

ALESSANDRO DIOGO DE CARLI

**AÇÃO DA PRÓPOLIS DE *APIS MELLIFERA* ASSOCIADA AO
FLUORETO DE SÓDIO NO PROCESSO DE REMINERALIZAÇÃO DE
MANCHAS BRANCAS E SOBRE A MICROBIOTA CARIOGÊNICA:
ESTUDO *IN SITU***

CAMPO GRANDE
2010

ALESSANDRO DIOGO DE CARLI

**AÇÃO DA PRÓPOLIS DE *APIS MELLIFERA* ASSOCIADA AO
FLUORETO DE SÓDIO NO PROCESSO DE REMINERALIZAÇÃO DE
MANCHAS BRANCAS E SOBRE A MICROBIOTA CARIOGÊNICA:
ESTUDO *IN SITU***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção de título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Zárate

CAMPO GRANDE
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO
ALESSANDRO DIOGO DE CARLI

**AÇÃO DA PRÓPOLIS DE *APIS MELLIFERA* ASSOCIADA AO
FLUORETO DE SÓDIO NO PROCESSO DE REMINERALIZAÇÃO DE
MANCHAS BRANCAS E SOBRE A MICROBIOTA CARIOGÊNICA:
ESTUDO *IN SITU***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-
oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul, para obtenção de título de Doutor.

Resultado_____

Campo Grande (MS), 13 de agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____
Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Para dedicar uma conquista desse valor, vou me apoiar em ombros de gigantes. Escolhi gigantes da música e da literatura.

Dedico esse trabalho, primeiramente, **a minha esposa Melina**: acompanhaste a edificação desse momento. Estiveste e vivenciaste junto a mim todas as etapas desse processo. Acho que estou entendendo o sentido do casamento e, posso dizer, do amor: “...**se você pensa em mim, se você me abraça, a vida é gratia plena, a vida é cheia de graça...**” (George Israel e Paula Toller, 2005).

Dias atrás, li esse verso de Vinícius de Moraes: “**Eu, muitas noites, me debrucei sobre o teu berço e verti sobre o teu pequenino corpo adormecido as minhas mais indefesas lágrimas de amor, e pedi a todas as divindades que cravassem na minha carne as farpas feitas para a tua**”. Logo, lembrei dos meus pais: **Waldemar e Therezinha**, que há 49 anos se dedicam à construção (e reconstrução) de uma união plena, acreditando indubitavelmente no valor da família. Qualquer palavra que eu escreva não será suficiente para expressar a gratidão e a admiração que tenho por vocês. Obrigado por todo amor, atenção, proteção e confiança que sempre dedicaram a mim. As “farpas” vieram, e, sem dúvida, virão. Aprendi com vocês o valor da verdade e de nunca esquecer “de quem realmente eu sou e de onde eu vim”. Por me ensinarem (e por terem me proporcionado) viver com dignidade e liberdade, dedico-lhes esse trabalho e todo meu amor.

À minha irmã, meu cunhado e meus lindos sobrinhos, por acreditarem em mim, e por configurarem parte essencial da minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

À **Melina**, amada esposa e grande incentivadora de todas as minhas conquistas.

A minha prima **Prof^a. Ms. Grasiela De Carli**, colega de profissão e de sonhos, pelas opiniões sensatas, críticas e pontuais, essenciais para a realização desse trabalho.

À Cirurgiã-dentista **Vanessa Hoffmann**, pela colaboração com a confecção dos dispositivos palatinos.

Aos **voluntários** que participaram do experimento, pela seriedade e comprometimento com a realização do estudo.

Aos professores **Cibele Bonfim de Rezende Zárate, Valéria Rodrigues de Lacerda e Edilson José Zafalon**, colegas da disciplina de Odontologia em Saúde Coletiva da FAODO / UFMS, pelo excelente convívio e espírito colaborativo. Somos uma equipe (de amigos!).

Aos amigos **Prof. Dr. Key Fabiano de Souza Pereira, e Prof. Dr. Danilo Matias Guerisoli**, pelas contribuições para a realização desse trabalho.

À **Prof^a. Dr^a. Rosana Mara Giordano de Barros**, Diretora da FAODO-UFMS, pela excelente receptividade que dispensou a mim quando iniciei minhas atividades docentes na FAODO e por tudo que fizestes para a materialização de uma grande conquista da minha vida. Serei eternamente grato.

À **Fundect**, pelo fomento à pesquisa.

Finalmente, faço um agradecimento especial ao meu amigo **Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira**, por ter resgatado em mim **o sentimento de confiança nas verdadeiras amizades**. Como professor e orientador (desde o Mestrado), foste sempre preocupado em fazer o melhor, o que, na minha prática docente, implicou uma “criticidade objetiva e construtiva” e isso, é parte essencial da consolidação do meu caminho na docência, também pela inspiração em seu legado. És como um irmão para mim, tu sabes! Gratidão imensa, sempre.

*Sim. A vida é muito oriental.
Só algumas pessoas escolhidas pela fatalidade do acaso
provaram da liberdade esquiva e delicada da vida.*

(Clarice Lispector, Água Viva)

RESUMO

De Carli AD. Ação da própolis de *Apis mellifera* associada ao fluoreto de sódio no processo de remineralização de manchas brancas e sobre a microbiota cariogênica: estudo *in situ*. Campo Grande; 2010. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A associação da própolis ao fluoreto tem apresentado resultados promissores nos ensaios *in vitro* e *in vivo* para o controle da cárie. O objetivo desse estudo foi verificar o efeito de um extrato etanólico de própolis 5% (EEP 5%) associado ou não ao fluoreto de sódio (NaF 0,05%) sobre o biofilme cariogênico e os processos de desmineralização-remineralização do esmalte. Realizou-se estudo *in situ* de duas fases de 14 dias cada; na Fase 1, os voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo 6 blocos de esmalte, que foram submetidos ao desafio cariogênico (DC) com sacarose 20%/8 vezes ao dia. Na segunda fase, os voluntários foram divididos em grupos experimentais: (1)DC+Controle; (2) DC+NaF 0,05%; (3)DC+EEP 5%; (4)DC+EEP 5%+NaF 0,05% ; e (5)DC+Flúor Fosfato Acidulado. Ao final de cada fase, foram realizadas as análises microbiológica do biofilme e da microdureza do esmalte em corte transversal. No grupo 4 houve diferenças estatisticamente significativas em relação a todos os grupos e entre as fases, tanto para as variáveis ganho mineral e recuperação da microdureza, quanto na supressão das contagens bacterianas. Concluiu-se que a associação EEP 5%+NaF 0,05% foi o tratamento mais efetivo para o controle do biofilme cariogênico e reequilíbrio mineral.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, placa dentária, cárie dentária.

ABSTRACT

De Carli AD. Action of *Apis mellifera* propolis associated to sodium fluoride in the remineralization process of white spots and on the cariogenic microbiota: *in situ* study. Campo Grande; 2010. [Thesis – Federal University of Mato Grosso do Sul].

The association of propolis to fluoride has presented promising results on *in vitro* and *in vivo* essays for caries control. The objective of the present study was to verify the effect of a 5% propolis ethanol extract (EEP 5%) associated to 0.05% sodium fluoride (NaF 0.05%) on the cariogenic dental biofilm and the demineralization-remineralization processes of the enamel. A 2-phase, 14 days each, *in situ* study was performed; on Phase 1, the volunteers wore palatal devices containing 6 enamel blocks, which were submitted to cariogenic challenge (CC) with 20% sucrose 8 times a day. During Phase 2, volunteers were divided in 5 experimental groups treated as follows: (1) CC+control; (2) CC+NaF 0.05%; (3) CC+EEP 5%; (4) CC+EEP 5% + NaF 0.05% and (5) CC + acidulated phosphate fluoride. At the end of each phase, the microbiologic analysis of biofilm and microhardness of transversal sections of the enamel were performed. Group 4 presented statistically significant differences when compared to the other studied groups and among the phases, regarding mineral gain and microhardness recover, as well as bacteria supression. It could be concluded that the association of EEP 5%+NaF 0.05% was effective in controlling cariogenic biofilm and mineral reequilibrium.

Key-words: *Streptococcus mutans*, dental plaque, dental caries

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média (\pm DP) de UFC dos diferentes microrganismos conforme o grupo e fase experimentais.30
- Tabela 2- Média (\pm DP) da microdureza do esmalte em corte transversal conforme a profundidade, grupo e fases experimentais.....31
- Tabela 3- Média (\pm DP) do ganho mineral (GM) e recuperação da microdureza do esmalte (RM) conforme a profundidade e grupos experimentais 32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Critérios de inclusão e exclusão.....	23
Figura 2 – Dispositivo palatino.....	24
Figura 3 – Desenho do estudo.....	25
Figura 4 – Blocos de esmalte preparados para o ensaio de microdureza.....	28
Figura 5 - Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.....	28
Figura 6 – Correlação linear entre a microdureza do esmalte (50µm de profundidade) e microrganismos testados (Teste de Correlação Linear de Pearson).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
µg	micrograma
µm	micrômetro
ATF	aplicação tópica de flúor
BMECT	valor <i>baseline</i> da microdureza do esmalte em corte transversal
C	controle
CBM	concentração bactericida mínima
CEP	comitê de ética em pesquisa
DC	desafio cariogênico
DES	desmineralização
DF	dentifrício fluoretado
DNF	dentifrício não-fluoretado
DP	desvio padrão
EEP	extrato etanólico de própolis
F-ATPase	flúor ATPase
FFA	flúor-fosfato-acidulado
g	grama
GM	ganho mineral
GTF	glicosiltransferase
HB	higiene bucal
M1	análise microbiológica na Fase 1
M2	análise microbiológica na Fase 2
MECT	microdureza do esmalte em corte transversal
MECT 1	microdureza do esmalte em corte transversal na Fase 1
MECT 2	microdureza do esmalte em corte transversal na Fase 2
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	mili Mol
MSB	mitis salivarius bacitracina
NaF	fluoreto de sódio
°C	graus Celsius
pH	potencial hidrogeniônico

ppm parte por milhão

RE remineralização

RM recuperação da microdureza

tt trans-trans

UFC Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3 OBJETIVOS.....	22
4 MATERIAL E MÉTODO.....	23
4.1 Tipo de Estudo.....	23
4.2 Desenho experimental.....	23
4.3 Obtenção do EEP.....	26
4.4 Análise microbiológica do biofilme cariogênico.....	27
4.5 Análise da microdureza do esmalte em corte transversal.....	27
4.6 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS.....	30
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária permanece sendo, no campo da saúde bucal, um dos principais problemas de saúde pública, apesar do declínio nas últimas décadas, pois ainda é prevalente para alguns grupos, o que pode ser devido ao fato de que, em escala global, somente uma parcela da população se beneficia dos métodos de prevenção e controle (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001; MARSH, 2003; MARTHALER, 2004; FEATHERSTONE, 2009).

Desde a década de 60, a cárie é considerada uma doença induzida pela presença de biofilme, fator crítico para o seu desenvolvimento em humanos (LÖE, 1969). Estudos iniciais indicaram especificidade bacteriana envolvida nesse processo, relacionando os *Streptococcus mutans* a sua etiopatogenia (IKEDA *et al.*, 1973; LOESCHE *et al.*, 1976; MINA; LOESCHE, 1977; DUCHIN; VAN HOUTE, 1978; LOESCHE; STRAFON, 1979; VAN HOUTE, 1980) e os Lactobacilos à sua progressão (LOESCHE, 1986).

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

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

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

Nessa situação, indica-se o controle químico (adjuvante) do biofilme dental, a fim de auxiliar o paciente na realização de uma higienização bucal compatível com níveis clínicos salutareos (ADDY, 1986).

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

A utilização de Extratos Etanólicos de Própolis (EETs) no campo da Cariologia tornou-se factível quando estudos iniciais abordaram sua atividade sobre a inibição de microrganismos relacionados à cárie dentária (IKENO; MIYASAWA, 1991; GEBARA *et al.*, 1996; STEINBERG *et al.*,1996; OTA *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 2000ab; KOO *et al.*, 2003; KOO *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.* 2006) e sobre o processo de formação do biofilme cariogênico / fatores de virulência bacteriana que influenciam na cariogenicidade deste (PARK *et al.*, 1998 ; KOO *et al.*, 2000abc; KOO *et al.*, 2002ab; ALMEIDA *et al.*,2006).

Evidências indicam que o fluoreto de sódio (NaF) é eficaz no processo de remineralização de lesões de cárie incipiente (FEATHERSTONE, 1999; CURY; TENUTA, 2009; FEATHERSTONE, 2009). Diante disso, pensou-se na hipótese de combinar os EETs ao NaF para verificação da possibilidade da utilização dessa associação na dinâmica do processo de desmineralização-remineralização do esmalte (processo DES-RE).

As terapias de associação (combinatórias) verificaram o efeito de EETs isoladamente ou associados ao fluoreto de sódio sobre a recuperação da microdureza superficial do esmalte (GIAMALIA *et al.*, 1999; ZÁRATE-PEREIRA,

2003) e na remineralização de manchas brancas (ZÁRATE-PEREIRA, 2003; DE-CARLI, 2007), tendo em vista a sinergia entre um comprovado agente remineralizador (NaF) e um potente composto antibacteriano de origem natural e sem relato de toxicidade (EEP).

Todos esses resultados direcionam para a possibilidade do uso dos EEPs no tratamento de cárie. Porém, frente ao alto desafio cariogênico, o NaF pode não ser suficiente para controlar a doença cárie; daí a necessidade de desenvolvimento de agentes químicos de controle do biofilme dental que sejam seguros para o uso e cuja ação seja sinérgica ou complementar à do fluoreto (OGAARD *et al.*, 1994; FEATHERSTONE, 2009; ten CATE, 2009).

Embora a associação NaF+EEPs tenha sido avaliada, mais estudos são necessários para confirmar os resultados, especialmente com a própolis sul-mato-grossense, ainda não avaliada sob esse aspecto, comparando-a ao NaF e também ao flúor fosfato acidulado (FFA), o que justifica a realização deste ensaio.

O objetivo desse trabalho foi verificar, *in situ*, o efeito do EEP 5% isolado e associado ao NaF 0,05%, sobre o processo de desmineralização-remineralização do esmalte (processo DES-RE) e sobre a microbiota cariogênica.

A hipótese testada é a de que a associação EEP+NaF seja capaz de controlar a cárie dentária em situações de risco à doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Um estudo clássico da década de 90 demonstrou a eficácia da própolis no processo inibitório do crescimento da microbiota cariogênica e da atividade das enzimas glicosiltransferases (GTF), especificamente nos estreptococos do grupo mutans, os quais são fortemente associados ao início do processo da doença cárie, sugerindo a atividade anticariogênica da própolis (IKENO; MIYASAWA, 1991).

Em experimento realizado *in vitro*, avaliou-se a ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, dentre elas a própolis, comprovando sua ação antibacteriana, e também a capacidade de inibir a adesão bacteriana desses microrganismos, o que sugeriu a possibilidade do uso desta substância no controle do biofilme bacteriano bucal (GEBARA *et al.*, 1996).

Os efeitos antibacterianos da própolis e do mel foram investigados *in vitro*. Em baixas concentrações de mel, houve o aumento do crescimento bacteriano, e em concentrações acima de 4,16%, observou-se a redução deste; em concentrações baixas de própolis, não houve alterações significativas no crescimento bacteriano, mas, à medida que se aumentou a concentração, o padrão de crescimento foi alterado, obtendo-se a inibição completa na concentração de 0,4% de própolis. No estudo *in vivo*, os voluntários bochecharam 5mL de mel durante 4 minutos, quando se observou uma redução de 60% e 40% na contagem de bactérias totais viáveis, e de 58% e 54% na contagem de *Streptococcus mutans*, respectivamente, dez minutos e uma hora após os bochechos. Em relação à própolis, a solução bochechada pelos voluntários foi de 0,2%, durante 1,5 minutos, observando-se redução de 38% na contagem de totais viáveis e 42% na contagem de *Streptococcus mutans*, após 10 minutos da realização do bochecho (STEINBERG *et al.*, 1996).

A GTF é a responsável pela síntese de glucanos a partir da sacarose, que são essenciais para o metabolismo das bactérias componentes do biofilme cariogênico. Em um estudo que comparou amostras de própolis de vários estados brasileiros em relação a sua capacidade antibacteriana e de inibir a enzima GTF, concluiu-se que todas as amostras testadas inibiram o volume da produção de GTF por *Streptococcus mutans*, merecendo destaque as amostras do Rio Grande do Sul (inibição=30,5%) e do Mato Grosso do Sul (inibição= 19,4%), cujos halos de inibição

para *Streptococcus mutans* foram de 3,0mm e 1,5mm, respectivamente (PARK *et al*, 1998).

Ao abordarem a atividade antimicrobiana da própolis (nas concentrações de 1 a 10mg/mL) sobre bactérias recém-isoladas da cavidade bucal, observou-se evidente atividade antibacteriana dessa substância sobre todas as cepas testadas, na seguinte ordem de sensibilidade: *Streptococcus mutans* > *Lactobacillus* sp. > *Staphylococcus aureus* > *Staphylococcus epidermidis*, indicando a possibilidade de utilizá-la frente a infecções oportunistas causadas por esses microrganismos e também na clínica odontológica, com a finalidade de controlar a atividade de cárie (OTA *et al.*, 1998).

A associação de própolis 5% acrescida de NaF 0,05% e deste isolado, foram avaliados sobre a redução de estreptococos do grupo mutans em pacientes com atividade de cárie. Foram realizados bochechos durante 15 dias; no final desse período, observou-se que a solução de própolis acrescida ao fluoreto reduziu os níveis salivares desses microrganismos em cerca de 66,93%, o que não foi observado no grupo de voluntários que bochecharam apenas o fluoreto de sódio 0,05% (controle). Decorridos 15 dias após o último bochecho, os níveis salivares desses microrganismos tenderam aos valores iniciais (ZÁRATE-PEREIRA, 1999).

No mesmo ano, estudou-se a microdureza do esmalte submetido à própolis. No estudo *in vitro*, os blocos de esmalte foram imersos, durante uma hora, em soluções de própolis a 0,4%, 1,0% e 2,0%. Verificou-se que houve aumento na microdureza (remineralização) dos espécimes na ordem de 8,24%; 26,9% e 53,65%, quando submetidos soluções de 0,4%; 1,0% e 2,0%, respectivamente (GIAMALIA *et al.*, 1999).

Os EEP oriundos dos Estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul foram averiguados quanto a sua capacidade de inibir a GTF-B (responsável pela síntese de glucanos insolúveis); GTF-C (sintetiza glucanos solúveis e insolúveis) e a GTF-D (que sintetiza glucanos solúveis) obtidas em duas versões: GTF purificada em solução e GTF adsorvida à superfície de blocos de esmalte dentário cobertos por saliva. Os EEP das duas regiões apresentaram atividade inibitória a todas as GTFs em solução (75-95%) e adsorvidas ao esmalte (45-95%), quando concentradas entre 0,75% e 3,0 mg/mL (KOO *et al.*, 2000a).

Em estudo *in vitro* que comparou o efeito de uma nova variedade de própolis oriunda da Bahia (na concentração de 50µg/mL) em relação à própolis de Minas

Gerais (400µg/mL) sobre os estreptococos do grupo mutans (EGM), verificou-se que ambas demonstraram atividade contra esses microrganismos, porém, a amostra baiana apresentou melhores resultados no que se referiu à inibição do crescimento dessas bactérias, aderência celular e síntese de glucanos insolúveis (KOO *et al.*, 2000b).

A comparação *in vitro* da atividade antimicrobiana da própolis 10% e da *Arnica Montana* na mesma concentração, contra patógenos orais, demonstrou que a própolis teve capacidade inibitória significativa para todos os microrganismos testados, com ação similar em relação à aderência bacteriana e à síntese de glucanos insolúveis, comportamento não observado nas amostras de arnica (KOO *et al.*, 2000c).

Koo *et al.* (2002a) avaliaram o efeito de um colutório à base de própolis 20% no acúmulo de placa e na formação de polissacarídeos insolúveis. Os voluntários que fizeram o uso do colutório sob desafio cariogênico (obtido através de bochechos de sacarose 20%, durante 5 vezes ao dia) obtiveram significativos menores índice de placa e concentração de polissacarídeos insolúveis presentes no biofilme quando comparados ao grupo placebo.

Os efeitos dos componentes encontrados na própolis (flavonóides e derivados do ácido cinâmico) oriunda do Rio Grande do Sul, foram testados sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* e na atividade da GTF em solução e em superfície de hidroxiapatita coberta por saliva. Dentre esses compostos, os flavonóides (apigenina 135µg/mL e tt-farnesol 14-28 µg/mL), se comportaram como potentes inibidores da GTF e do crescimento bacteriano, respectivamente (KOO *et al.*, 2002b).

Ao analisarem a ação de dois componentes da própolis (apigenin e tt-farnesol), sobre o desenvolvimento de cáries em ratos, observou-se que a associação desses componentes obteve efeito cariostático. O apigenin demonstrou ser o primeiro agente cariostático natural, devido a sua habilidade em inibir a GTF, diminuindo a síntese de glucanos em níveis até então não observados. Esses compostos agem nos fatores de virulência das bactérias e/ou em seu metabolismo cariogênico, e quando associados ao uso de fluoretos, podem aumentar o efeito destes no equilíbrio do processo de desmineralização/remineralização do esmalte dental (KOO *et al.*, 2003).

Um estudo *in situ* que avaliou a ação da própolis de *Apis mellifera* 5% associada ao NaF 0,05% no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental, evidenciou que houve significativa redução das contagens microbianas na ordem de 75,5%; 50,0%; 46,5% e 36,6%, para a população de estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e total de bactérias viáveis, respectivamente, quando expostos a esse composto. Além disso, verificou-se a redução da perda mineral nas lesões de cárie que foram submetidas à terapia de associação, sob desafio cariogênico (ZÁRATE-PEREIRA, 2003).

A influência de dois importantes componentes da própolis - apigenin e *tt*-farnesol – associados ao fluoreto, sobre o controle do biofilme cariogênico, foi novamente investigada por KOO *et al.* (2005). O estudo demonstrou que a associação aumentou as propriedades anti-cárie do fluoreto pela ação sinérgica dos componentes. Em geral, os biofilmes expostos a essa combinação desenvolveram menores biomassa e quantidade de glucanos insolúveis e polissacarídeos intracelulares em relação aos biofilmes tratados com essas substâncias isoladamente. Para os autores, a combinação desses agentes com o flúor pode representar uma utilidade potencial e um enfoque alternativo para as atuais estratégias quimioterápicas, com vistas à prevenção da doença cárie, pela redução da expressão de virulência dos *Streptococcus mutans*, sem necessariamente suprimir a flora bacteriana oral residente.

O apigenin é considerado um potente inibidor da atividade das GTF, afeta o acúmulo de *Streptococcus mutans* pela redução da formação de glucanos insolúveis e pelo aumento do conteúdo de glucanos solúveis da matriz de polissacarídeos nos biofilmes *in vitro*. Evidenciou-se a influência do apigenin na expressão dos genes *gtf* B, C e D de *Streptococcus mutans*, a qual pode ser induzida pela sacarose, revelando que, na presença desse composto, a expressão de *gtf* B e C diminuiu mais que 50% e quando houve a adição de sacarose, nenhum efeito foi observado no perfil de expressão desses genes. Em contraste, a expressão do *gtf* D foi aumentada. Nesse estudo, ficou claro o efeito do apigenin na expressão dos genes envolvidos na síntese de polissacarídeos extra-celulares (PECs), indicando que esse flavonóide possui características terapêuticas únicas, pois afeta a atividade e a expressão das enzimas GTF, sem desencadear efeitos antibacterianos, característica que pode ser responsável pelas suas propriedades anti-cárie (KOO *et al.*, 2006).

No mesmo ano, foram averiguadas a influência do EEP 5% sobre biofilmes de *Streptococcus mutans* e no desenvolvimento de cárie em ratos expostos ao alto desafio cariogênico pela ingestão de dieta cariogênica e água acrescida de sacarose 5%. Os dados do estudo indicaram hipóteses pelas quais o EEP utilizado possa ter exercido efeito cariostático: a redução da acidogênese pelo biofilme estreptocócico; a inativação do sistema F-ATPase de translocação de prótons e a inibição da síntese de glucanos insolúveis pelas enzimas GTF. A perturbação desses fatores de virulência, que são críticos aos *Streptococcus mutans*, particularizou a utilização da própolis na concentração empregada a fim da obtenção de efeito cariostático, sem que a viabilidade da microflora residente fosse afetada (DUARTE *et al.*, 2006).

Com o objetivo de se avaliar a ação de uma solução antisséptica de EEP a 6,25% e de clorexidina 0,12% (controle positivo) sobre o Índice de Higiene Oral Simplificado (IHO-S), Índice de Sangramento Gengival (ISG) e na contagem de *Streptococcus mutans*, verificou-se uma redução de 72,3% e 75,3% nos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, utilizando-se o EEP e o controle positivo, respectivamente, após 24 horas do término da realização dos bochechos. Após 21 dias, as contagens de *Streptococcus mutans* estavam próximas aos valores iniciais para ambas as soluções. Em todas as contagens bacterianas realizadas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na atuação das duas soluções. A análise do ISG revelou uma redução significativa no incremento da doença pela utilização do EEP; comparando-se os valores do IHO-S prévio e posterior aos bochechos, notou-se que a solução de própolis não promoveu redução significativa nesse índice, quando comparada com a solução de clorexidina. Concluiu-se que a solução empregada reduziu significativamente os níveis salivares de *Streptococcus mutans* e atuou sobre as condições gengivais, podendo ser indicada como agente de controle químico terapêutico do biofilme dental (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Em um ensaio clínico duplo cego randomizado, a efetividade da associação de um EEP 5% ao NaF 0,05% foi testada sobre a contagem dos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, o acúmulo de biofilme dental e a quantificação das manchas brancas ativas. Os voluntários (n=97) foram divididos em dois grupos que receberam aplicações tópicas consecutivas dos géis experimentais (uma vez por semana, durante 4 semanas). Após 24h e 15 dias do término das aplicações, novas contagens de *Streptococcus mutans* foram realizadas. Decorridas 48h após a última aplicação tópica, mensurou-se o acúmulo do biofilme dental. Revelou-se o teor dos

géis experimentais, verificando-se que o Gel A constituía-se de EEP 5% associada ao NaF 0,05%, e o Gel B possuía somente o EEP 5%. Os resultados obtidos demonstraram a superioridade do Gel A em relação ao Gel B, com diferenças estatisticamente significativas entre os géis testados, principalmente no que se referia à diminuição dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* e à inativação de manchas brancas. Concluiu-se que a associação foi eficaz na redução dos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, eficiente na remineralização de manchas brancas e reduziu significativamente o acúmulo de biofilme (DE CARLI, 2007).

A utilização de flavonóides específicos encontrados na própolis foi mencionada como estratégia para aumentar os efeitos biológicos dos fluoretos sobre o biofilme dental, constituindo uma terapia alternativa contra o biofilme cariogênico (KOO, 2008; KOO; JEON, 2009). Nesses dois estudos, os autores evidenciaram que em concentrações baixas, a associação do apigenin (1mM), tt-farnesol (5mM) e do fluoreto (250 ppm) foi capaz de afetar a patogenicidade de *Streptococcus mutans* em biofilmes, através da inibição da síntese de glucanos insolúveis pela redução da atividade das glicosiltransferases B e C; pela modulação da expressão de gene *gtf B* e *C* em nível transcricional; por perturbar a variação do pH através da membrana celular e pela inibição da síntese e acúmulo de polissacarídeos intracelulares. Desse modo, essa terapia combinatória atuou sobre fatores de virulência críticos dos *Streptococcus mutans* e, claramente, aumentaram as propriedades cariostáticas do fluoreto, sem alterar a microbiota residente.

3 OBJETIVO

Verificar o efeito de um Extrato Etanólico de Própolis isolado e associado ao fluoreto de sódio, sobre a microbiota cariogênica e nos processos de remineralização e desmineralização do esmalte dentário, sob desafio cariogênico.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Tipo de estudo

Esse estudo foi do tipo experimental, cego (na análise microbiológica e da microdureza em corte transversal) e randomizado.

4.2 Desenho experimental

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (protocolo nº 1393; ANEXO A) e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), 30 voluntários (cujos critérios de inclusão/exclusão estão listados na Figura 1) integraram esse estudo.

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
<ol style="list-style-type: none">1) Idade entre 18 e 40 anos.2) Presença de, no mínimo, 28 dentes.3) Ausência de atividade das doenças cárie e periodontal.4) Realização de higiene bucal ao menos 2 vezes ao dia.5) Concordância dos voluntários em não utilizarem outros produtos para o controle químico do biofilme dental durante o período experimental.6) Fluxo salivar estimulado $\geq 0,7$ mL/min.7) Ausência de patologia sistêmica.8) Ter acesso à água fluoretada.	<ol style="list-style-type: none">1) Estar em tratamento odontológico.2) Ser alérgico a algum produto/medicamento utilizado na pesquisa.3) Alterações anátomo-patológicas da mucosa oral ou presença de agravos sistêmicos com manifestações orais.4) Utilização de bochechos ou géis fluoretados / antimicrobianos até 14 dias prévios ao início da utilização dos aparelhos palatinos, e entre as fases do estudo.5) Gestantes/ Lactantes.6) Utilização de antibióticos até 3 meses prévios ao início do experimento.7) Desordens alimentares.

Figura 1 – Critérios de inclusão e exclusão

Os blocos de esmalte (n=540) foram obtidos a partir de terceiros molares humanos totalmente inclusos e extraídos por indicação clínica. Após a exodontia, os dentes foram estocados em solução de formaldeído 2% (pH 7,0) pelo período mínimo de um mês (WHITE, 1987). Secções foram realizadas nas faces vestibular e lingual dos molares, utilizando-se discos diamantados dupla face (KG). No final, os espécimes obtidos apresentaram dimensões de 3x3x3 mm (CURY *et al.*, 2000),

aferidos com paquímetro (Starret, modelo 727). Até o momento de sua utilização, os mesmos foram mantidos em água deionizada. Destes, foram sorteadas 180 unidades para a obtenção dos valores *baseline* da microdureza e os restantes foram randomicamente destinados aos dispositivos palatinos.

Para a confecção dos dispositivos intrabucais, os voluntários foram moldados com alginato (Jeltrate® Plus™) e os modelos vazados em gesso pedra (Herodent). Sobre os modelos, os dispositivos foram confeccionados em resina acrílica quimicamente ativada (OrtoClas, artigos odontológicos clássicos Ltda, Brasil).

A fixação dos blocos de esmalte nos dispositivos foi realizada com cera utilidade (Epoxyglass Ind. Com. de Produtos Químicos, Brasil). Em seguida, os mesmos foram cobertos com uma tela plástica, a qual foi posicionada a 1mm destes, a fim de propiciar o acúmulo do biofilme (BENELLI *et al.*, 1993; CURY *et al.*, 1997).

Os voluntários utilizaram aparelhos palatinos contendo 6 blocos de esmalte dental humano durante 24 h diárias (Figura 2 – A, B e C).

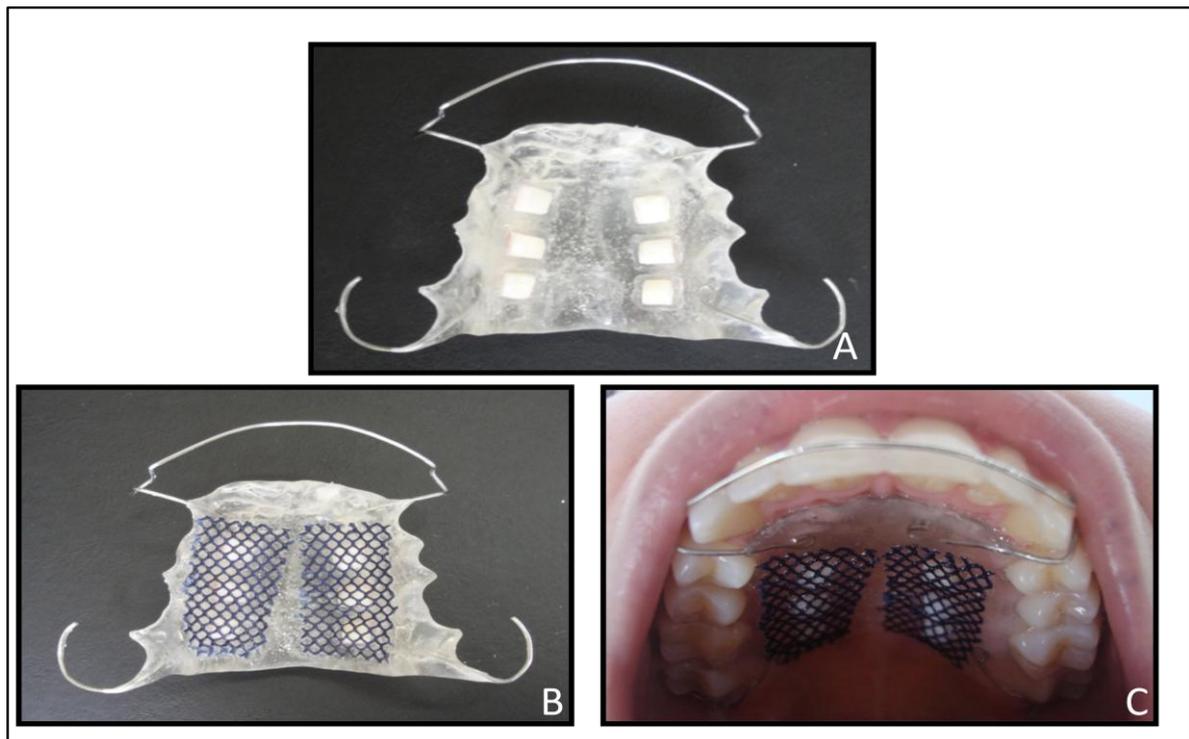


Figura 2 – Dispositivo palatino

(A – Blocos de esmalte inseridos e fixados com cera; B – Blocos recobertos com tela plástica; C – Posicionamento do dispositivo palatino *in situ*).

Esse estudo *in situ* foi constituído de duas fases de 14 dias cada, conforme estudo de Paes Leme *et al.* (2004). Os blocos de esmalte foram submetidos ao

desafio cariogênico (DC) e tratamentos, de acordo com o grupo experimental ao qual pertenciam: (1) DC+Controle (C); (2) DC+NaF 0,05%; (3) DC+EEP 5%; (4) DC+NaF 0,05% + EEP 5%; (5) DC+Flúor-Fosfato-Acidulado 1,23% (FFA), conforme o desenho do estudo (Figura 3).

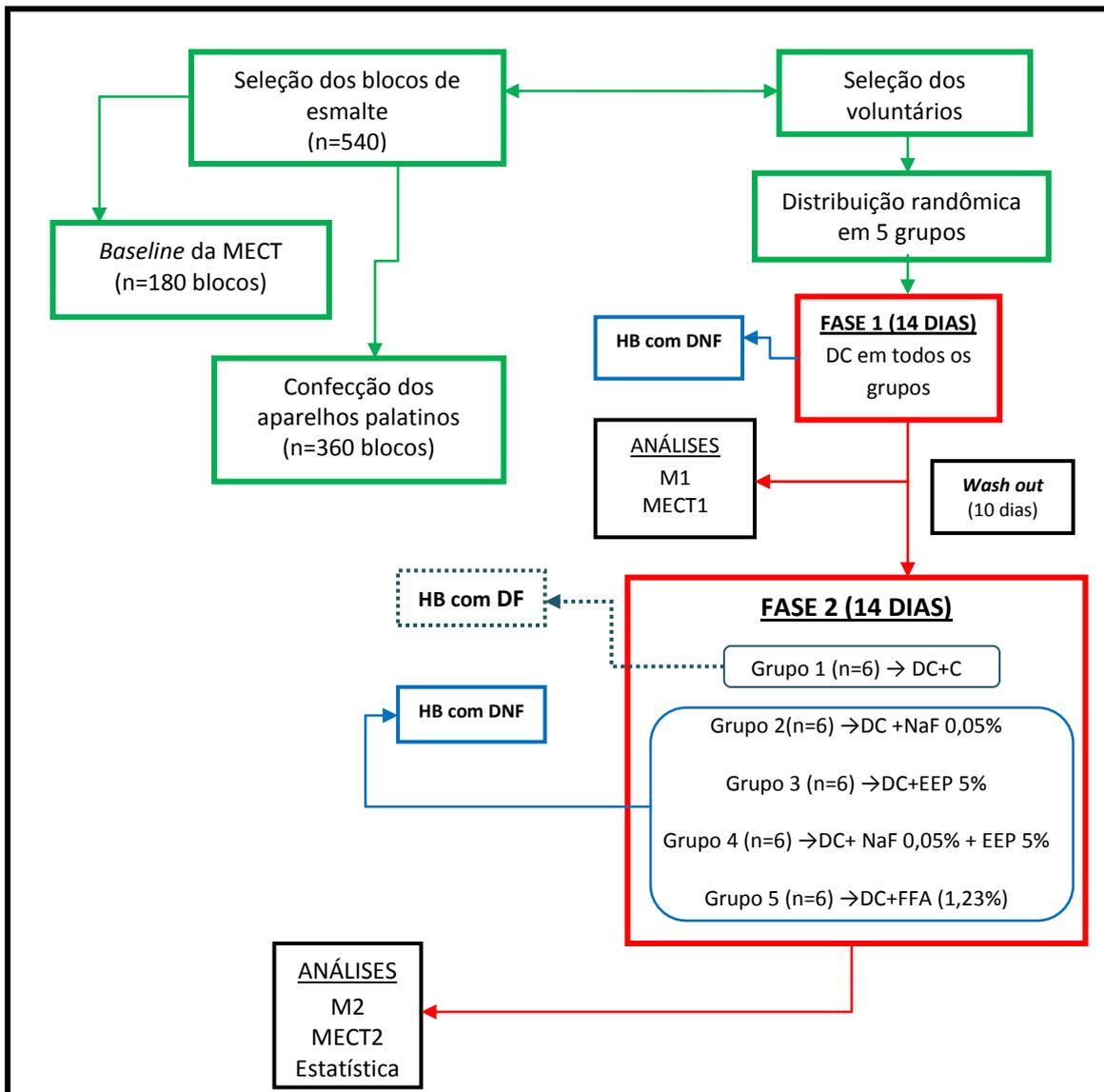


Figura 3 – Desenho do estudo

MECT: microdureza do esmalte em corte transversal; MECT1: microdureza do esmalte em corte transversal na Fase 1; MECT2: microdureza do esmalte em corte transversal na Fase 2; M1: análise microbiológica na Fase 1; M2: análise microbiológica na Fase 2; DC: desafio cariogênico; HB: higiene bucal; DNF: dentifício não fluoretado; DF: dentifício fluoretado; C: controle; EEP: extrato etanólico de própolis; FFA: flúor fosfato acidulado.

Durante o experimento, os voluntários realizaram higiene bucal (HB) com dentifício não-fluoretado (DNF), exceto os do grupo 1, que utilizaram dentifício

fluoretado (DF) durante a Fase 2. O DC consistiu em se gotejar sacarose 20%, 8 vezes ao dia (CURY *et al.*, 2000) sobre os blocos de esmalte fixados nos dispositivos palatinos durante as fases experimentais. Ao final da Fase 1, os blocos de esmalte foram removidos e realizou-se a análise microbiológica do biofilme cariogênico e a mensuração da microdureza em corte transversal. Após o período *wash out* (10 dias), iniciou-se a Fase 2, em que novos blocos de esmalte foram submetidos ao DC e aos tratamentos de cada grupo experimental. Novamente, realizou-se análise microbiológica e da microdureza em corte transversal.

Nos grupos 2, 3 e 4, duas gotas das soluções-teste foram gotejadas sobre os blocos de esmalte após a última higienização bucal diária, e no grupo 5, foi realizada Aplicação tópica de flúor (ATF) com FFA 1,23% após a última higienização bucal do 7º e do 14º dia.

4.3 Obtenção do EEP

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) do EEP foi obtida pela técnica da diluição. O ensaio demonstrou que o extrato foi bactericida na concentração de 1%, enquanto nos tubos controle não foi verificado efeito antibacteriano. Devido às características inerentes ao meio bucal, optou-se pelo uso do extrato na concentração 5 vezes superior à CBM (ZÁRATE-PEREIRA, 2003).

Para a preparação da solução, utilizaram-se 892g de própolis (tipo verde), originada da espécie botânica *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), a qual, até a preparação dos extratos, foi armazenada em sacos plásticos hermeticamente fechados, sob temperatura de 4°C. Após trituração manual, foi acrescentado etanol PA (CHEMCO, Brasil) e a solução levada ao ultrassom (THORNTON T14, USA) para extração de seus constituintes. Procedeu-se a filtração em papel absorvente e acrescentou-se etanol PA (CHEMCO, Brasil) de forma a cobrir o precipitado, sendo novamente levado ao ultrassom. Esse processo foi repetido 5 vezes e o precipitado obtido foi levado ao rotaevaporador (FISATOM, USA) para remoção do etanol, obtendo-se o extrato etanólico bruto da própolis (EEBP), com massa de 405g. A este, foi acrescentado hexano para separação da parte apolar da polar, a qual contém os constituintes moleculares de classe antimicrobiana – flavonóides e terpenos. Foi preparada uma solução com água destilada e álcool de cereais PA

(80:20), acrescentando 50g de própolis (somente com a porção polar) em 1000mL dessa solução, obtendo-se o EEP 5 %.

4.4 Análise microbiológica do biofilme cariogênico

Ao final de cada fase, doze horas após a última exposição às soluções, a tela que cobria os blocos de esmalte foi removida. O biofilme acumulado foi retirado com bolinhas de algodão autoclavadas e as mesmas transferidas para tubos de ensaio contendo 3mL de meio de transporte VMGA III, após a liquefação deste em estufa (37°C, 30 minutos).

Após homogeneização, realizaram-se diluições seriadas em água peptonada até 10^{-3} de cada uma das 6 amostras de biofilme coletadas de cada voluntário. Alíquotas de 0,1mL de cada diluição foram inoculadas em mitis salivarius agar (Difco; Sparks, Md., USA) para contagem de *Streptococcus* totais; mitis salivarius agar (Difco; Sparks, Md., USA) acrescido de 0.2 unidades de bacitracina/mL (GOLD *et al.*, 1973) para contagem de *Streptococcus mutans*; ágar Brucella suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, hemina (5µg/mL) e vitamina K (2,5µg/mL), para contagem de microrganismos totais viáveis; e ágar SL Rogosa (Difco; Sparks, Md., USA) para determinação das UFC de lactobacilos. Após a incubação (37°C, 48 horas), efetuaram-se as contagens das UFC características (UFC/mg de biofilme), com auxílio de microscópio esteroscópico (INALH[®], México).

4.5 Análise da microdureza em corte transversal

Após a remoção dos blocos dos dispositivos palatinos, estes foram embutidos em suportes plásticos com resina quimicamente ativada, de modo que uma das faces laterais ficasse exposta (Figura 4), possibilitando a realização do ensaio de microdureza em corte transversal. Com esse intuito, os espécimes foram levados à politriz (Struers), onde foram polidos com discos de lixa d'água (granulações 120, 240, 600 e 1200), sob refrigeração. Em seguida, o polimento final foi realizado, com a utilização de discos de feltro com 3µm e 1µm de granulação, durante 1 minuto (ZÁRATE-PEREIRA, 2003).



Figura 4 – Blocos de esmalte preparados para o ensaio de microdureza

Para a obtenção dos valores *baseline* e após cada fase experimental, a microdureza de cada bloco dos 5 grupos foi mensurada a 50, 100 e 150 μ m da superfície, com um penetrador de diamante para dureza Knoop, em microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2, Shimadzu Corporation – Figura 5). Em cada profundidade, foram realizadas 3 edentações (9 por bloco), com o penetrador paralelo à superfície externa do esmalte e carga de 25g/5 segundos (CURY *et al.*, 2000).



Figura 5 - Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2
(Fonte: Shimadzu Corporation)

4.6 Análise estatística

A comparação entre as fases 1 e 2, em relação à análise microbiológica e à microdureza foi realizada por meio do teste t-Student pareado. O teste ANOVA de uma via e o pós-teste de Tukey foram utilizados para a comparação entre os grupos experimentais em relação às variáveis dependentes, ganho mineral e recuperação da microdureza. A correlação linear entre os microrganismos pesquisados e a microdureza do esmalte foi verificada pelo teste de Correlação Linear de Pearson. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* SigmaStat (versão 2.0), considerando, na comparação entre fases e grupos experimentais, nível de significância de 5%.

Para o cálculo do Ganho Mineral (GM) e da Recuperação da Microdureza (RM) foram utilizadas as seguintes fórmulas, respectivamente:

$$GM = \frac{(100[MECT2 - MECT1])}{MECT1}$$

$$RM = \frac{(100[MECT2 - MECT1])}{(BMECT - MECT1)}$$

Onde:

MECT1 = valor da microdureza do esmalte em corte transversal na Fase 1.

MECT2 = valor da microdureza do esmalte em corte transversal na Fase 2.

BMECT = valor *baseline* da microdureza do esmalte em corte transversal, por profundidade.

5 RESULTADOS

A Tabela 1 demonstra a análise microbiológica do biofilme bacteriano dental nas diferentes fases experimentais do estudo.

Tabela 1- Média (\pm DP) de UFC dos diferentes microrganismos conforme o grupo e fase experimentais

Variável	Grupos	Fase		P ⁽¹⁾ (entre fases)
		1	2	
SM	Controle	66,14 \pm 3,96b	53,36 \pm 2,57a	0,003
	NaF 0,05%	72,50 \pm 2,01a	54,44 \pm 1,16a	<0,001
	EEP 5%	71,47 \pm 1,78a	39,89 \pm 0,36b	<0,001
	NaF 0,05% + EEP 5%	70,25 \pm 0,67ab	23,67 \pm 1,28c	<0,001
	FFA	71,00 \pm 4,00a	44,00 \pm 1,12b	<0,001
	p ⁽²⁾ (entre grupos)	0,006	<0,001	
ST	Controle	82,58 \pm 3,87a	71,08 \pm 1,41a	0,001
	NaF 0,05%	86,33 \pm 8,54a	53,78 \pm 2,12b	<0,001
	EEP 5%	85,64 \pm 2,51a	41,55 \pm 1,78c	<0,001
	NaF 0,05% + EEP 5%	85,70 \pm 4,22a	18,59 \pm 0,76d	<0,001
	FFA	83,84 \pm 3,08a	19,20 \pm 1,33d	<0,001
	p ⁽²⁾ (entre grupos)	0,667	<0,001	
LB	Controle	40,25 \pm 0,62a	35,22 \pm 0,96a	<0,001
	NaF 0,05%	39,83 \pm 0,65a	34,06 \pm 0,83a	<0,001
	EEP 5%	39,56 \pm 0,85a	24,89 \pm 0,58c	<0,001
	NaF 0,05% + EEP 5%	40,56 \pm 1,62a	15,14 \pm 1,01d	<0,001
	FFA	39,75 \pm 0,74a	27,03 \pm 1,35b	<0,001
	p ⁽²⁾ (entre grupos)	0,398	<0,001	
MTV	Controle	120,78 \pm 1,38a	113,03 \pm 1,92a	<0,001
	NaF 0,05%	120,08 \pm 1,26a	104,58 \pm 0,83b	<0,001
	EEP 5%	120,78 \pm 1,10a	89,89 \pm 0,34c	<0,001
	NaF 0,05% + EEP 5%	120,20 \pm 1,24a	66,64 \pm 2,94d	<0,001
	FFA	120,28 \pm 0,87a	90,25 \pm 1,43c	<0,001
	p ⁽²⁾ (entre grupos)	0,754	<0,001	

⁽¹⁾ Valor descritivo para o teste t de student pareado; ⁽²⁾ Valor descritivo para o teste ANOVA (Uma Via) e Pós-Teste de Tukey; abcd= letras diferentes (diferença significativa) e letras iguais (ausência de diferença significativa); UFC: unidades formadoras de colônias; SM: *Streptococcus mutans*; ET: estreptococos totais; LB: lactobacilos; MTV: microrganismos totais viáveis.

Os dados apresentados na Tabela 1 revelam o melhor desempenho da terapia de associação na supressão das contagens bacterianas de SM, LB e MTV ($p < 0,001$). Para a diminuição dos níveis de ST, a terapia de associação foi efetiva e semelhante à do FFA ($p < 0,001$).

Os valores da microdureza do esmalte em corte transversal nas diferentes profundidades estão representados na Tabela 2.

Tabela 2- Média (\pm DP) da microdureza do esmalte em corte transversal conforme a profundidade, grupo e fases experimentais

Profundidade	Grupos	Fase		p ⁽¹⁾ (entre fases)
		1	2	
50 μ m	<i>Baseline</i>	376,19 \pm 2,52a		
	Controle	198,08 \pm 0,23b	208,58 \pm 2,41f	<0,001
	NaF 0,05%	197,00 \pm 1,25b	295,31 \pm 1,76e	<0,001
	EEP 5%	197,39 \pm 2,15b	309,81 \pm 0,40d	<0,001
	NaF 0,05%+EEP 5%	196,53 \pm 4,00b	364,86 \pm 1,26a	<0,001
	FFA	196,31 \pm 3,81b	324,83 \pm 3,37c	<0,001
	p ⁽²⁾ (entre grupos)	<0,001	<0,001	
100 μ m	<i>Baseline</i>	354,12 \pm 14,26a		
	Controle	240,78 \pm 1,12b	233,31 \pm 0,64c	<0,001
	NaF 0,05%	241,64 \pm 0,76b	301,20 \pm 0,98b	<0,001
	EEP 5%	240,72 \pm 1,54b	300,39 \pm 0,47c	<0,001
	NaF 0,05%+EEP 5%	240,55 \pm 1,64b	339,22 \pm 1,44a	<0,001
	FFA	240,92 \pm 1,63b	303,81 \pm 5,46b	<0,001
	p ⁽²⁾ (entre grupos)	<0,001	<0,001	
150 μ m	<i>Baseline</i>	341,72 \pm 1,90a		
	Controle	262,25 \pm 1,68bc	252,45 \pm 1,88d	<0,001
	NaF 0,05%	262,64 \pm 1,84b	250,36 \pm 2,42d	<0,001
	EEP 5%	262,95 \pm 3,42b	260,89 \pm 0,95b	0,291
	NaF 0,05%+EEP 5%	261,22 \pm 5,38bc	294,64 \pm 4,74b	<0,001
	FFA	258,70 \pm 4,68c	261,89 \pm 1,88c	0,207
	p ⁽²⁾ (entre grupos)	<0,001	<0,001	

⁽¹⁾ Valor descritivo para o teste t de student pareado; ⁽²⁾ Valor descritivo para o teste ANOVA (Uma Via) e Pós-Teste de Tukey; abcd= letras diferentes (diferença significativa) e letras iguais (ausência de diferença significativa).

Na Tabela 2, evidenciou-se, em relação aos valores *baseline*, a diminuição da microdureza do esmalte na Fase 1 e aumento desta na Fase 2 ($p < 0,001$) principalmente aos 50 e 100 μ m de profundidade, com destaque para o efeito da terapia combinatória inclusive aos 150 μ m de profundidade ($p < 0,001$).

A Tabela 3 apresenta os dados sobre o ganho mineral e recuperação da microdureza dos blocos de esmalte. A Figura 6 representa a relação entre a microdureza do esmalte (50 μ m superficiais) e os microrganismos avaliados.

Tabela 3 – Médias e desvios - padrão do ganho mineral (GM) e recuperação da Microdureza do esmalte (RM) conforme a profundidade e grupos experimentais

Profundidade	Grupos	Variável	
		GM (%)	RM (%)
50 μ m	Controle	5,30 \pm 1,21e	5,89 \pm 1,34e
	NaF 0,05%	49,91 \pm 1,65d	54,86 \pm 1,19d
	EEP 5%	56,97 \pm 1,86c	62,87 \pm 0,60c
	NaF 0,05%+ EEP 5%	85,72 \pm 4,03a	93,69 \pm 0,76a
	FFA	65,51 \pm 2,37b	71,46 \pm 0,90b
	p ⁽¹⁾ (entre grupos)	<0,001	<0,001
100 μ m	Controle	-3,10 \pm 0,62c	-6,60 \pm 1,40c
	NaF 0,05%	24,65 \pm 0,60b	52,95 \pm 0,96b
	EEP 5%	24,79 \pm 0,82b	52,61 \pm 0,74b
	NaF 0,05%+EEP 5%	41,02 \pm 0,72a	86,89 \pm 1,15a
	FFA	26,12 \pm 3,06b	55,50 \pm 5,31b
	p ⁽¹⁾ (entre grupos)	<0,001	<0,001
150 μ m	Controle	-3,74 \pm 1,03c	-12,39 \pm 3,56c
	NaF 0,05%	-4,67 \pm 1,04d	-15,57 \pm 3,72d
	EEP 5%	-0,77 \pm 1,62bc	-2,81 \pm 5,43bc
	NaF 0,05%+EEP 5%	12,84 \pm 3,38a	41,21 \pm 8,04a
	FFA	1,26 \pm 2,11b	3,57 \pm 6,31b
	p ⁽¹⁾ (entre grupos)	<0,001	<0,001

⁽¹⁾ Valor descritivo para o teste ANOVA (Uma Via) e Pós-Teste de Tukey; abcd= letras diferentes (diferença significativa) e letras iguais (ausência de diferença significativa).

Na Tabela 3, observou-se que, em todas as profundidades do esmalte testadas, a associação NaF 0,05% + EEP 5% foi a mais efetiva tanto no que se refere ao GM quanto à RM ($p < 0,001$).

A verificação da interferência da inibição do biofilme com o reequilíbrio mineral é demonstrada no gráfico de Correlação Linear.

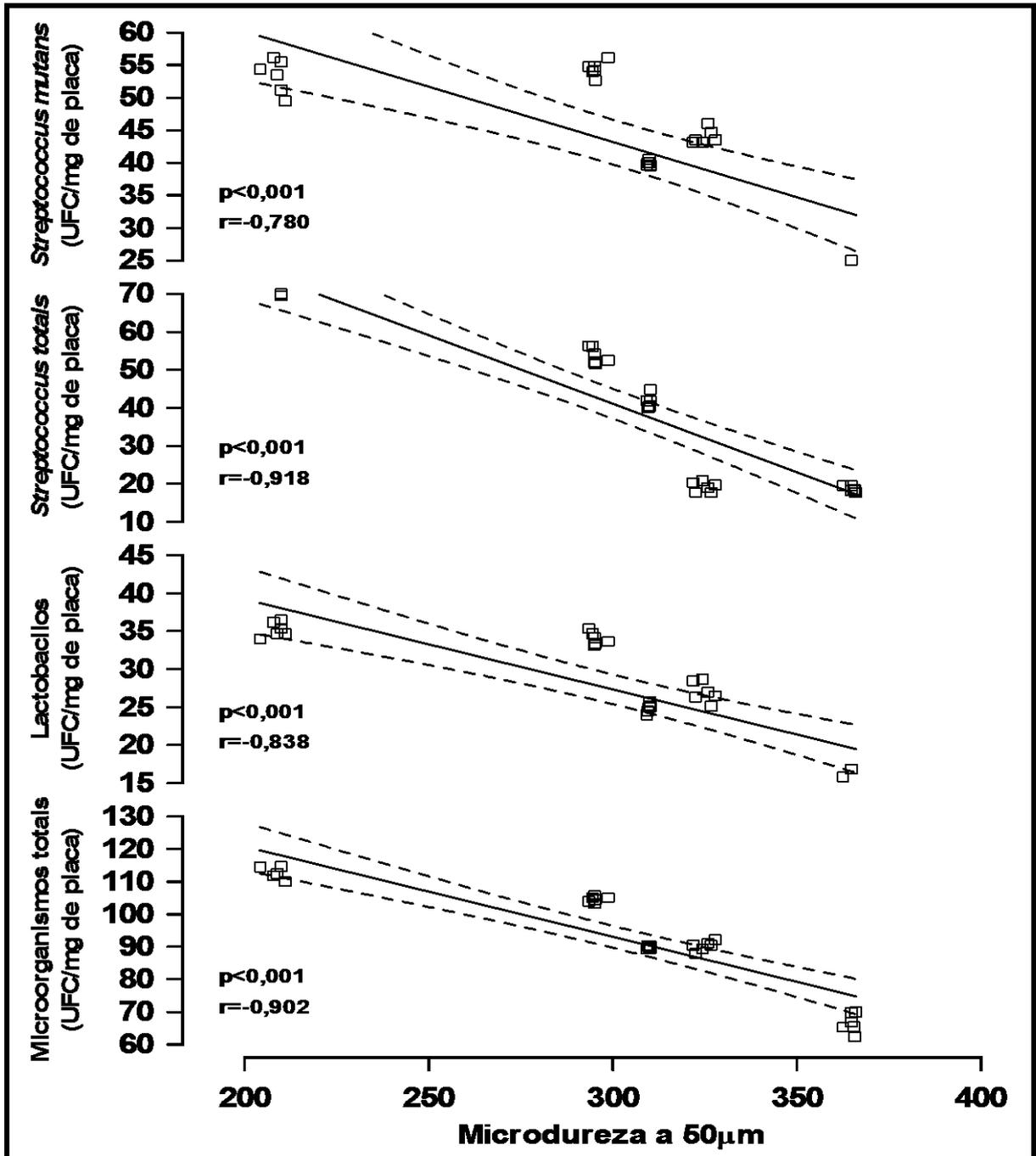


Figura 6 – Correlação linear entre a microdureza do esmalte (50µm de profundidade) e microrganismos testados

6 DISCUSSÃO

Esse estudo foi capaz de simular a dinâmica do processo DES-RE, o que foi verificado pela redução da microdureza do esmalte em corte transversal nas três profundidades avaliadas (50, 100 e 150µm), quando este foi submetido ao desafio cariogênico (Tabela 2).

A análise microbiológica do biofilme cariogênico (Tabela 1) demonstrou que, entre as Fases 1 e 2, houve diminuição significativa nas contagens de todos os microrganismos pesquisados, sendo as diferenças entre os grupos evidenciadas na seguinte ordem: NaF 0,05%+ EEP 5% > EEP 5% > FFA > NaF 0,05% > controle. Essa ordem somente foi invertida para os estreptococos totais, observando-se: NaF 0,05%+ EEP 5% > FFA > EEP 5% > NaF 0,05% > controle. Esses resultados reiteram que os EEP são eficientes antibacterianos (IKENO; MIYASAWA, 1991; GEBARA *et al.*, 1996; STEINBERG *et al.*, 1996; OTA *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 2000ab; KOO *et al.*, 2003; KOO *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.* 2006) e que a sua associação ao NaF 0,05% potencializa essa característica (KOO *et al.*, 2003; KOO *et al.*, 2005; DUARTE *et al.*, 2006; KOO, 2008; KOO; JEON, 2009), tendo em vista que houve diferença significativa entre o grupo das soluções associadas em relação aos grupos que as utilizaram separadamente. É importante destacar que, nos blocos que receberam NaF 1,23% (grupo 5), as contagens bacterianas foram superiores em relação às do grupo 4 (NaF0,05%+EEP5%), provavelmente devido a algum efeito sinérgico oriundo dessa associação, tendo em vista a característica cariostática do primeiro.

Pela análise do esmalte (Tabela 2), verificou-se aumento no valor da microdureza na Fase 2 e entre os grupos, em todas as profundidades do esmalte, o que concorda com estudos prévios (GIAMALIA *et al.*, 1999; ZÁRATE-PEREIRA, 2003). Esse aumento foi mais evidente nos 50µm superficiais, profundidade em que houve diferença significativa entre todos os grupos e entre as duas fases, com melhor desempenho da solução de NaF0,05%+EEP5%, seguida do FFA, EEP5%, NaF0,5% e controle. Tanto nos 50 quanto aos 100µm, a exposição à terapia de combinação proporcionou o retorno da microdureza a valores muito próximos aos do *baseline* dessa variável nas respectivas profundidades, o que demonstra a efetividade relevante dessa associação no que se refere ao reequilíbrio mineral do esmalte. Assim, a presença constante do NaF 0,05% (tendo em vista que, durante o

experimento, as aplicações dessa solução foram diárias) e em baixos níveis no ambiente bucal, promoveu a precipitação de minerais na superfície externa do esmalte de maneira ininterrupta (FEATHERSTONE, 1999), em adição à ação bactericida do EEP5%, explicaria seu efeito otimizado em relação, principalmente ao FFA e, também, às outras soluções.

Em relação ao ganho mineral (GM) e recuperação da microdureza (RM), ambos demonstrados na Tabela 3, observou-se diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos experimentais, destacando-se o efeito da terapia de associação (NaF0,05%+EEP5%) em todas as profundidades do esmalte, o que é explicado pelo fato de que os componentes encontrados no EEP têm ação sobre fatores de virulência das bactérias cariogênicas que interferem tanto em seu metabolismo quanto na formação do biofilme dental (KOO *et al.*, 2002; KOO *et al.*, 2003; KOO *et al.*, 2005; KOO, 2008; KOO; JEON, 2009), causando alterações na estrutura e na fase líquida deste, implicando comprovada diminuição no número de UFC/mg placa e, possivelmente, uma maior difusão das soluções antimicrobiana e remineralizante, de modo a reequilibrar o processo DES-RE na interface biofilme-esmalte, favorecendo a remineralização (representada pelo GM e RM).

O paradigma do processo de cárie compreende esta como uma doença biofilme-dependente. Há que se considerar que houve correlação linear significativa entre o aumento da microdureza do esmalte e a diminuição da quantidade de todos os microrganismos presentes no biofilme pesquisado (Figura 6), e não somente das bactérias cariogênicas. Nesse caso, a correlação linear foi negativa, evidenciando um perfil inversamente proporcional entre o valor da microdureza obtido após os tratamentos e o número de microrganismos presentes no biofilme. Dessa forma, infere-se que a ação dos agentes de controle químico do biofilme utilizados nesse estudo foi devida à desorganização da biomassa microbiana como um todo, e não como resultado do efeito dos agentes sobre microrganismos cárie específicos.

Esses achados sustentam a idéia de que, em situações de alto desafio/risco cariogênico, os fluoretos, quando utilizados isoladamente para o reequilíbrio do processo DES-RE, podem não desempenhar sua função de maneira otimizada (OGAARD *et al.*, 1994; FEATHERSTONE, 2009; ten CATE, 2009), o que é compensado pela utilização da terapia de combinação (KOO *et al.*, 2003; KOO *et al.*, 2005; DUARTE *et al.*, 2006; KOO, 2008; KOO; JEON, 2009). Nesse sentido, a possibilidade de utilizar baixos níveis de fluoreto adicionados a antimicrobianos que

não suprimam a microbiota residente, como é o caso da associação abordada nesse estudo (pois a ação foi menor nos microrganismos totais viáveis), seria um grande avanço no que se refere à minimização do risco de intoxicações/fluorose e de trocas ecológicas bacterianas indesejáveis no ambiente bucal, o que concorda com estudo prévio (KOO *et al.*, 2005).

Durante a fase 2, o grupo 1 realizou higiene bucal com dentifrício fluoretado (DF). A introdução dessa variável no desenho do estudo visou a elucidar o quanto a mesma interfere no processo DES-RE e nas contagens microbianas em estudos *in situ*. Verificou-se que não houve diferença significativa entre esse grupo e o grupo 2 (NaF 0,05%) para as contagens de *Streptococcus mutans* e lactobacilos, enquanto que, em relação à microdureza, ocorreu efeito similar entre os mesmos grupos somente aos 150µm de profundidade, em que os valores praticamente equivaleram. Desse modo, embora a utilização do DF represente a realidade do paciente, e, independentemente de estar ou não realizando controle químico adjuvante do biofilme cotidianamente, provavelmente o dentifrício utilizado seja fluoretado, nos estudos *in situ*, não recomendamos sua utilização nos grupos experimentais (mas somente no grupo-controle e durante a Fase 2), a fim de evitar mascaramento dos resultados.

Em relação às terapias de combinação (associativas), mais estudos são necessários para a elucidação de seu mecanismo de ação específico (em nível bacteriano e no processo de desorganização do biofilme dental) e de seu efeito em aspectos microscópicos qualitativos e quantitativos relativos ao processo DES-RE. Além disso, a determinação da citotoxicidade, da mutagenicidade, da atividade inflamatória e de efeitos adversos de agentes bioativos específicos encontrados nos EEP (apigenin e tt-farnesol), os quais já tiveram sua eficácia comprovada contra microrganismos cariogênicos e no controle da cárie dentária, em experimentos *in vitro* e com modelos animais, seria útil para a generalização desses agentes em ensaios clínicos com humanos, o que representaria importante avanço, tendo em vista uma maior especificidade, padronização e controle das soluções testadas.

Embora todas as soluções testadas tenham sido efetivas no controle do processo DES-RE e na supressão dos microrganismos avaliados, a terapia combinatória (EEP 5% + NaF 0,05%) apresentou o melhor desempenho em relação às variáveis testadas.

Os resultados desse experimento representam significativo avanço no que se refere à possibilidade de utilização dos EEPs para o controle da doença cárie, tanto em parâmetros microbiológicos quanto em aspectos físicos inerentes ao processo DES-RE. Nesse sentido, por se tratar de um estudo *in situ*, o qual tem a premissa de simular os eventos ocorridos no ambiente bucal, o fato de que a terapia de associação obteve o melhor desempenho dentre todas as substâncias testadas torna-se mais relevante ainda, principalmente como uma alternativa à utilização do FFA.

Embora haja necessidade de mais estudos nesse campo, como a realização de ensaios semelhantes que utilizem microscopia de luz polarizada, microscopia confocal e microrradiografias, acreditamos que há suporte biológico e físico para que os EEPs (ou, futuramente, algum agente bioativo específico dos EEPs) sejam utilizados para o controle de lesões incipientes de cárie.

7 CONCLUSÃO

Baseado nas condições experimentais desse estudo, concluiu-se que a associação do EEP 5% ao NaF 0,05% é efetiva no reequilíbrio do processo DES-RE e na supressão da microbiota cariogênica, mostrando-se superior às demais soluções avaliadas.

8 REFERÊNCIAS¹

- Addy M. Plaque control as a scientific basis for the prevention of dental caries. *J R Soc Med Suppl* 1986; 79(14):6-10.
- Almeida RVD, Castro RD, Pereira MSV, Paulo MQ, Santos JP, Padilha WWN. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2006; (1):87-92.
- Backer-Dirks O. Post eruptive changes in dental enamel. *J Dent Res* 1966; 3(Suppl):503-11.
- Benelli EM, Serra MC, Rodrigues AL Jr, Cury JA. In situ anticariogenic potencial of glass ionomer cement. *Caries Res* 1993;27:280-4.
- Brumfitt W, Hamilton-Miller JMT, Franklin I. Antibiotic activity of natural products: 1.Propolis. *Microbios* 1990; 62:19-22.
- Buischi Y, Axelsson P, Barbosa MFZ, Mayer MPA, Prado MCQB, Oliveira LB. Salivary *Streptococcus mutans* and caries prevalence in Brazilian schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17:28-30.
- Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA. In situ relationship between exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997;31:356-60.
- Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* 2000; 34:491-97.
- Cury JA, Tenuta L. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res* 2009; 23(1):23-30.
- De Carli AD. Capacidade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* associada ao fluoreto de sódio no controle do biofilme dental [Dissertação]. Campo Grande: Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2007.
- Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, *et al.* The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol* 2006; 51:15-22.
- Duchin S, van Houte J. Relationship of *Streptococcus mutans* and *lactobacilli* to incipient smooth surface dental caries in man. *Arch Oral Biol* 1978; 23 (9):779-86.
- Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27:31-40.

¹ De acordo com o *International Comittee of Medical Journal Editors*, 1979 (Estilo Vancouver).
Abreviaturas de periódicos de acordo com Base de Dados MEDLINE

Featherstone JDB. Remineralization, the natural caries repair process—the need for new approaches. *Adv Dent Res* 2009; 21:4-7.

Gebara ECE, Zardetto CGDC, Mayer MPA. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S.MUTANS* e *S.SOBRINUS*. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1996; 10(4):251-6.

Giamalia I, Steimberg D, Grobler S, Gedalia I. The effect of própolis exposure on microhardness of human enamel *in vitro*. *J Oral Rehabil* 1999; 26 (2):941-3.

Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; 18:1357-64.

Ikeda T, Sandham HJ, Bradley Jr EL. Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in negro children. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 555-66.

Ikeno K, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* 1991; 25:347-51.

Koo H, Jeon JG. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. *Adv Dent Res* 2009; 21:63-8.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *Mutans Streptococci*. *Curr Microbiol* 2000b;41:192-3.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA . *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000c; 45:141-8.

Koo H, Cury JA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Ikegaki M, Park YK. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res* 2002a; 36:445-8.

Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 17:337-43.

Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and tt-farnesol with fluoride on *S. mutans* biofilm and dental caries. *J Dent Res* 2005; 84(11):1016-20.

Koo H, Seils J, Abranches J, Burne RA, Bowen WH, Quivey Jr RG. Influence of apigenin on gtf gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(2): 542-6.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2002b; 46(5):1302-9.

Koo H, Smith AMV, Bowen W, Rosalen PL, Cury JA, Park YK. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res* 2000a; 34:418-26.

Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res* 2008; 20:17-21.

Lang NP, Hotz PR, Gusberti FA, Joss A. Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in humans. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2:39-47.

Löe H. A review of the prevention and control of plaque. In: McHugh W D. *Dental plaque*. Edinburgh: Livingstone; 1969.

Loesche WJ, Straffon LH. Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect Immun* 1979; 26(2):498-507.

Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Res* 1976; 9: 65-107.

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

Maltz M, Barbachan e Silva B, Carvalho DQ, Volkweis A. Results after two years of non-operative treatment of occlusal surface in children with high caries prevalence. *Braz Dent J* 2003; 14(1):48-54.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol* 2003;149(2):279-94.

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; 8(2):263-71.

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

Marthaler TM. Changes in dental caries 1953–2003. *Caries Res* 2004;38:173–81.

Minah GE, Loesche WJ. Sucrose metabolism in resting-cell suspensions of caries-associated and non-associated dental plaque. *Infect Immun* 1977; 17(1): 43-54.

National Institute of Health. Diagnosis and management of dental caries throughout life. *NIH Consensus Statement* 2001;18:1-30.

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

Ota C, Valente PHM, Unterkircher CS, Shimizu MT. Atividade da própolis sobre bactérias isoladas da cavidade bucal. *Lecta* 1998; 16(1):73-7.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. *In situ* effect of frequency sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res* 2004; 83(1):71-5.

Park YK, Koo H, Abreu JAS, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol* 1998;36:24-8.

Steinberg D, Kaine G, Gedalia I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am J Dent* 1996; 9(6):236-9.

ten Cate JM. The need for antibacterial approaches to improve caries control *Adv Dent Res* 2009; 21:8-12.

van Houte J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Dent J* 1980; 30(4):305-26.

White DJ. Effects on subsurface lesion: F uptake, distribution, surface, hardening and remineralization. *Caries Res* 1987;21: 126-40.

Woisky RG, Giesbrecht AM, Salatino A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. *Rev Farm bioquím Univ S Paulo* 1994; 30(1):19-21.

Zárate-Pereira P. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%; fluoreto de sódio 0,2% e própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05%, sobre níveis salivares de estreptococos do grupo mutans em pacientes cárie-ativos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;1999.

Zárate-Pereira P. Estudo *in situ* sobre a ação da própolis de *Apis mellifera* no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2003.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL

Faculdade de Odontologia Professor Albino Coimbra Filho

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. TÍTULO DA PESQUISA:

Ação da Própolis de *Apis mellifera* associada ao Fluoreto de Sódio no processo de Remineralização de Manchas Brancas e sobre a Microbiota Cariogênica: Estudo *in situ*.

2. RESPONSÁVEL:

- A presente pesquisa constituirá a tese de doutorado do pesquisador Alessandro Diogo De Carli, sob orientação do Professor Dr. Paulo Zárate Pereira.

3. OBJETIVOS:

- Verificar as alterações promovidas na composição do biofilme cariogênico sobre a superfície do esmalte decorrentes das ações químicas das substâncias testadas e seu efeito sobre a remineralização de manchas brancas.

4. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS:

- O voluntário será submetido a uma anamnese e um exame clínico.
- O estudo compreende duas fases: experimental e clínica. A fase experimental será realizada no laboratório de microbiologia da UFMS. Na fase clínica, os voluntários usarão um dispositivo intrabucal por 14 dias, 24h/dia, onde será gotejada sacarose 20% sobre blocos de esmalte fixados no dispositivo 8 vezes/dia. Em uma outra etapa, os voluntários procederão de maneira similar à fase anterior, sendo que, após a última higienização bucal diária, serão gotejadas duas gotas da substância-teste sobre cada bloco de esmalte, também durante 14 dias. O gotejamento, tanto da sacarose quanto das substâncias teste, deve ser realizado fora da boca do voluntário. Após o término de cada etapa, será feita a coleta do biofilme para análise microbiológica e da microdureza do esmalte.

5. RECOMENDAÇÕES:

- Nenhum tipo de colutório ou medicamento antimicrobiano poderá ser utilizado durante o experimento.

6. RISCOS:

- Não há evidência científica de efeitos colaterais relatados pela literatura frente à utilização dessa metodologia. Porém, caso o voluntário perceba ou suspeite de algum sinal ou sintoma, deverá comunicar o responsável pela pesquisa imediatamente.

7. PRINCÍPIO DA AUTONOMIA:

- Fica o voluntário livre para desistir de participar do trabalho de pesquisa, em qualquer fase de seu desenvolvimento;

- Compromete-se o responsável pela pesquisa de que a participação do voluntário seja inteiramente espontânea, livre de qualquer tipo de coação, comércio ou instrumentos semelhantes.

8. BENEFÍCIOS:

- Os voluntários terão seu risco de cárie diagnosticado e segundo o qual receberão orientações para o seu controle (informações sobre dieta e higienização) e preservação.

9. COMITÊ DE ÉTICA:

- Em caso de dúvidas sobre aspectos éticos e direitos dos voluntários, procurar: Comitê de Ética da UFMS no fone (67) 3345-7313 ou (67) 3345-7187; Orientador (67) 9984-0804; Pesquisador (67) 81236797.

AUTORIZAÇÃO

Eu, _____, documento RG nº _____, residente à rua _____, bairro _____, no município de _____ Estado _____, DECLARO estar ciente das condições do trabalho de pesquisa, **Ação da Própolis de Apis mellifera associada ao fluoreto de Sódio no processo de Remineralização de Manchas Brancas e sobre a Microbiota Cariogênica: Estudo *in situ***, de responsabilidade do pesquisador Alessandro Diogo De Carli, no qual participo como voluntário, assumindo as responsabilidades previstas e comprometendo a seguir todas as recomendações.

_____, _____ de _____ de 2009.

Assinatura do Voluntário

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1393 do Pesquisador Alessandro Diogo de Carli intitulado "Ação da Própolis de Apis mellifera associada ao fluoreto de Sódio no processo de Remineralização de manchas brancas e formação do biofilme cariogênico: Estudo in situ", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 04 de junho de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos

Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 04 de junho de 2009.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

