitro*, de diferentes concentrações de extrato de própolis em relação a produtos industrializados de clorexidina, tirotricina e do timol, sobre microrganismo presentes na saliva total de seres humanos, sendo analisados através de testes bioquímico e testes bacteriológicos.

Para a realização deste estudo serão selecionados 10 (dez) doadores de saliva que atenderão as exigências de um número mínimo de 24 (vinte e quatro) dentes, que realizem controle da placa bacteriana regularmente e em condições satisfatórias de saúde bucal, sem presença de lesões de gripe e sangramento gengival. Além disso, os voluntários serão submetidos a exame salivar (KRASSE, 1988) para avaliação do fluxo e da capacidade de tamponamento da saliva.

Face a natureza do estudo comparativo com produtos comercializados e respectivo processamento laboratorial em duas fases, inexistem formações de grupos, Cronograma, Orçamento e Referência Bibliográficas anexas.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG 0003460, April 1, 2004 – IRB 00004123, April 8, 2007

Rua Padre Feijó 240, Canela – Ambulatório Magalhães Neto 3.º andar, Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
 Cep.: 40.160-170 - Salvador, BA. Telefax.: (71) 203-2740 E-MAIL: cep_mco@yahoo.com.br

Comentários. Estudo a ser realizado em laboratório, limitando-se os “sujeitos de pesquisa” a fornecerem saliva por duas vezes, a última após “bochecho”, e abrangerá 10 (dez) participantes, (na Folha de Rosto consta 30 (trinta)), para, em 02 (duas) fases, serem procedidas as comparação. O Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido, “TCLPE”, é ético, necessitando apenas de nele constar o endereço e o telefone deste CEP para eventual consulta pelos participantes quanto a condução da pesquisa. **Protocolo aprovável**, com satisfação prévia das recomendações sobre o esclarecimento do número real de amostra, (com 30 (trinta) não seria pouco?), e o acréscimo, no “TCLPE”, dos dados deste Institucional.

Alto risco com procedimentos

Salvador, 29 de agosto de 2006.



Prof. Dr. Antonio dos Santos Barrata
 Coordenador do Comitê de Ética
 em Pesquisas Humana
 MCO - Universidade Federal da Bahia

Coordenador.

Observação importante. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas “Recomendações Adicionais” apensas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Eu, Cinthia Coelho Simões, estou fazendo uma pesquisa com o título de “Estudo bioquímico da ação da própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos”, com o objetivo de avaliar, em laboratório, a ação da própolis como antisséptico e antiinflamatório, no combate a doenças da boca, provocadas por bactérias presentes na saliva .

A própolis é um produto produzido pelas abelhas e utilizadas pelo homem como remédio natural para gripes, tosse, etc.

O senhor(a) que concordar em participar desta pesquisa, passará por exame clínico odontológico, e terá que suspender a higiene da boca por 12 a 14 horas (não utilizar escova de dente, fio dental, pasta de dente, palito, enxaguatório bucal). Depois deste tempo, o senhor(a) comparecerá ao laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciência da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, localizado na rua Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, em horário marcado, para a doação de saliva.

A não higienização da boca durante este tempo, pode provocar a formação de uma massa esbranquiçada, composta de restos de alimentos e bactérias, localizada sobre os dentes e na língua, provocando mal hálito e inflamação da gengiva.

Na primeira fase do experimento, após a suspensão da higiene bucal, os voluntários apenas doaram saliva. Já na segunda fase do experimento, os voluntários além da doação de saliva, terão que bochechar extrato de própolis diluído em água.

Após a doação da saliva o senhor(a) receberá instruções de higienização para o restabelecimento da saúde da boca e não participará de qualquer outra fase do estudo, além das citadas acima.

Todos os resultados da pesquisas serão arquivados por mim, com sigilo, sendo utilizados apenas para fins científicos, sem revelar a identidade dos participantes.

Esclareço que o senhor(a) tem plena liberdade de recusar a participar desta pesquisa ou mesmo desistir a qualquer momento, sem nenhum prejuízo para o voluntário.

Esclareço também, que estarei a sua disposição pessoalmente ou pelo telefone (0xx71)3451-3305, para tirar qualquer dúvida em relação a pesquisa.

Assim, estando de acordo em ser um dos voluntários deste estudo, peço ao senhor(a) _____, portador(a) do RG _____, emitido _____, que assine em duas vias deste documento, o que será feito também por mim, ficando uma via com o senhor e a outra comigo.

Salvador, _____, _____, _____

(Assinatura do voluntário)

(Assinatura da autora da pesquisa)

Deseja conhecer o resultado da pesquisa?

Sim

Não