

BIANCA SOUZA VALVERDE

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE VIDRO BIOATIVO DOPADO COM PRÓPOLIS
VERDE DE *Apis mellifera***

CAMPO GRANDE
2011

BIANCA SOUZA VALVERDE

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE VIDRO BIOATIVO DOPADO COM PRÓPOLIS
VERDE DE *Apis mellifera***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro – Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Mathias Guerisoli

Co-orientador: Prof. Dr. Odair Pimentel Martins

CAMPO GRANDE
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

BIANCA SOUZA VALVERDE

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DE VIDRO BIOATIVO DOPADO COM PRÓPOLIS
VERDE DE *Apis mellifera***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro – Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado_____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____ .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo Mathias Zanella Guerisoli
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que estiveram comigo durante esses anos:

Aos meus pais, **Adonis e Tereza**, que sempre fizeram mais que o possível para eu alcançar meus sonhos e objetivos. Com exemplos de dedicação e perseverança.

Ao meu irmão, **Fabício**, que mesmo ausente dividiu comigo momentos importantes.

Ao seu **Paulo**, que sempre torceu pelas minhas vitórias, compartilhando com alegria e carinho cada uma delas.

A minha querida Vó, **Juracy**, uma pessoa que tenho muito amor e admiração. Sem dúvida, ver em seus olhos a alegria em cada meta alcançada foi um grande incentivo.

Ao meu namorado, **Fabício**, pois o amor que nos move nos faz alcançar voos cada vez mais altos. Obrigada pelo apoio, ajuda, enfim, por fazer parte da minha vida.

A todos meus amigos, que estiveram comigo, que compartilharam de alguma forma para conclusão de mais essa etapa.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos àqueles que fizeram parte deste trabalho:

- Ao meu orientador, **Prof. Dr. Danilo Mathias Zanello Guerisoli**, que de forma exemplar esteve sempre disponível e seguro. Com apoio essencial para elaboração deste trabalho.

- Ao **Prof. Dr. Odair Pimentel Martins** que foi peça fundamental no desenvolvimento da pesquisa. Sempre dividindo sua extensa carga de conhecimento, com dedicação e paciência. Com certeza tornou-se mais que um co-orientador, um amigo. Obrigada.

- Ao **Prof. Dr. Joaquim Corsino** do Departamento de Química - UFMS, que colaborou com as extrações da própolis e análises químicas, de forma eficiente e solícita.

- Ao meu ex-professor e agora amigo, **Achilles Parma-Neto**, que contribuiu nas etapas do trabalho, sempre atencioso e prestativo.

- Aos amigos **Dado e Alan**, pela amizade e ajuda, sempre solícitos.

- Ao **Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Jr.**, que me despertou a paixão pela Periodontia, transmitindo seus conhecimentos de forma extraordinária. E também pelas oportunidades de aprender acompanhando seus cursos.

- Aos **funcionários do Departamento de Microbiologia - UFMS** que me ajudaram sempre que solicitados.

- Ao **Prof. Dr. José Renato Jurkevics Delben** do Departamento de Física – UFMS pela gentil elaboração e doação do Vidro Bioativo, e também pelo auxílio na caracterização física.

- Aos meus amigos do Curso de Pós-graduação, **Ethmila, Hélio e Felipe**, com quem dividi bons momentos.

- Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**. Onde tive a oportunidade de ingressar e realizar este sonho.

“O futuro tem muitos nomes.
Para os fracos é o inalcançável.
para os temerosos, o desconhecido. Para os valentes é a oportunidade”.
(Victor Hugo)

RESUMO

Valverde BS. Caracterização e avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de Vidro Bioativo Sistema Si:Ca:P obtido por Sol-Gel e dopado com própolis verde de *Apis mellifera*. Campo Grande; 2011. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

As biocerâmicas possuem aplicações na Odontologia devido às suas excepcionais propriedades biológicas. O vidro bioativo (VB) tem sido amplamente estudado e utilizado em Periodontia, apresentando atividade antimicrobiana, função osteocondutora e biocompatibilidade. A capacidade de VBs serem acrescidos de substâncias antimicrobianas possibilitou sua associação à própolis verde, produto originado das abelhas (*Apis Mellifera*), com comprovada eficácia antimicrobiana e antiinflamatória. Este estudo teve por objetivo incorporar ao VB, em proporção 1:10, extratos de própolis verde (EPV) a 30%, fracionados por partição líquido-líquido em diferentes veículos (hexano, acetato de etila, hidroalcoólico). Foram realizadas a caracterização física e avaliação de seu potencial antimicrobiano, através de testes de Concentração inibitória mínima (CIM) e curva de morte pela técnica *pour plate* contra *Escherischia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923. Realizou-se *in vitro* a formação de biofilmes periodontopatogênicos sobre placas de poliestireno e avaliou-se seu potencial em inibir o crescimento. Os resultados químicos mostraram que a própolis verde possui grande quantidade de compostos fenólicos, como flavonóides. Fato comprovado pela caracterização física por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), onde se verificou a presença de distintas substâncias em cada uma das frações do EPV. Nos testes de CIM, todas as frações apresentaram atividade antimicrobiana sobre as bactérias testadas. O VB mostrou-se eficiente como bacteriostático, assim como a associação VB/EPV. Em relação ao biofilme, o VB promoveu sua eliminação, o que não ocorreu na associação VB/EPV. Concluiu-se que é possível associar o extrato de própolis verde ao VB, porém este perde a sua atividade de destruição de biofilme possivelmente devido à reação de neutralização, mantendo a atividade antimicrobiana. Outros testes *in vitro* são necessários para garantir seu uso *in vivo*.

Palavras – chave: própolis; vidro bioativo; doenças da boca.

ABSTRACT

Valverde BS. Characterization and *in vitro* evaluation of antibacterial activity of bioactive glass system Si: Ca: P obtained by Sol-Gel doped and propolis of *Apis mellifera*. Campo Grande; 2011. [Dissertation – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

The bioceramics have applications in dentistry because of its exceptional biological properties. The bioactive glass (BG) has been widely studied and used in Periodontics, with antimicrobial activity, biocompatibility and osteoconductive function. The ability of the bioactive glass to be antimicrobial allowed its association with propolis, a product derived from the bees (*Apis mellifera*), with proven antimicrobial and anti-inflammatory efficacy. This study aimed to incorporate the bioactive glass in 1:10, extracts of green propolis (EGP) at 30%, fractionated by liquid-liquid partition in different vehicles (hexane, ethyl acetate, hydroalcoholic). It has been performed the physical characterization and evaluation of their antimicrobial potential, through tests of Minimum inhibitory concentration (MIC) and death curve technique against pour plate *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923. It has been conducted *in vitro* periodontal biofilm formation on polystyrene plate and evaluated their potential to inhibit growth. The chemical results showed that propolis has a large amount of phenolic compounds such as flavonoids. This was verified by physical characterization by Differential Scanning Calorimetry (DSC), which verified the presence of different substances in each of the fractions of EGP. In MIC tests, all fractions showed antimicrobial activity on bacteria tested. The BG was efficient as a bactericide, as well as the association BG /EGP. Regarding the biofilm, promoted its elimination, which did not occur in the association BG / EGP. It is possible to associate the green propolis extract the BG, but it loses its ability to destroy the biofilm activity, possibly due to neutralization reaction, maintaining the antimicrobial activity. Other *in vitro* tests are needed to ensure its use *in vivo*.

Keys – words: propolis; bioactive glass, mouth diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPO –D	Índice de Cariados, Perdidos e Obturados por Dente
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ATCC	American Type Culture Collection
MCB	Mínima Concentração Bactericida
UFC	Unidade Formadora de Colônia
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
CIM	Concentração Inibitória Mínima
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
SBF	Fluído Simulado Corpóreo
EPV	Extrato de Própolis Verde
PTFE-e	Politetrafluoretileno
GTF	Glicosiltransferase
AZT	Zidovudina
MS	Mato Grosso do Sul
DP	Doença Periodontal
VB	Vidro Bioativo
PV	Própolis verde
PA	Pró-análise
h	Horas

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	microgramas
µl	microlitros
mg	miligramas
Kg	kilogramas
mL	mililitros
pH	Potencial hidrogeniônico
L	Litro
g	gramas
°C	Graus centígrados
%	Porcentagem
°	Graus

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Etiopatogenia da doença periodontal	16
2.2 Formas de controle e tratamento da doença periodontal	18
2.3 Própolis	23
2.3.1 Histórico e definições.....	23
2.3.2 Extração e composição química.....	26
2.3.3 Propriedades biológicas.....	29
2.3.4 Toxologia.....	36
2.4 Vidro bioativo e suas aplicações	37
3 OBJETIVOS	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Obtenção da própolis	43
4.2 Análise química da própolis	43
4.2.1 Caracterização e identificação das frações a partir do extrato etanólico.....	43
4.3 Armazenamento e secagem do extrato	44
4.4 Incorporação da própolis ao Vidro Bioativo	44
4.5 Avaliação da atividade antibacteriana	45
4.5.1 Avaliação da CIM de culturas puras sobre frações de própolis.....	45
4.5.2 Titulação através da técnica do plaqueamento em ágar em <i>Pour Plate</i> de culturas puras sobre a VB incorporado à própolis verde.....	46
4.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana contra biofilmes.....	47
4.6 Caracterização física por DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura)	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Análise química da própolis verde	49
5.2 Análise da CIM de culturas puras sobre as frações de própolis	50
5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana por meio de análise de sobrevivência	51

5.4 Análise antimicrobiana do VB e VB associado à Própolis contra biofilme..	52
5.5 Caracterização física por DSC.....	53
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma das patologias orais que mais acometem a população brasileira, causando danos muitas vezes irreversíveis. Chambrone (1993) analisou trabalhos apresentados sobre prevalência da doença periodontal no Brasil, concluindo que 86,57% das pessoas apresentam alguma alteração gengival ou periodontal, sendo mínimas as chances de se encontrar pacientes com todas as unidades gengivais e periodontais clinicamente saudáveis, destacando a importância de estudos inerentes à prevenção e tratamento desta patologia.

Esses dados são comprovados pelos últimos resultados do levantamento epidemiológico SB Brasil 2003, realizado pelo Ministério da Saúde, que mostra prevalência de 53,8% da doença periodontal nas idades de 15 a 19 anos; 78,1% na faixa etária de 35 a 44 anos e 92,1% entre 65 e 74 anos, o que resulta em aumento da prevalência em razão diretamente proporcional à idade (BRASIL, 2004)

A saúde gengival, em geral, é caracterizada histologicamente por um equilíbrio entre a microbiota existente e os fatores de resistência do hospedeiro. Quando ocorre um desarranjo desse equilíbrio, há o desenvolvimento das doenças periodontais. As patologias mais comuns são a gengivite, uma alteração patológica limitada aos tecidos moles, sem afetar as fibras do ligamento periodontal, cemento e osso alveolar, portanto sem perda de inserção, e a periodontite, que afeta toda a estrutura de suporte do dente, havendo um processo inflamatório que gera a migração apical do epitélio juncional, perda de inserção e da crista alveolar, podendo haver mobilidade dentária e eventual perda do dente (NERCOLINI, 2004).

O fator etiológico responsável por desencadear a doença periodontal é a placa bacteriana, ou biofilme dental, um depósito bacteriano de ocorrência natural associado à superfície do dente (BONIFÁCIO *et al.*, 1999), sendo evidente a necessidade de se controlar a sua formação para manutenção da saúde periodontal.

O tratamento periodontal tem o objetivo de eliminar a doença através do controle de infecção com a raspagem e o alisamento radicular, e corrigir os defeitos anatômicos causados pela evolução da patologia, por meio da regeneração das estruturas de suporte do dente. Os métodos mais utilizados são os enxertos ósseos, que podem ser autógenos, alógenos ou xenógenos; a regeneração tecidual guiada (RTG) e o uso de materiais aloplásticos. Entre estes últimos, está o Vidro Bioativo (VB), uma cerâmica caracterizada por sua função osteocondutora e

osteostimulatória e por ter a propriedade de adesão óssea, além de induzir a neoformação de cimento e formação de novas inserções (NASSER-NETO *et al.*, 2008).

Outra característica biológica importante do Vidro Bioativo é sua capacidade antimicrobiana. Thomas *et al.*, em 2005, afirmaram que o potencial do VB não foi totalmente descoberto. E destacam suas propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias, principalmente na aplicação clínica periodontal.

O Vidro Bioativo pode ser acrescido de substâncias de interesse na promoção de homeostasia orgânica. Durante o processo de dissolução dos fluídos corporais, a liberação destas substâncias pode ser controlada de acordo com a formulação deste biomaterial. Estas drogas incluem agentes para controlar infecções, inflamações, promoção de crescimento ósseo, proteínas morfogenéticas, fatores de crescimento e outros agentes osteogênicos (GUPTA & KUMAR, 2008).

Várias substâncias têm sido utilizadas no controle da placa, como digluconato de clorexidina, compostos fenólicos, cloreto de cetilpiridínio e triclosan, porém a necessidade de se usar um componente eficaz associado a uma substância natural com boa compatibilidade e que apresente um valor econômico favorável incentivou a introdução da própolis na Odontologia.

Têm-se demonstrado a capacidade da própolis em ser usada como adjuvante no tratamento das doenças periodontais, possuindo ação antimicrobiana comprovada por testes *in vitro* contra patógenos periodontais e micro-organismos superinfectantes (GEBARA *et al.*, 2002). Trata-se de uma substância utilizada empiricamente desde o Egito antigo, devido às suas propriedades terapêuticas. Dentre estas, destacam-se a atividade anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica e antisséptica, mostrando que esta pode se tornar uma alternativa eficaz aos medicamentos utilizados rotineiramente na Periodontia, visando o controle e o tratamento periodontal, com uma boa relação custo-benefício (GALVÃO & GALVÃO, 2003).

Há relatos da existência de alguns tipos diferentes de própolis relacionadas a variações na cor e aroma, associadas à diversidade da flora brasileira. Salatino *et al.* (2005), analisando a origem e variações químicas das própolis brasileiras, encontraram um tipo com grande aceitação mundial, a própolis verde, que pode ser encontrada em diferentes regiões brasileiras. Dependendo da vegetação existente no local, pode ser derivada principalmente do alecrim do campo (*Baccharis*

dracunculifolia), pinheiro do Paraná (*Araucária angustifolia*) ou do eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), apresentando excelentes propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

Até o momento, pouco se sabe sobre a real capacidade do VB ser utilizado como agente antimicrobiano, visto que, clinicamente seu uso em Periodontia se restringe ao tratamento de defeitos ósseo. E não foram encontradas citações na literatura sobre associação da própolis na composição de vidros bioativos. Com isso, o desenvolvimento de biomateriais odontológicos que possam unir a capacidade antimicrobiana e antiinflamatória à função osteocondutora nos parece promissor, frente à gravidade do desenvolvimento da doença periodontal e à dificuldade de tratamento e regeneração das partes perdidas por esta patologia.

Assim, este trabalho se propõe a avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana do vidro bioativo puro e associado à própolis, visando futuramente estudos *in vivo* no tratamento dessa patologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiopatogenia da doença periodontal

O biofilme, ou placa dental, é uma massa de consistência gelatinosa, constituída de polissacarídeos e proteínas, onde estão aderidos micro-organismos e seus produtos. Desta forma, ficam protegidos da ação de substâncias químicas e antimicrobianas, o que dificulta sua eliminação, pois o biofilme é muito mais resistente às defesas do hospedeiro do que a forma planctônica dos micro-organismos. A presença do biofilme tem relação direta com o estado da doença periodontal sendo que, quando patogênico, há liberação de produtos danosos e toxinas, causando assim danos aos tecidos. Fatores relacionados com o hospedeiro também podem predispor o surgimento desta patologia, como diabetes, tabagismo, predisposição hereditária e fatores hormonais decorrentes da puberdade, gravidez e menopausa (BONIFÁCIO *et al.*, 1999).

Pitss *et al.*, em 2003, evidenciaram que os biofilmes organizados conferem uma maior proteção às bactérias contra os agentes antimicrobianos e biocidas em geral do que as formas planctônicas dos micro-organismos. Isto se deve ao fato desta organização propiciar um maior potencial de virulência e resistência físico-química dos micro-organismos em relação àqueles que o constituem em forma livre. Este fato revela a importância da realização de testes de inibição da formação e destruição dos biofilmes *in vitro*, além dos tradicionais testes de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Duarte (2003) caracterizou basicamente a periodontite como uma evolução da doença periodontal que gera a perda óssea e um aprofundamento do sulco gengival, denominado “bolsa”, que se torna um fator anatômico de retenção, aumentando os riscos de progressão da doença, pelo fato de servir como reservatório natural de proliferação bacteriana.

Carranza *et al.* (2004) dividem o periodonto em quatro estruturas: gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. A gengiva é uma estrutura de proteção, recobrendo os processos alveolares e o colo dos dentes, sendo dividida em marginal, inserida e áreas interdentárias. O ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar formam o aparelho de inserção, cuja função principal é distribuir e

absorver as forças geradas. O ligamento periodontal circunda as raízes dos dentes e os une ao osso alveolar, possuindo funções formadoras, remodeladoras, nutricionais e sensoriais. O cemento é um tecido mineralizado especializado que reveste as superfícies radiculares dos dentes; o osso alveolar propriamente dito é uma placa óssea compacta.

Na cavidade oral estão presentes diversas espécies de micro-organismos, que de forma natural compõem uma microbiota extremamente diversificada. Vários fatores podem gerar o desequilíbrio desta, levando a alguma patologia bucal, sendo a doença periodontal umas das mais prevalentes e complexas quanto à origem, tratamento, controle e classificação (NERCOLINI, 2004).

De acordo com Neville *et al.* (2004), a doença periodontal (DP) é uma inflamação do tecido gengival, associada à perda de inserção do ligamento periodontal e de suporte ósseo, diferenciando-se assim da gengivite, que se refere a uma inflamação limitada aos tecidos moles, não incluindo processos inflamatórios que abrangem crista alveolar, ligamento periodontal e cemento. O biofilme dental é o principal fator etiológico da doença periodontal e a presença deste, por si só, não ocasiona a doença, pois faz parte da microbiota humana, existindo uma grande diferença no conteúdo da placa em áreas de periodonto doente e saudável. A teoria da placa específica esclarece que nem todos os micro-organismos orais são periodontopatogênicos, havendo a necessidade de bactérias específicas da doença periodontal estarem presentes na placa para o desenvolvimento da patologia. As bactérias mais frequentemente associadas à doença periodontal são a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e a *Porphyromonas gingivalis*. Outros fatores do hospedeiro podem estar relacionados com o aparecimento da doença, sendo determinantes na sua presença e severidade, tais como o tabagismo, a diabetes, a predisposição hereditária, problemas cardiovasculares e alterações do sistema endócrino.

A formação do biofilme dental ocorre de forma sequencial, sendo que na fase de colonização inicial, que se processa no período de menos de uma a oito horas após a limpeza profissional dos dentes, ocorre a fixação bacteriana à superfície dental banhada pela glicoproteína salivar. Espécies do gênero *Streptococcus* constituem 60 a 80% dos colonizadores iniciais, entre eles, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. mitis*, enquanto espécies de *Actinomyces* aparecem na proporção de 5 a 30%, principalmente o *A. naeslundii*. Na fase de acumulação ou estruturação, etapa posterior e mais complexa, ocorre a multiplicação dos colonizadores iniciais e

adesão de novas células, com a co-agregação homotípica e co-agregação heterotípica. A placa supragengival, associada à gengivite, apresenta uma sucessão bacteriana em relação a presente no estado de saúde. Normalmente, a placa supragengival é caracterizada pela proporção de 40 a 55% de gram-positivos, 45 a 60 % de gram-negativos, 50 % de anaeróbios facultativos e 50% de anaeróbios estritos. Na placa subgengival, associada à periodontite, ocorre um aumento de gram-negativos (75%), anaeróbios estritos (80 a 90%) e de espiroquetas (30%) (LORENZO, 2004).

Silva (2006a) estudou a prevalência de diversas bactérias que compõem a microbiota subgengival em pacientes com periodontite, comprovando que há grande heterogeneidade da população de micro-organismos de pacientes com diferentes graus de periodontite. Houve a detecção de 50 espécies bacterianas diferentes, com todos os pacientes demonstrando altos índices de bacilos anaeróbios gram-negativos, associados com estado da doença ativa.

2.2 Formas de controle e tratamento da doença periodontal

A desmotivação das pessoas em relação à higiene oral, devido ao tempo limitado ao longo do dia, é frequente, sendo indicado o uso de substâncias antimicrobianas no intuito de compensar esta falha. Segundo Silva & Alves (2000), a higienização bucal com uso do fio dental e escovação são essenciais na redução da placa dentária, porém muitas vezes insuficientes para impedir a fermentação dos restos de placa presentes em lugares inacessíveis. A associação de métodos preventivos é importante para manutenção da saúde oral, onde bochechos com soluções antissépticas podem ser indicados em alguns casos como complementação da higiene bucal.

O controle da placa bacteriana pode ser realizado por meios mecânicos e químicos, sendo de fundamental importância para a prevenção, tratamento e manutenção do processo de saúde periodontal. No controle químico, diversas substâncias podem ser utilizadas, tais como antissépticos, antibióticos, enzimas, agentes não enzimáticos que alteram o metabolismo bacteriano e substâncias que interferem na adesão dos micro-organismos (CHIPIANOTTO, 2000).

Os dentes que apresentam lesão de furca possuem uma topografia bastante crítica na região, tornando os procedimentos mecânicos de difícil execução. A

terapia periodontal consiste em estacionar a DP e regenerar as áreas perdidas (cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar), através de procedimentos regenerativos. A característica de cicatrização após a cirurgia periodontal é determinada pelo tipo de célula que repovoa a área perdida, podendo ter origem do tecido epitelial, conjuntivo, óssea e do ligamento periodontal (MARTINS *et al.*, 2001)

Dottori *et al.*, em 2002, com o objetivo de aglutinar dados encontrados na literatura referentes ao controle químico da placa bacteriana, verificou a eficácia de enxaguantes bucais como a clorexidina, compostos fenólicos e cloreto de cetilpiridímio. Concluíram que, dentre os enxaguantes analisados, a clorexidina é o melhor antimicrobiano para a diminuição da placa bacteriana, possuindo efeitos bactericidas e bacteriostáticos, além de um amplo espectro de ação. Porém, os seus efeitos colaterais limitam seu uso prolongado, sendo importante ressaltar que a utilização por muito tempo pode ocasionar alterações no paladar, sensação de gosto metálico, gosto amargo, perda da sensibilidade oral, descamação na mucosa, manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, alterações estas que são reversíveis após a interrupção do uso.

O tratamento da doença periodontal inclui uma terapêutica básica de instrução de higiene oral e motivação do paciente, associado a procedimentos de raspagem e alisamento radicular. Muitas vezes, mostra-se necessário utilizar algum medicamento com capacidade de diminuir a quantidade de micro-organismos e amenizar o processo inflamatório na cavidade oral, a fim de reparar os tecidos e melhorar a sintomatologia (MARQUES & GALVÃO, 2003).

Em estágios mais avançados da doença periodontal, onde é observada a perda de inserção epitelial, reabsorções ósseas e aumento da bolsa gengival, é necessária a realização de tratamentos mais complexos como as terapias regenerativas, regeneração óssea guiada e regeneração tecidual guiada, que visam o controle da doença buscando paralelamente a neoformação óssea (SWERTS & MEDEIROS, 2003).

Quando há progressão da doença periodontal, a inflamação gengival se estende aos tecidos periodontais de suporte ocasionando perda de inserção clínica associada à perda óssea. O processo destrutivo ocorre em dentes unirradulares e multirradulares, neste último envolvendo bifurcações e trifurcações, resultando na denominada lesão de furca, onde é classificada de acordo com a destruição óssea,

grau 1 (perda óssea horizontal, não excedendo 1/3 da largura do dente), grau 2 (perda óssea horizontal excedendo 1/3 da largura do dente, mas sem envolver toda área de furca), grau 3 (destruição horizontal lado a lado dos tecidos de suporte na área de furca). Para o tratamento desses defeitos, as técnicas regenerativas são muito utilizadas. A técnica de regeneração tecidual guiada consiste em colocar uma barreira oclusiva, formando um espaço entre a membrana e a superfície radicular, para que as células do ligamento periodontal se repovoem. Impedindo que o tecido conjuntivo e epitelial entre em contato com a raiz, e promova assim a regeneração do periodonto de inserção. Vários tipos de membranas tem sido utilizadas, sendo elas reabsorvíveis (membrana de colágeno, ácido polilático, ácido poliglicólico, Vicryl, monômero de fibrina e elastina) e não reabsorvíveis (membrana de politetrafluoretileno expandido e celulose (LINDHE, 2005).

A severidade das doenças periodontais pode ser estabilizada por diversas modalidades terapêuticas, independentemente da conduta escolhida. A tetraciclina é um antimicrobiano bacteriostático, efetivo contra bactérias gram-positivas e negativas, e o mais descrito e empregado como coadjuvante no tratamento periodontal, especialmente na periodontite. O uso da tetraciclina pode ser sistêmico, aplicação local com irrigação intra-bolsa ou associado ao aparelho de liberação lenta, que oferece a vantagem da manutenção da concentração do fármaco na bolsa. Isto permite que a dosagem seja mantida baixa, reduzindo os riscos de efeitos colaterais e a possível resistência microbiana, visto que a difusão destes agentes no interior do biofilme subgengival torna-se prejudicada e sua atividade em bolsa periodontal profunda pode ser reduzida (PEDRON *et al.*, 2007)

Marinho & Araújo (2007) realizaram uma revisão de literatura sobre os enxaguatórios bucais utilizados na periodontia, observando que o controle químico da placa bacteriana é importante para manutenção da saúde periodontal, auxiliando os métodos mecânicos e diminuindo o número de micro-organismos patogênicos na cavidade oral. Os resultados dos estudos com enxaguatórios bucais fitoterápicos mostram a importância e a necessidade de se avaliar meios alternativos e economicamente viáveis para o controle da placa bacteriana, facilitando o acesso das populações mais carentes aos enxaguatórios bucais.

Ditterich *et al.*, em 2007, avaliaram a atividade antimicrobiana de 7 dentifrícios que possuem substâncias naturais na composição, entre eles Sorriso Herbal com própolis e Sorriso Juá com própolis. O teste foi realizado em placas de ágar

semeado com bactérias da saliva total e *S. aureus* e *E. coli*. Os resultados foram verificados através da formação de halos de inibição, demonstrando que todos os dentifrícios testados foram efetivos contra os micro-organismos isolados. Contra a saliva total apenas o Colgate Herbal e o Sorriso Juá com própolis não apresentaram halo de inibição.

A clorexidina é uma bisguanida catiônica, disponível principalmente na forma de sais de digluconato. Apresenta amplo espectro de ação, substantividade e excelente atividade, sendo o antisséptico bucal aclamado como padrão ouro no controle da placa bacteriana. Moreira *et al.* (2008) verificaram a atividade da clorexidina sobre o crescimento e produção de placa *in vitro* de estreptococos do grupo *mutans* e de outros micro-organismos da saliva. O teste utilizou tubos com meio de cultura previamente misturado com a clorexidina a 0,12%. Os resultados confirmaram a atividade antimicrobiana da substância devido à inibição do crescimento de *S. mutans*, leveduras e outros micro-organismos. Em relação à formação de biofilme, 75% dos tubos não apresentaram formação de placa bacteriana. Concluiu-se que a clorexidina pode ser indicada para o controle de biofilme dental e para patologias relacionadas com sua presença, desde que utilizada de forma criteriosa, devido aos seus efeitos adversos.

Moreira *et al.* (2009) em estudo *in vitro*, avaliaram a atividade antimicrobiana dos principais antissépticos bucais utilizados presentes no comércio, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 115442, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e bactérias obtidas de uma amostra de saliva de 10 indivíduos. A técnica utilizada foi de difusão em ágar pelo método da placa com orifício, com incubação a 37° C em aerobiose e microaerofilia. Para avaliação dos resultados, observaram a formação de halos de inibição de crescimento. Os antissépticos com timol (Listerine®) e com flúor associado ao xilitol (Flúor Mint®) não apresentaram atividade sobre as bactérias utilizadas. Os que continham cetilpiridínio (Cepacol® e Oral B®) não apresentaram atividade sobre *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto os com malva (Malvatricin®), a atividade não foi observada sobre *P. aeruginosa*, *S. mutans* e bactérias da saliva. Os demais enxaguatórios, triclosan com flúor (Plax®), peróxido de hidrogênio (Peroxil®) e clorexidina (Periogard® e Parodontax®) foram os mais efetivos, observando o diâmetro dos halos de inibição. Os resultados mostraram que os antissépticos cuja atividade foi observada nas bactérias utilizadas podem ser uma opção

complementar para o controle do biofilme e infecções, quando utilizados com critério ou quando os métodos convencionais não se mostrarem efetivos. O seu uso indiscriminado pode gerar o desequilíbrio da microbiota e estimular microorganismos resistentes.

A lesão de furca, que ocorre em dentes bi ou multirradiculares, é decorrente da reabsorção óssea e perda de inserção no espaço inter-radicular, podendo ocasionar a perda dentária quando o tratamento adequado não é realizado. Ribeiro *et al.*, em 2009, através de revisão de literatura, discutiram os tratamentos possíveis para lesões de furca grau III, concluindo que o tratamento destas lesões é possível, por meio de tunelização, terapia ressectiva ou substituição por implantes dentais. Isso quando o tratamento é planejado e eleito o mais adequado para cada paciente. Visto que o tratamento e manutenção em longo prazo de lesões de furca são bastante difíceis devido à anatomia da região que dificulta o acesso pelo profissional e pelo paciente para o efetivo controle de placa.

Segundo Biscarde *et al.* (2010), as evidências na literatura favorecem a associação amoxicilina e metronidazol, sendo na maioria dos casos a primeira escolha de antibioticoterapia em periodontia. Pois essa associação tem efeito sinérgico contra periodonto patógenos. A amoxicilina tem poucos efeitos adversos, o mais comum são as reações alérgicas. Já o metronidazol pode causar efeitos gastrointestinais, não sendo indicado para gestantes e nutrizes.

Para a manutenção da saúde gengival, o método mais valioso de controle da placa bacteriana é o mecânico, feito pelo paciente através da escovação e uso do fio dental. Orlando – Júnior *et al.* (2010), através de revisão de literatura, verificaram que a qualidade do trabalho de motivação que o profissional realiza orientando e educando o paciente sobre a importância do controle de biofilme dental é, tão importante quanto as terapias utilizadas e determinante para o sucesso do tratamento. Como os procedimentos de higiene nem sempre são realizados de maneira eficaz, o controle profissional com profilaxias, raspagem e alisamento radicular, se torna de extrema importância na prevenção e tratamento quando a patologia já está instalada.

Juiz *et al.*, em 2010, selecionaram 100 artigos que foram discutidos em uma revisão de literatura sobre o uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento periodontal. Concluíram que a doença periodontal é um problema de saúde pública desencadeada principalmente por bactérias anaeróbias gram-

negativas, cuja resistência por antibióticos exige a busca por formar alternativas ao tratamento clínico de rotina (raspagem e alisamento radicular). As substâncias naturais têm cada vez mais aumentado seu espaço no tratamento de doenças bucais, com o Brasil sendo um importante fornecedor de matéria-prima, visto sua grande biodiversidade, com cerca de 19% da flora mundial. A própolis brasileira tem atividade comprovada no controle de micro-organismos e poder antiinflamatório, podendo ser associado a outros fitofármacos gerando uma ação sinérgica importante.

2.3 Própolis

2.3.1 Histórico e definições

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas, resultante da reação de enzimas digestivas das abelhas melíferas, principalmente salivares, e de resíduos vegetais ingeridos por essas, como, brotos, ramos, exudatos de plantas e outros (JOHNSON *et al.*, 1994).

A própolis tem grande potencial terapêutico comprovado, como é o caso de alguns flavonóides com ação espasmolítica, anti-inflamatória, antiúlcera, antibacteriana e anticâncer com derivados do ácido cafeico. O grande desafio do seu uso em fitoterapia é a variação de sua composição de acordo com a flora, o tempo da coleta, condições sazonais e contaminantes. Fatores importantes para definir suas propriedades biológicas, químicas e físicas. Sendo esse o principal problema para definir qual tipo de própolis é indicada para cada uso medicinal (MARCUCCI, 1996).

Park *et al.*, (2000a) classificaram as amostras de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil e determinaram algumas de suas propriedades biológicas. Concluíram que existe uma grande diversidade de própolis dentro do território brasileiro, com composições químicas totalmente distintas, devidas principalmente aos diferentes biomas existentes nas regiões onde foram coletadas, o que comprova a interferência da vegetação na qualidade da própolis. De acordo com a análise das propriedades biológicas em relação à atividade antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatória, várias amostras apresentaram resultados

satisfatórios, porém com valores distintos. Observaram a necessidade de um maior aprofundamento dos estudos e identificação dos compostos responsáveis pelas atividades biológicas assinaladas.

Ao longo dos tempos o homem aprendeu a utilizar várias formas de produtos naturais, entre elas a própolis. Seu emprego já era descrito por assírios, incas e egípcios. No antigo Egito (1700 A.C.; "cera negra") era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos. A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletada pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores; além desses, na colméia as abelhas adicionam secreções salivares (PEREIRA *et al.*, 2002)

Segundo Couto & Couto (2002), a coloração e composição da própolis variam conforme a origem do material utilizado como matéria prima podendo variar entre amarela, parda, vermelho escuro, verde limão, cinza esverdeado e café. A composição da própolis é complexa, e consiste basicamente de 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera (ácidos graxos), 10% de óleos voláteis e 5% de pólen e material orgânico entre outros. Os flavonóides e o ácido cafeico são os principais responsáveis pelo poder antibiótico da resina. A própolis é produzida pelas abelhas com a função de recobrir as paredes da colméia obstruindo fendas e orifícios e assim bloquear a entrada de inimigos, regular a temperatura interna em torno de 35°C, embalsamar invasores (insetos) mortos que não possa ser retirado evitando sua decomposição, impermeabilizar as paredes dos favos com fins antissépticos, isolando a colméia de tudo que possa comprometer a sobrevivência da colônia.

O controle ambiental é extremamente importante para produção de um material eficaz, livre de agentes contaminantes e capaz de ser utilizado com finalidade terapêutica. A própolis ideal deve ser produzida longe dos grandes centros, em regiões onde exista o mínimo de poluição (CONAPIS, 2004).

A própolis tem sido utilizada como um produto terapêutico natural há mais de 5.000 anos apresentando atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antissépticas, anticariogênicas, bactericidas, bacteriostáticas e cicatrizantes. Aristóteles (384 -- 322 a.C) recomendava o seu uso em tratamentos de abscessos, escoriações, e ainda soldados romanos carregavam esse produto como medicamento de emergência nos combates. O termo própolis vem do grego e significa: "pro" = defesa e "polis"= cidade, ou "defesa da cidade". A própolis é produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir da coleta de matéria prima, resinas e cera, de algumas espécies

vegetais, como pinus, pinheiro brasileiro, bracatinga, pessegueiro, ameixeira, alecrim, eucalipto, entre outros, sendo que a flora disponível na localidade influencia diretamente no tipo, coloração e na quantidade produzida pelas abelhas. Existem ainda outros fatores que estão relacionados com a produção e qualidade da própolis como, localização do apiário, raça das abelhas, materiais utilizados, densidade da colméia e época do ano (COSTA & OLIVEIRA, 2005).

Mais recentemente a própolis começou a ser apreciada como forma de tratamento de saúde em 1950 e 1960 na União Soviética e em alguns países da Europa. Em outras partes do mundo, como na América do Sul, esse produto só começou a ganhar popularidade nos anos 80, quando apicultores começaram a manifestar interesse, maximizando a sua produção. Apesar de ser um produto de origem animal as propriedades biológicas estão presentes devido à considerável proporção de componentes derivados das plantas. Outro tipo de própolis tem ganhado a preferência da população mundial em função da coloração e do aroma, a “própolis verde”, que possui ácido cinâmico na composição, além de outros constituintes, como os compostos terpenóides e o artepelin C, responsável pelo grande poder antimicrobiano e atividade antitumoral. A própolis verde pode ser originada de várias plantas como, alecrim-do-campo, pinheiro do Paraná e eucalipto. Análises em amostras de própolis verde provenientes do cerrado mostraram que também podem se originar do Cambará-Branco, Mercúrio-do-Campo, Cambuí, Aroeira, plantas típicas neste tipo de vegetação (SALATINO *et al.*, 2005).

Alencar *et al.*, em 2005, realizaram análises fitoquímicas de própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais, produzidas de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo) por abelhas *Apis mellifera*. E concluíram que neste tipo de própolis o composto fenólico de alta proporção é o artepelin C e outros derivados do ácido cinâmico, e que o alecrim-do-campo é a principal fonte vegetal para a própolis desses estados.

O consumo de própolis no mundo é estimado em cerca de 700-800 toneladas / ano, e o Brasil é o segundo maior produtor mundial, logo atrás da China. Atualmente, inúmeros trabalhos demonstram as atividades biológicas da própolis bem como suas aplicações terapêuticas. Existe no mercado, cerca de noventa produtos a base de própolis, que vão desde a indústria farmacêutica à cosmética (dentre eles, cápsulas, condicionador, xampu, sabonete, dentífrico, batom, bala, chá, protetor solar, gel pós-barba, creme, pomada, enxaguatório bucal etc). Porém,

apesar de ser aceita por órgãos regulatórios como produto de finalidade terapêutica, a própolis precisa ser padronizada quimicamente para garantir sua qualidade, eficácia e segurança (LUSTOSA *et al.*, 2008).

Chang *et al.* (2008) analisaram quimicamente uma amostra de própolis verde proveniente do estado de Minas Gerais. Os principais constituintes encontrados foram ácido cinâmico e derivados, flavonóides, ácido benzóico e alguns benzoatos, aromáticos não hidroxilados, ácidos alifáticos e ésteres. Concluindo que *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte vegetal da própolis verde brasileira.

Devido às inúmeras propriedades benéficas da própolis, o seu uso comercial em produtos cosméticos, farmacêuticos e de higiene pessoal é amplo. Para elaboração desses produtos é comumente utilizado o álcool de cereais, entretanto a sua presença confere um sabor não agradável na formulação. Alguns novos métodos de extração têm sido propostos, com baixo teor alcoólico ou até isento, destacando o extrato obtido com óleo vegetal. Na qual conserva bem as características organolépticas da própolis (BURIOL *et al.*, 2009).

Souza *et al.*, em 2010, avaliaram o efeito da sazonalidade sobre algumas características, como extrato seco, flavonóides totais, pH e atividade de oxidação, de extratos alcoólicos de própolis a 30%, obtidas mensalmente por um ano, em quinze colméias de abelhas *Apis mellifera*. Nos resultados não observaram diferenças significativas sobre as características físico-químicas analisadas, entre as estações do ano e diferentes técnicas de coleta.

2.3.2 Extração e composição química

Entre os solventes utilizados para extração de própolis, está o éter etílico, metanol, éter de petróleo, clorofórmio, álcool de cereais e o etanol, que é o solvente mais utilizado para o processamento da própolis (MARCUCCI, 1995).

Park *et al.* (1997) selecionaram 46 amostras de extratos etanólicos de própolis de diversos estados do Brasil, encontrando diferentes tipos de flavonóides o que confirma os relatos de que a própolis varia sua composição de compostos fenólicos dependendo da região e flora onde é produzida. As amostras do Paraná e Rio Grande do Sul, mostraram-se similares contendo 7 tipos de flavonóides aglicones, diferenciando completamente dos extratos dos estados de São Paulo e Minas Gerais que apresentaram 9 tipos e Mato Grosso do Sul e Goiás com 7 tipos.

Park *et al.* (1998a) utilizaram etanol como solvente para própolis, em diferentes concentrações. Após teste de CLAE, constatou-se que a maioria dos flavonóides foram extraídos nas concentrações alcoólicas entre 60 e 70%. E que nessas concentrações os extratos apresentaram satisfatória atividade antibacteriana e antioxidante, comprovando que a variação na concentração de flavonóides entre extratos depende da concentração etanólica utilizada na extração e esse fato, está intimamente relacionado com a sua atividade biológica.

O componente responsável pelas propriedades biológicas da própolis encontra-se bem estudado e pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, os flavonóides. Existem outros compostos fenólicos com excelentes propriedades terapêuticas e ainda tipos diferentes de flavonóides que podem influenciar na qualidade da própolis. Devido a essa grande variabilidade na composição, existem grandes diferenças nas propriedades biológicas de amostras das diferentes regiões do Brasil, onde de modo geral, as do Sudeste e Sul apresentam os maiores teores de flavonóides e conseqüentemente as melhores atividades antimicrobianas. Muitas destas substâncias carecem de maiores estudos, ressaltando a necessidade de análises mais detalhadas de todos os componentes ativos presentes na própolis para se concluir com precisão toda a extensão dessas propriedades biológicas (PARK *et al.*, 1998b).

Koo *et al.*, em 2002b, estudaram os efeitos biológicos apresentados por alguns compostos identificados na própolis. Em relação ao potencial inibidor da atividade da Glicosiltransferase (GTF) de *S. mutans* e *S. sanguis*, a apigenina, um flavonóide frequentemente encontrado nas amostras de própolis, apresentou o melhor potencial inibidor com valores de 90.5 a 95% em todas as GTFs testadas, em concentração de 135 µg/ml. Os flavonóides baicalus, mistetina e rhamnetina também mostraram serem bons inibidores de GTFs com inibição de 70 a 90% da atividade, em solução de 135 µg/ml. Através de testes CIM os flavonóides e alguns dihidroflavonóides como tt-farnesol, obtiveram os melhores resultados de inibição de *S. mutans* e *S. sobrinus* e também inibiram as GTF de 8 a 45%. Concluíram ainda que muitos compostos presentes na própolis são os responsáveis pelas atividades biológicas designadas a esta resina, sendo a apigenina um novo e potente flavonóide com propriedades antitumorais e antiinflamatórias.

Cunha *et al.* (2002) verificaram o perfil de seis extratos etanólicos de própolis da região Sudeste, obtidos por diferentes tempos de maceração, variando de 10, 20

e 30 dias, observando como estes podem interferir no rendimento, qualidade de compostos químicos e teor de fenóis. Os resultados indicaram um maior rendimento utilizando etanol a 70% ou mais e com maior tempo de maceração. Os outros aspectos, como teor de fenóis permaneceram inalterados.

De acordo com Silva (2003), no preparo do extrato de própolis legal, ou seja, indicada para consumo e comercialização, deve-se solubilizá-la em álcool de grau alimentício, como é o caso do álcool de cereais, com no máximo 70% de álcool absoluto. Em relação à quantidade de extrato seco a solução deve apresentar valor igual ou superior a 11%.

Konishi *et al.* (2004) analisaram diferentes agentes solubilizantes de extratos de própolis, visando verificar como estes solventes influenciariam no rendimento, composição e atividade antimicrobiana. Constataram que a substituição de 50% do álcool etílico pela água foi interessante, assim como a substituição de 50% do álcool pelos solventes propilenoglicol ou polietilenoglicol, pois manteve o rendimento com resultados próximos a extração com etanol puro, porém com composição de extratos diferente. Os testes microbiológicos evidenciaram que *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* foram sensíveis aos extratos de própolis independentemente dos solventes utilizados, não ficando claro, entretanto se houve diferença de intensidades.

Foram identificados dois componentes da própolis que apresentam potencial anticárie, a Apigenina um potente inibidor da síntese de glucanos insolúveis em água e o tt-farnesol com atividade contra a membrana dos *Streptococcus* influenciando na permeabilidade e inibindo a produção de ácidos pelo *S. mutans* nos biofilmes. Koo *et al.* (2005) mostraram que as associações destes dois componentes com flúor apresentaram efeitos biológicos satisfatórios, com propriedade cariostática, diminuição do acúmulo do *S. mutans* nos biofilmes e na síntese de glucanos insolúveis.

Salomão *et al.*, em 2007, utilizaram DMSO para a extração da própolis, conseguindo excelentes atividades antimicrobianas em amostras brasileiras, afirmando que este solvente tem baixa toxicidade em humanos podendo ser utilizado de forma segura. Fica evidente que a escolha do solvente é de extrema importância, posto que interfere na composição do produto final por interagirem com as partículas presentes.

Foi desenvolvido um processo químico de tipificação e várias substâncias químicas presentes na própolis brasileira, empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), identificando-se e quantificando-se com precisão os diferentes compostos presentes. Marcucci *et al.* (2007) concluíram que a própolis brasileira possui um marcador principal, isto é, um componente majoritário que aparece na maioria das amostras analisadas: o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA) denominado Artepelin C ®. Outro fator importante da tipificação é a possibilidade de confeccionar produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene oral, conhecendo-se o tipo de própolis empregada e as quantidades dos componentes bioativos presentes, características nunca antes relatadas em publicações e patentes sobre própolis.

2.3.3 Propriedades biológicas

Grange & Davey (1990) confirmaram a atividade antimicrobiana da própolis após testes *in vitro*. Foi utilizado o método de determinação da Mínima Concentração Bactericida (MCB), após realização da dupla diluição na proporção de 1:20 em nutrientes. Os resultados mostraram a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp*, entre outros micro-organismos testados, com melhor efeito inibitório contra coccus e Gram-positivos.

Opermann & Nodari, em 1996, realizaram um ensaio clínico com a participação de 20 voluntários acadêmicos de odontologia, avaliando a capacidade de inibição da placa bacteriana supragengival, após 24 horas da aplicação de solução de Própolis a 30% em álcool 70°, comparado com aplicação de álcool 70° puro e grupo controle. Os resultados demonstraram um melhor desempenho da solução de própolis, com uma redução significativa da placa formada, tanto nas faces livres como proximais, sugerindo que estudos de curta duração são úteis como estágios iniciais para seleção de agentes que visam o controle de placa.

Steinberg *et al.* (1996) avaliaram *in vitro* os efeitos antibacterianos da própolis e do mel, concluindo que o extrato com 20% de própolis e 60% de etanol mostrou efeito inibitório sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, mesmo em baixas concentrações. Com relação ao mel, em concentrações maiores observaram-se inibição de 25% do *S. mutans* e 33% do *S. sobrinus*, já em concentrações

menores o crescimento bacteriano não foi inibido. Foram realizados também testes clínicos *in vivo*, a partir de saliva de 10 voluntários, 10 minutos e uma hora após a aplicação bucal da solução de própolis, com redução de 38% na contagem total de micro-organismos com a utilização da própolis e redução de 60% com aplicação do mel.

Park *et al.* (1998c) demonstraram atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis sobre *Streptococcus mutans*, *Actinomyces Naeslundii* e *Staphylococcus aureus* por testes de difusão em ágar. O extrato inibiu o crescimento bacteriano e a atividade da glicosiltransferase, uma endoenzima bacteriana que sintetiza os polissacarídeos extracelulares da parede celular a partir da sacarose. A própolis utilizada para confecção dos extratos foi extraída de várias regiões do Brasil como, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio Grande do Sul, Goiás e Paraná, sendo todas elas investigadas. A amostra do Rio Grande do Sul obteve a maior inibição da atividade enzimática e crescimento bacteriano, apresentando altas concentrações de flavonóides como, Galangina e Pinocembrina.

Os produtos contendo própolis têm aparecido no mercado em diversas formas farmacêuticas como dentifrícios, géis, pastilhas e enxaguatórios bucais. Panzeri *et al.* (1999) estudaram a atividade antimicrobiana da própolis utilizando o método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e verificou sua eficiência contra bactérias Gram-positivas. Posteriormente, desenvolveu um dentifrício na forma de gel contendo 3% de própolis, e o avaliou clinicamente, constatando que ele foi mais efetivo do que um dentifrício semelhante, sem própolis.

Zárate-Pereira (1999) confirmou a ação positiva contra *Streptococcus mutans* em um ensaio clínico com 46 crianças portadoras de cárie ativa, divididas em três grupos, submetidas a bochechos diários com fluoreto de sódio a 0,05%, fluoreto de sódio a 0,2% ou extrato de própolis a 5% associado a fluoreto de sódio a 0,05%. Os resultados mostraram uma atividade antibacteriana maior da solução de própolis acrescida de fluoreto a 0,05% em relação ao *S. mutans*, principal micro-organismo responsável pela cárie dentária.

Park *et al.* (2000b) utilizando própolis das regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil, avaliaram extratos etanólicos quanto à atividade anticancerígena e antiretroviral. Na avaliação da atividade anticancerígena, células humanas cancerosas cultivadas em laboratório foram colocadas em contato com os extratos e após intervalo de tempo, analisadas quanto ao número de células viáveis e

comparadas ao grupo controle. Os extratos inibiram o crescimento de células cancerosas em 14 a 97%. No teste anti-retroviral, foi testado a inibição da replicação do vírus HIV em células de linfócitos H9, comparado com a droga AZT. Os resultados revelaram atividade seletiva dos extratos de própolis para o vírus HIV. Os autores realçam a necessidade de que os testes *in vitro*, sejam comprovados em modelos animais para validar os resultados observados até então.

Silva *et al.*, em 2000, realizaram uma pesquisa para verificar histologicamente a ação de uma solução de extrato alcoólico de própolis a 10 e 30% em feridas da mucosa bucal de ratos, divididos em grupos que receberam curativos de 6 em 6 horas durante 3 a 14 dias. Concluíram que a própolis não provoca nenhuma reação inflamatória e induz a formação epitelial, neoformação vascular e fibroblástica do tecido conjuntivo subjacente. A solução alcoólica de própolis a 10% estimulou a reparação tecidual, podendo ser eficaz no tratamento de lesões de mucosa em humanos, enquanto a solução a 30% retardou o processo tecidual, promovendo alterações na velocidade de cicatrização da ferida.

Abreu *et al.* (2000) avaliaram 50 escolares com altos antecedentes de cárie, porém sem diferenças significativas no índice de Cariados Perdidos Obturados por Dente (CPO-D). Através de um estudo duplo cego analisou o efeito do uso de dentifrícios com própolis na atividade anticariogênica. Os escolares foram divididos em dois grupos, sendo que o grupo controle que utilizou um creme dental comum e o outro, dentifrício com própolis a 0,8%. A pesquisa foi realizada durante 18 meses comprovando a eficácia do creme dental com própolis, através da redução de 85,6% no número de afetados e de 72,7% no índice de cárie do grupo teste.

Swerts *et al.*, (2002), em uma revisão de literatura sobre a atividade antimicrobiana da própolis em bactérias bucais, confirmaram as suas inúmeras propriedades farmacológicas e principalmente a inibição *in vitro* de bactérias cariogênicas e patógenos periodontais. Concluíram ainda que a sua ação está associada à inibição das glicosiltransferases presentes nas membranas plasmáticas das bactérias, afetando também a motilidade celular.

Gebara *et al.*, em 2002, testaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontopatogênicas e micro-organismos superinfectantes, observando que a CIM foi de 1 µg/ml para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Capnocytophaga gingivalis* e de 0,25µg/ml para *Prevotella intermédia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium*

nucleatum. Os resultados mostraram que o extrato de própolis teve atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados, apresentando potencial de uso como adjuvante no tratamento da DP, porém, é importante ressaltar que os testes *in vitro* não se assemelham às condições das bolsas periodontais na DP, havendo a necessidade de mais estudos para verificar se as concentrações aferidas possuem eficiência prática sem causar maiores danos locais e sistêmicos.

Em 2002a, Koo *et al.*, com o objetivo de avaliarem o efeito da solução de própolis sobre a placa acumulada, selecionaram seis voluntários que após a remoção de toda placa com profilaxia e limpeza interdental, se abstiveram de higiene oral por três dias e realizaram bochechos com solução de sacarose cinco vezes ao dia para realçar a formação de placa. Para o controle da mesma, realizaram bochechos com enxaguatório, contendo 3% de própolis, 20% de etanol, 5% de propilenoglicol e água deionizada. Após verificar o índice de placa ao final dos 3 dias, obtiveram como resultado a redução da placa dental em 61.7% quando comparada com a solução placebo, demonstrando que a própolis pode vir a ser um importante agente de controle e prevenção das patologias orais.

Zárate-Pereira (2003) avaliou *in situ* a ação da própolis no desenvolvimento da cárie dentária e formação do biofilme, com a participação de 4 voluntários que utilizaram um dispositivo intra-oral implantado com blocos de esmalte. O estudo procedeu-se em duas etapas, uma de controle e outra com aplicação de duas gotas de extrato etanólico de própolis a 5% uma vez ao dia. Ao final das etapas constatou-se a partir de análise microbiológica da placa acumulada sobre o dispositivo, a redução de micro-organismos como *Lactobacillus*, *Streptococcus* totais e do grupo *mutans*. O teste de dureza do dispositivo de esmalte também revelou a redução da perda mineral e conseqüentemente a diminuição do potencial cariogênico.

Blosfeld *et al.*, em 2004, analisaram *in vitro* a capacidade da própolis do estado de Santa Catarina, Brasil, diluída em etanol a 80%, em inibir bactérias presentes na placa supra-gengival. Os espécimes clínicos foram coletadas da placa supragengival de pacientes com doença periodontal e de pacientes tratados, cultivados e submetidos à ação de discos impregnados com a solução de própolis. Os resultados revelam que a solução possuiu ação inibitória contra os micro-organismos presentes nas amostras de pacientes doentes e tratados.

Bruschi *et al.* (2005) através de uma revisão de literatura sobre o uso da própolis em periodontia, observaram a viabilidade da produção e utilização de apresentações farmacêuticas de própolis, nos tratamentos periodontais, assim como na inibição da formação da placa e desenvolvimento das gengivites, além da atividade eficaz contra bactérias anaeróbicas, que frequentemente estão associados às periodontites destrutivas.

Swerts *et al.* (2005) avaliaram o efeito da associação de clorexidina e própolis a 0,012%, na aderência de *Streptococcus sp*, sobre a superfície de uma “bengala” de vidro capilar. Após a pesagem das “bengalas” verificaram-se que a solução associada inibiu o crescimento de *S. sanguis*, *S. salivarius* e *S. mutans*, em concentrações mínimas inibitórias próximas às encontradas com a solução de clorexidina. Ambas as soluções inibiram drasticamente a aderência de *S. mutans* e *S. sanguis*, embora em relação à *S. salivarius*, a solução associada tenha sido mais eficaz.

Alguns componentes presentes na própolis, como os flavonóides, são responsáveis por diversas alterações estruturais e funcionais na parede celular de certos micro-organismos. Scazzochio *et al.* (2006) investigaram os múltiplos aspectos da atividade antimicrobiana da própolis utilizando a CIM para avaliar a sua ação sobre alguns fatores de virulência bacteriana, como as enzimas coagulase, lipase e a formação do biofilme. Os testes com algumas bactérias Gram-positivas demonstraram que o extrato etanólico de própolis a 70% danificou a célula, com a supressão da atividade da lipase de *Staphylococcus sp* e inibição do efeito da coagulase em *S. aureus*, com CIM de 1,25 mg/ml. A associação de própolis a alguns antibióticos resultou em um aumento no efeito antimicrobiano destas drogas, evidenciando um efeito sinérgico. Em relação à formação do biofilme, houve uma diminuição na aderência de *S. aureus* em cerca de 40%, a partir de ½ CIM, mostrando a correlação positiva dos EEP na inibição da formação do biofilme.

Os extratos comerciais de própolis apresentam variações por serem produzidos a partir de diferentes floradas, sendo muitas vezes constituídos de uma mistura de várias amostras coletadas em diferentes regiões do Brasil. Rezende *et al.* (2006) se propuseram a avaliar a atividade antimicrobiana de dois extratos comerciais etanólicos de própolis a 11% sobre *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus mutans*, utilizando o método da CIM em caldo. Os resultados demonstraram que a

atividade antimicrobiana dos extratos é mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas.

Gonsales *et al.* (2006) investigaram a atividade antimicrobiana e teor de flavonóides de própolis coletada em diferentes estados do Brasil. Os teste de difusão em discos foram realizados utilizando as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. E como controle utilizaram antibióticos bastante comuns na Periodontia, como tetraciclina e ampicilina. Os extratos de própolis testados, inibiram o crescimento de *S. aureus*, mas não de *E. coli*. Após análise química, constataram-se que o teor de flavonóides foi bastante variável de acordo com a região geográfica. Concluíram que os EEP foram efetivos contra Gram-positivos independente da amostra testada.

Silva *et al.*, em 2006b, analisaram a composição química e a atividade antimicrobiana da própolis proveniente do estado da Paraíba, sobre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, através de testes de halo inibitório. Não foram constatadas nenhuma inibição no crescimento das bactérias testadas. A própolis colhida nas diferentes estações do ano mostrou-se diferente na composição química, como teor de flavonóides. A própolis amostrada nos períodos de chuva apresentou os melhores valores para os compostos bioativos.

Ary – Júnior *et al.* (2006) compararam a atividade antimicrobiana da própolis de três regiões do Brasil, através da preparação de extratos alcoólicos e determinação da concentração inibitória mínima. Dentre as própolis testadas a de Botucatu-SP possui maior eficiência sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp* e *Candida Albicans*. Enquanto para *Escherichia coli*, a própolis mais eficiente foi de Urubici – SC, e para *Pseudomonas aeruginosa* a própolis de Mossoró – RN foi a que mais se destacou. Confirmando assim, que a diferença no local de produção e coleta influencia na composição química da própolis.

Devido à grande variedade da composição química, a própolis apresenta várias atividades farmacológicas, como antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, antitumoral e antifúngica. Longhini *et al.* (2007) testaram a atividade antifúngica de própolis frente à leveduras isoladas de onimicoses, infecções de difícil tratamento. Demonstrando que esta é uma excelente opção de tratamento devido ao resultado positivo e sua baixa toxicidade.

Sperança *et al.* (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis a 30%, 20%, 10% e 5%, sobre culturas mistas provenientes de bolsas periodontais. Utilizando testes *in vitro* de difusão em discos, observaram que todas

as concentrações inibiram o crescimento bacteriano, sugerindo a utilização das concentrações menores, evitando assim a resistência microbiana.

Angelo *et al.*, em 2007, avaliaram a eficiência de soluções de própolis para bochecho a 6,25%, em crianças cárie ativas, utilizando como controle fluoreto de sódio a 0,2%. Constataram o desempenho efetivo da solução de própolis, que apresentou maior capacidade de redução de *Streptococcus mutans* quando comparada ao fluoreto de sódio. Sendo uma alternativa viável, por não apresentar efeitos adversos.

Simões *et al.* (2008) realizaram um estudo *in vitro* comparando a ação de extratos de própolis a 11, 20, 30%, com anti-sépticos bucais Periogard®, Listerine®, Malvatricin® e Parodontax®, frente aos micro-organismos presentes na saliva de humanos. Após a coleta da saliva, adição de glicose a 25% e incubação, verificaram que os extratos de própolis nas diferentes concentrações apresentam a mesma eficácia antimicrobiana, comparativamente à ação dos produtos industrializados. Na segunda fase das experimentações realizadas *ex vivo*, visaram à determinação da atividade antibacteriana dos extratos de própolis. Após coleta da saliva foi realizada o enxágue com as soluções, mostrando que os extratos apresentam a mesma atividade antimicrobiana, sendo indicado o uso da formulação a 11% devido a eficácia conjugada à baixa concentração.

De Carli *et al.*, em 2010, realizaram um ensaio duplo cego randomizado, com 97 escolares, para investigar a ação de extrato de própolis 5% isolado e associado ao fluoreto de sódio 0,05%, sobre acúmulo de biofilme dental. Após contagem dos níveis de *S. mutans*, presença de biofilme e manchas brancas, os resultados foram comparados com os níveis iniciais. Concluíram que o gel de própolis associado ao fluoreto de sódio foi eficaz na redução dos níveis salivares de *S. mutans* e acúmulo de placa bacteriana, além de remineralizar manchas brancas.

2.3.4 Toxologia

Baseado em uma extensa revisão de literatura, Burdock (1998) concluiu que apesar da grande diferença de doses de própolis administradas em cobaias, é possível confirmar a baixa toxicidade do produto. Como os flavonóides são os constituintes primários biologicamente ativos dos extratos, estes estão diretamente relacionados com esta baixa toxicidade. A dose segura recomendada para humanos

seria de 1,4 mg/kg, em função do peso por dia, ou de aproximadamente 70 mg/dia. A própolis é composta por inúmeras substâncias e possui um elevado grau de absorção e solubilidade. A administração oral pode levar à presença de resíduos do produto na urina. Apesar de seu metabolismo não ser muito bem elucidado, sabe-se que os flavonóides são muito bem metabolizados sem apresentar acúmulo no organismo.

A própolis vem sendo muito utilizada pela população como um fármaco natural e alternativo, para o tratamento de diversas patologias, sem se ter pleno conhecimento sobre suas indicações, contra-indicações, mecanismos de ação e posologia recomendada. Vários produtos comerciais podem ser encontrados no mercado brasileiro, e embora se encontrem dentro dos padrões da legislação brasileira, não apresentam posologia, indicações de uso ou contra-indicações, não obstante os cuidados necessários com a automedicação. É um antibiótico natural, como tal deve ser usado com prudência, respeitando condutas de administração visando principalmente evitar a resistência microbiana (SANTOS, 1999).

Apesar de ser uma substância natural, a própolis, como todo medicamento, pode apresentar além de efeitos benéficos algum efeito adverso. De acordo com Manara *et al.* (1999), mais estudos devem ser feitos para elucidar o uso da própolis na odontologia, pois apesar das evidências de atuação positivas, há necessidade de aprofundamento no tocante a estudos da composição, atividade terapêutica, efeitos colaterais, padronização das soluções, indicações, maior divulgação da procedência e metodologia empregada na obtenção. Visto o grande aumento em seu uso comercial de forma empírica.

Faria Jr. *et al.* (2002), através de análise físico-química de 35 extratos etanólicos de própolis encontraram 5,71% das amostras fora dos padrões de qualidade, sendo estas reprovadas para comercialização e consumo humano. Em relação ao teor de flavonóides, compostos fenólicos, índice de oxidação e teor alcoólico, todas as amostras apresentaram-se dentro dos padrões de qualidade. Ressaltaram-se a necessidade da confecção de produtos á base de própolis com padrões compatíveis com um mercado cada vez mais exigente.

Ribeiro *et al.* (2004) investigaram os possíveis efeitos colaterais da própolis utilizando coelhos saudáveis como cobaias, nos quais foram divididos em grupos onde receberam cápsulas contendo própolis. Após 0, 15 e 30 dias os animais foram pesados e realizaram um estudo sobre os efeitos da própolis sobre o peso corporal

e os metabolismos protéicos, lipídicos, de minerais e carboidratos. Constataram-se neste ensaio biológico, que a própolis não apresentou toxicidade, por não ter afetado o ganho de massa e nem provocado alterações nos metabolismos testados.

O estudo dos diversos tipos e variações na composição química da própolis é extremamente importante para a aplicação prática deste produto. Com a associação dos conhecimentos sobre os componentes químicos presentes e as propriedades biológicas existentes, será possível formular as recomendações adequadas orientando os profissionais sobre o uso e indicações, para que sejam feitos de forma eficiente e segura (BANKOVA, 2005).

2.4 Vidro bioativo e suas aplicações

Os Vidros Bioativos em soluções orgânicas se decompõem e forma uma camada de hidroxiapatita, responsável pela ligação do material aos tecidos. De acordo com Gatti *et al.* (1993), as apatitas são um dos poucos grupos de fosfatos minerais produzidos e usados por sistemas biológicos, sendo o principal constituinte do esmalte dentário e tecido ósseo. Estudos histológicos mostram que a camada da hidroxiapatita promove a integração do implante bioativo aos tecidos.

Entre as propriedades biológicas atribuídas ao VB está sua capacidade antibacteriana. Stoor *et al.* (1998) através da incubação de bactérias orais em suspensão de Vidro Bioativo, avaliaram a atividade antimicrobiana dessas cepas. Observando que após 60 minutos, não se encontrava bactérias viáveis. E concluíram que o VB possui alto poder antimicrobiano, podendo ser utilizado como componente de produtos odontológicos, tanto do ponto de vista cariogênico como periodontal.

Biomateriais são compostos sintéticos ou naturais utilizados para substituir tecidos ou órgãos, visando recuperar sua função, ou com finalidade estética. Eles entram em contato permanente ou temporário com os tecidos do organismo e necessitam ter características apropriadas ao fim proposto (SIVAKUMAR, 1999).

Allan *et al.*, em 2001, avaliaram a atividade antibacteriana do vidro bioativo, sobre bactérias supra e subgingivais. Após 1 hora da exposição das bactérias ao produto, houve redução da viabilidade bacteriana, possivelmente devido as reações alcalinas provocadas pelo VB. O que também pode ocorrer *in vivo*, quando utilizado

para diminuir colonização bacteriana em tratamento periodontais. Novos estudos são necessários.

O Vidro Bioativo tem demonstrado amplo espectro de atividade antimicrobiana sobre uma variedade de bactérias orais e dérmicas. Essa atividade está relacionada diretamente com o pH, uma vez que as partículas de vidro neutralizam o pH, inibindo o crescimento bacteriano. Embora ainda não esteja bem esclarecido, o efeito antiinflamatório também está relacionado com o VB, que apresentou capacidade de reduzir a resposta inflamatória, diminuindo o eritema. Partículas de VB são utilizadas pela indústria cosmética, como ingredientes ativos de desodorantes antiperspirante, creme facial, condicionador para cabelos, esmalte, sombras, blush, batom, sabonete líquido, entre outros (LEE *et al.*, 2003).

Domingues *et al.* (2003) testaram a atividade antimicrobiana sobre *A. actinomycetemcomitans* do Vidro Bioativo associado à tetraciclina, como um dispositivo de liberação controlada. E encontraram uma maior atividade na associação VB tetraciclina em comparação ao VB puro, sobre o patógeno testado, além de verificar que a tetraciclina não interferiu na bioatividade do VB.

Eberhard *et al.*, em 2004, através de testes *in vivo*, avaliaram os efeitos do uso tópico de Vidro Bioativo em pacientes com gengivite induzida. E constataram uma diminuição nos sinais clínicos da inflamação, com diminuição no sangramento, porém não observaram inibição na formação de biofilme, comprovando o potencial de o VB ser utilizado em Periodontia.

Vilhaça *et al.* (2005) avaliaram histologicamente a eficácia do vidro bioativo Biogran®, na cicatrização de defeitos ósseos de duas paredes em macacos. Foram feitos dois sítios, um controle preenchido com coágulo e com outro teste com vidro bioativo. No sítio controle houve migração do epitélio juncional, porém ambos os sítios apresentaram nova formação óssea. No sítio teste houve deposição de novo osso ao redor e dentro das partículas de VB, a análise histológica mostrou uma nova inserção periodontal. Concluíram que o Vidro Bioativo teve um maior potencial de cura quando comparado ao debridamento isolado. A substituição das partículas de VB por novo osso ocorreu devido não apenas a uma atividade osteocondutora, mas também a uma capacidade osteoestimulatória.

Segundo Thomas *et al.* (2005), há uma boa quantidade de dados que dão apoio a utilização dos VBs em uma variedade de aplicações clínicas, principalmente na Periodontia devido seus efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios e de reparo em

defeitos ósseos, embora muitos estudos ainda fossem necessários para esclarecer todas suas propriedades biológicas.

Tai *et al.*, em 2006, realizaram um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, para avaliar quimicamente os efeitos de um creme dental com o vidro bioativo NovaMin®, na inibição do biofilme e controle da gengivite em comparação ao placebo com a mesma abrasividade. Após seis semanas de testes, os resultados mostraram diminuição significativa no índice de placa, quando comparado ao inicial, com redução de 58% no sangramento gengival e 16,4% no acúmulo de placa. Concluíram que o creme dental associado ao VB apresentou resultados positivos na melhora da saúde bucal.

Em um relato de caso clínico, Bosco *et al.* (2006), apresentaram resultados satisfatórios de um tratamento de defeito periodontal infra-ósseo com partículas de VB associadas ao uso de uma membrana de PTFE-e. Após acompanhamento de 4 anos verificaram-se diminuição tanto na largura como na profundidade do defeito periodontal tratado, por meio de avaliações radiográficas. Clinicamente, observaram diminuição na profundidade de sondagem, ausência de sangramento e manutenção das características de saúde gengival. Concluindo que o tratamento de defeitos ósseos com VB resultou em significativa formação óssea.

Durante o tratamento periodontal básico, os fatores etiológicos da DP são eliminados por meios mecânicos e químicos, enquanto que os defeitos anatômicos podem ser tratados cirurgicamente. Os materiais sintéticos têm despertado grande interesse na Periodontia devido à vantagem de dispensarem sítio cirúrgico adicional, à ausência de potencial de transmissão de doenças e à disponibilidade ilimitada. (CRUZ *et al.*, 2006).

Waltimo *et al.*, em 2007, testaram a eficácia antibacteriana de Vidro Bioativo em relação ao tamanho da partícula. A técnica utilizada foi da diluição em placas de Ágar e a bactéria testada foi *Enterococos* proveniente de infecções persistentes de canal radicular. Verificaram que a mudança de tamanho de micron para nanopartículas, promoveu um aumento de dez vezes na elevação da liberação de sílica e em três unidades no pH. O que provocou uma maior atividade antimicrobiana.

Munukka *et al.* (2008) testaram a atividade antimicrobiana de vidros bioativos, fabricado pela técnica Sol-Gel, sobre uma variedade de bactérias de importância clínica. E demonstraram forte inibição no crescimento, embora o tempo necessário

para o efeito foi variável. Constatando que o vidro bioativo pode ser uma auxiliar no controle de infecções em superfícies de implantes de próteses no corpo.

Os materiais cerâmicos têm sido muito utilizados como substitutos ósseos. O Vidro Bioativo, é composto de 45% de dióxido de silício (SiO₂), 24,5% de óxido de cálcio (CaO), 24,5% de óxido de sódio (Na₂O) e 6% de pentóxido de difósforo (P₂O₅) e age formando uma união química com os tecidos moles e ósseos circundantes. Além da propriedade osteocondutiva o VB possui ação osteoestimulatória, agindo como um arcabouço para suportar o crescimento ósseo (NASSER-NETO, 2008).

Corbi *et al.* (2010) realizaram uma comparação entre alguns biomateriais, como Osso bovino liofilizado β-Fosfato Tri-Cálcio, Hidroxiapatita, B2iovidro (procedentes de São Carlos –SP, Procell) e Perioglass®. Quanto ao tamanho e forma das partículas, aspecto superficial e densidade radiográfica. Os resultados radiográficos mostraram que todos os biomateriais avaliados apresentaram densidades radiográficas estatisticamente iguais, porém maiores do que a densidade do tecido ósseo. Há variações relevantes quanto à forma, ao tamanho e à rugosidade dos grânulos, entre os materiais testados. Características que podem estar diretamente relacionadas com ao desempenho clínico.

Os Vidros Bioativos previamente desenvolvidos contêm em sua composição silício, sódio, cálcio e pequenas quantidades de fósforo. Esses vidros foram patenteados e chamados de biovidros. Atualmente, eles são utilizados, em preenchimento de cavidades ósseas, enxertia em cirurgias para correção de defeitos periodontais e tratamento de dentina hipersensível. Carbonari *et al.*, em 2011, desenvolveram um VB e testaram como enxerto em tíbias de coelho. Foram realizados testes para avaliar a citotoxicidade desses VBs, demonstrando que estes não possuem nenhum efeito tóxico. Após oito semanas dos testes *in vivo*, as amostras das áreas de cicatrização foram removidas e observadas à microscopia eletrônica. Verificaram-se a deposição de tecido ósseo por toda a superfície do enxerto, inclusive na região medular.

3 OBJETIVOS

Objetivos gerais

Avaliar a efetividade do vidro bioativo puro e dopado com própolis verde, quanto à inibição de bactérias isoladas e provenientes de infecções periodontais.

Objetivos específicos

- a) Caracterizar quimicamente a própolis verde através da Cromatografia líquida de alta eficiência. Fracionar o extrato de própolis através da partição líquido-líquido, identificando as frações com maior teor de substâncias fenólicas;
- b) Definir, *in vitro*, as concentrações inibitórias mínimas das frações de própolis frente à bactérias padronizada;
- c) Associar as frações de própolis com vidro bioativo, realizando sua caracterização física;
- d) Avaliar, através de teste *in vitro*, a ação antimicrobiana do vidro bioativo puro e com incorporação à própolis verde, sobre bactérias isoladas e biofilmes heterotípicos provenientes de infecções periodontais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da própolis

A própolis avaliada foi a do tipo verde, adquirida no apiário Vovô Pedro®, localizado em Campo Grande (MS), originada da espécie botânica *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo).

4.2 Análise química da Própolis

A análise da amostra foi realizada no Departamento de Química da UFMS, através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando o cromatógrafo Shimadzu LC 6^a (Japão).

Cinquenta miligramas do extrato seco foram solubilizados em metanol/água na proporção 8:2 (v/v) e submetidos à extração em fase sólida utilizando-se como fase estacionária sílica de fase reversa C-18. Este tratamento, dado a amostra, tem por finalidade obter um extrato de própolis livre de material graxo, como cera residual. Posteriormente, a fase hidrometanólica (metanol/água 8:2) foi seca à temperatura ambiente e, posteriormente, ajustada a concentração de 1,0 mg/mL de própolis em metanol. Para verificar a possível presença de substâncias fenólicas como flavonóides e ácidos cafeicos foi realizado o espectro em Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio. A sequência da CLAE está descrita (Anexo 1). Os materiais de consumo, para CLAE e RMN foram relacionados (Anexo 2).

4.2.1 Caracterização e identificação das frações a partir do extrato etanólico

A amostra de própolis foi submetida à extração com etanol conforme, Snyder 1997. Com a finalidade de dividir a amostra em frações, localizando as porções com maior quantidade de substâncias fenólicas e possivelmente com atividade antimicrobiana.

O extrato etanólico foi fracionado por uma partição líquido-líquido, em gradiente de polaridade crescente, obtendo-se as frações: hexano; acetato de etila; hidroalcoólica; e posteriormente submetidos à cromatografia em coluna com diferentes suportes. Todo este processo visa separar, caracterizar e purificar os

metabólitos secundários presentes. As substâncias isoladas foram submetidas a análises espectrométricas de RMN hidrogênio 1 e carbono 13, para elucidação estrutural destas.

- Cromatografia em coluna utilizou sílica gel (70-230 ou 230-420 Mesh), para separação e/ou purificação dos metabólitos secundários.

- Cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20, para separação e/ou purificação dos metabólitos secundários das frações mais polares.

- Cromatografia em camada delgada comparativa, para observação ou/não da purificação dos metabólitos secundários.

- Nestes processos foram utilizados solventes de grau PA, sendo estes: metanol, acetato de etila, diclorometano, hexano, etanol, acetona e ácido acético glacial, e também solvente deuterado para obter os espectros de RMN.

4.3 Armazenamento e secagem do extrato

O extrato foi armazenado em frascos de plásticos fechados sob temperatura de 4°C. No período de testes, o extrato foi pesado em balança analítica digital e dessecado em estufa sob temperatura de 40° C até que seu peso se tornasse constante, para obtenção do teor de matéria seca. As amostras foram então dissolvidas em álcool de cereais e suas concentrações ajustadas a 30%, (P/V) constituindo assim soluções estoques. Estas foram esterilizadas por centrifugação a 10.000 G em temperatura ambiente por 30 minutos. O *pellet* foi desprezado e o sobrenadante coletado assepticamente e guardados em geladeira ao abrigo de luz até os procedimentos de diluição. O controle de esterilidade foi feito por semeadura de alíquotas de 0,1 mL em Ágar Sangue (Diagnilab®, Barcelona/Espanha), incubado a 35°C por 48 horas.

4.4 Incorporação da própolis ao vidro bioativo

Uma amostra de vidro bioativo obtida com 60% Si; 36% Ca e 4% P, preparada pela técnica de Sol-Gel (anexo 4), segundo Coelho (2003), foi gentilmente cedida pelo grupo de biomateriais do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da

UFMS. Para a incorporação, alíquotas de 0,2g de VB foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 2mL de EPV ou frações, e incubados por 24h a 35°C. Após este período, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado de VB foi seco em estufa a 50°C por 24h e reduzido a pó. Os compósitos foram armazenados em geladeira até o momento das análises.

4.5 Avaliação da atividade antibacteriana

4.5.1 Avaliação da CIM de culturas puras sobre as frações de própolis

A fim de verificar-se a presença de atividade antibacteriana, a própolis foi inicialmente testada frente às bactérias anaeróbicas facultativas, procedentes da American Type Culture Collection (ATCC), pertencentes ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFMS:

- *Escherichia coli* ATCC 25922

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Primeiramente foram realizados testes antimicrobianos das frações sem adição das partículas de Vidro Bioativo. Os procedimentos foram realizados segundo o *Clinical and Laboratory Standards and Institute* (CLSI) de acordo com a norma M7-A6 (2006). A técnica escolhida foi a de macrodiluição em caldo Mueller Hinton, ante a insolubilidade das frações de própolis verde em água, optou-se pela diluição em DMSO (Dimetilsulfóxido) em concentração 12,5%, partindo da concentração de 10240 µg/mL, diluindo serialmente em base 2 até 20 µg/mL. Foram incorporados 0,5 ml de cada uma das concentrações em 0,5 ml das respectivas culturas de bactérias em fase ativa de crescimento, com a concentração ajustada em 5×10^5 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias). O ajuste da concentração bacteriana foi feito por meio de turbidimetria em espectrofotômetro Marca Metrolab modelo 330, Buenos Aires, Argentina, a 660nm de comprimento de onda. Uma vez ajustado, o inóculo foi suspenso em Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (BD®, New Jersey, EUA), duas vezes concentrado, a fim de manter a concentração original do meio após a adição das diluições da substância teste.

Os testes foram realizados em duplicata para as duas bactérias e com as quatro frações de própolis, incluindo uma amostra do extrato total (sem fracionamento). Dois controles foram introduzidos, um para o meio de cultura e outro para o diluente (DMSO). Os tubos foram incubados por 48 horas a 35°C. Após este período, cada diluição foi semeada em placas de ágar sangue em volumes de 2µl (aproximadamente 10⁴ bactérias por ponto) e novamente incubadas. A leitura foi realizada após 48 horas.

O título foi expresso em µg/mL, correspondendo à menor concentração de própolis que inibiu o crescimento dos inóculos quando comparados ao controle.

4.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana por meio de análise de sobrevivência pela técnica do plaqueamento em ágar em *Pour Plate* de culturas puras sobre à própolis verde incorporada ao VB

Utilizou-se as culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC e *Escherischia coli* ATCC, para se avaliar o tempo de sobrevivência após exposição aos compósitos. Culturas em fase ativa de crescimento foram ajustadas na concentração inicial de 10⁶/mL de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), em Solução Simulada de Fluido corpóreo (SBF) preparado segundo Kokubo *et al.*, 1990 (Anexo 5). O ajuste foi executado com o auxílio do espectrofotômetro (Metrolab®, modelo 330, Buenos Aires, Argentina) a 660 nm de comprimento de onda, que correspondeu a uma absorbância de 0,08 a 0,1.

As suspensões de bactérias foram adicionadas na proporção de 1:10 (peso/volume) às frações de própolis já incorporadas ao VB e secas (0,2 g para 2 mL SBF). No tempo zero todos os tubos apresentavam a mesma concentração de bactérias. Fez-se os testes para as 3 frações, extrato total, vidro bioativo puro e um controle só com bactérias.

Em intervalos de 24 horas e por um período de 4 dias para *E. coli* e 9 dias para SA., alíquotas de 100µl de cada uma das frações, foram retiradas e diluídas em água peptonada 900 µl por tubo, até a sétima potência. A seguir ,100 µl de cada diluição, foram plaqueadas em meio Ágar Brucella (BD® New Jersey, EUA) pela técnica de *Pour Plate*. Após a homogeneização do inóculo com o meio e da sua solidificação, as placas foram incubadas a temperatura de 35°C, por uma noite e o título expresso em número de UFC por microlitro de suspensão. A contagem das

UFC foi feita com o auxílio de lupa estereoscópica sob o aumento de 25X, nas placas cuja diluição possibilitou a contagem entre 30 e 300 UFC.

4.5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana contra biofilmes de bactérias periodontopatogênicas

Para induzir a formação *in vitro* de biofilmes, cultivos mistos de bactérias periodontopatogênicas pertencentes a bacterioteca do laboratório de microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, foram retirados da criopreservação e semeados em meio BHI (Anexo 6) e incubados a 35°C até atingirem fase ativa de crescimento. Todos os ensaios com biofilme foram conduzidos em anaerobiose no interior de jarras tipo Brewer.

Placas de cultura de células marca TPP[®] de poliestireno de 40 mm X 11 mm, tiveram sua superfície tratada com 100 μ L de saliva humana estéril (por centrifugação a 10.000 G) e secas em fluxo laminar a fim de se formar um filme condicionante, fundamental para a adesão do biofilme á superfície do poliestireno.

Após o condicionamento, as placas receberam 2,0 mL de meio BHI e foram inoculadas com 0,1 mL dos cultivos mistos em fase ativa de crescimento. Na sequência foram rapidamente acondicionadas em suportes confeccionados em isopor, no interior de jarras e incubadas sob agitação a 60 r.p.m (rotação por minuto) em anaerobiose, a 35°C por 24 horas.

Com os biofilmes já formados sobre as placas, o meio de cultura foi esgotado e as placas receberam 1 mL de solução VB (0,1g) e SBF (2mL). Nos testes com biofilmes foram utilizados VB puro, VB associado ao extrato total de própolis, tetraciclina 50 mg, e um controle só com meio de cultura, em quadruplicata. Após 60 minutos a solução foi esgotada das placas e acrescentaram-se 0,2 mL de azul de tetrazólio (MERK[®]) como indicador de respiração, os processos respiratórios reduzem o sal de tetrazólium à formazan, um produto insolúvel de coloração azulada que indica a atividade metabólica da cultura (TERGERDY *et al.*, 1967). As placas foram novamente incubadas em atmosfera de CO₂, em jarras de anaerobiose a 35°C por 24 horas.

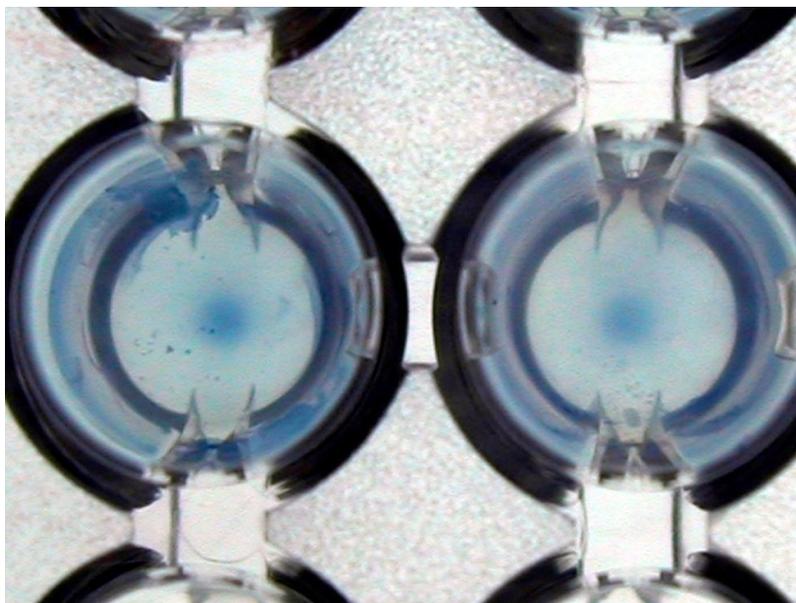


Figura 1 - Produção de formazam por redução do Azul de Tetrazólium em biofilmes heterotípicos de bactérias periodontopatogências

Cada micropoço foi lavado com 100 μ L de DMSO para a dissolução do biofilme e o material resultante, diluído em 2 mL de um solvente orgânico (20% de etanol (95%) e 0,75% de DMSO em água) e incubados em congelador para a extração do formazam. O congelamento rompe os corpos bacterianos e disponibiliza uma quantidade maior de formazam ao meio. Após o tratamento anterior, o formazam foi solubilizado pela adição de 1 mL de acetona a cada volume tratado. As soluções foram clarificadas por centrifugação à 4000 rpm.

4.6 Caracterização física por DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura)

Calorimetria diferencial de varredura é uma técnica termoanalítica em que a diferença na quantidade de calor necessária para aumentar a temperatura de uma amostra de referência é medida.

Neste estudo avaliamos a decomposição de substâncias presentes na própolis em relação a temperatura, com a finalidade de verificar a presença de substâncias distintas. Para este teste as amostras foram analisadas em equipamento marca Shimadzu® modelo TA50H, equipado com cadinho de platina sob fluxo de ar sintético (nitrogênio e oxigênio).

5 RESULTADOS

5.1 Análise química da própolis verde

O resultado da cromatografia por CLAE do extrato de própolis verde está representado na Figura 1. Nesta primeira análise foi possível averiguar que a própolis verde é rica em metabólitos secundários (provavelmente substâncias fenólicas como os flavonóides) tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Esta afirmação baseia-se na intensidade de picos observados, que fornece um dado quantitativo e pela complexidade do cromatograma observada através da quantidade de picos que nos fornece um dado qualitativo confirmando a diversidade de substâncias.

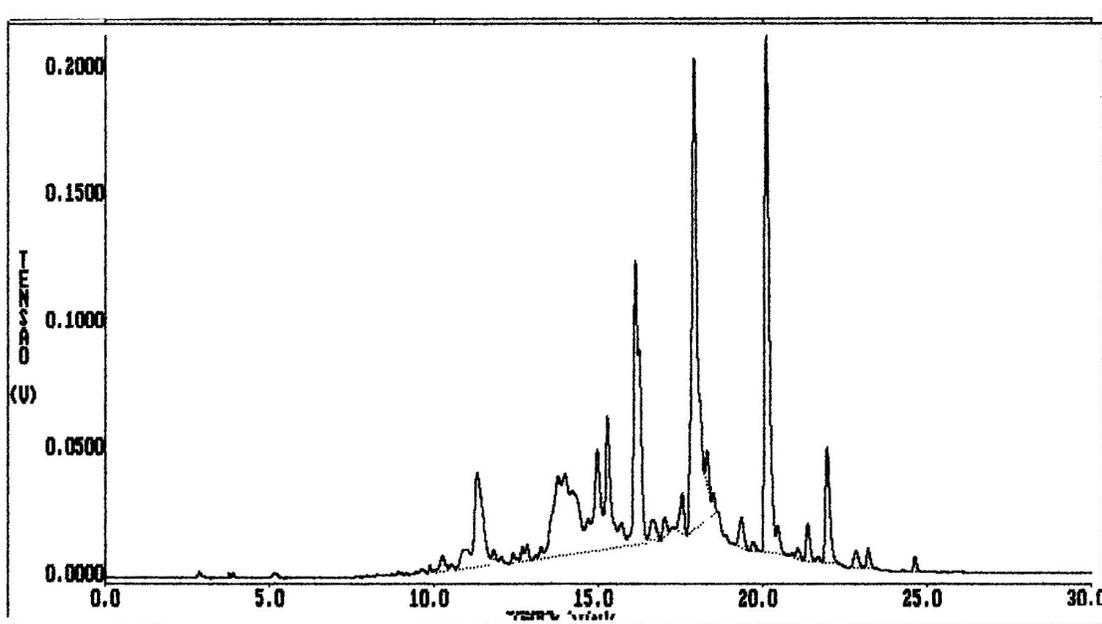


Figura 2 - Cromatograma obtido para o extrato etanólico de própolis verde (Coluna phenomenex Luna C-18, 5 μ , 150X4,6mm, CH₃CN/H₂O 5-100% até 20 min, 20 a 30 min 100% CH₃CN, f = 1,0ml/min, λ = 254 nm).

O espectro de RMN de hidrogênio da própolis verde (Anexo 3), mostrou uma complexidade de sinais na região de hidrogênio de anel aromático compatíveis com sinais observados para substâncias fenólicas como flavonóides e derivados do ácido cafeico. Assim, foi possível confirmar que a própolis analisada possui como principais constituintes químicos estas classes de substâncias.

A partição líquido-líquido dividiu o extrato de própolis verde em frações hexano que é apolar e normalmente onde está o Artepelin C; acetato de etila com média polaridade e com a presença de maiores quantidades de fenóis, o que pode caracterizar os flavonóides; e hidroalcoólica, fração também polar com presença de compostos fenólicos, porém em menores quantidades.

5.2 Análise da CIM de culturas puras sobre as frações de própolis

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressa em µg/mL, das três frações mais o extrato total de própolis verde

Frações De Própolis	Extrato Total	Acetato de Etila	Hexano	Hidroetanólica
	CIM µg/ml	CIM µg/ml	CIM µg/ml	CIM µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	640	640	1280	160
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	160	320	160	160

5.3 Titulação das culturas puras sobre VB e VB associado à Própolis e suas frações

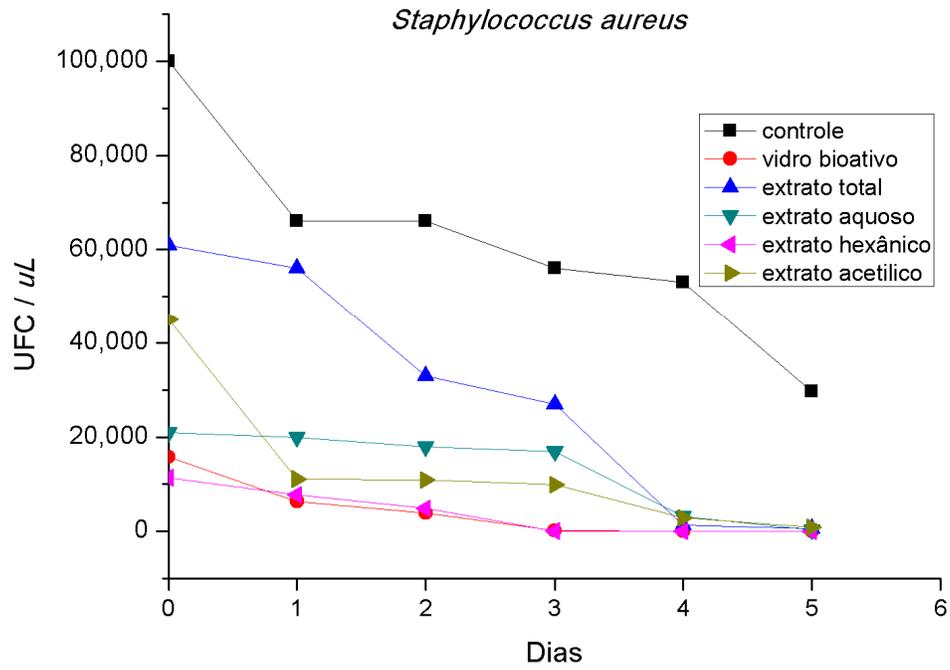


Figura 3 - Curva de sobrevivência de cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, exposta ao VB e VB associado à extrato total e frações hidroalcoólica hexano, e acetato de etila, de própolis verde.

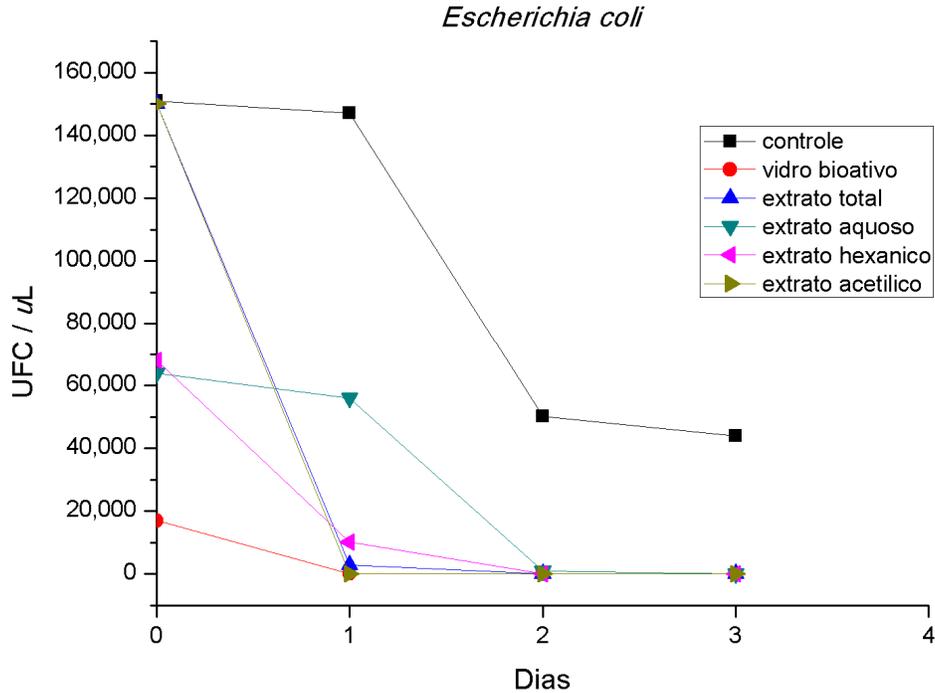


Figura 4 - Curva de sobrevivência de cultura de *Escherichia coli* ATCC 25922, exposta ao VB e VB associado à extrato total e frações hidroálcoolica, hexano e acetato de etila, de própolis verde.

5.4 Análise antimicrobiana do VB e VB associado à Própolis contra biofilme

Após exposição de 60 minutos, do extrato total de PV associado ao VB, VB puro e Tetraciclina, sobre biofilmes heterotípicos de 24h de crescimento em anaerobiose, constatou-se que o VB e a tetraciclina promoveram a inibição da atividade metabólica do biofilme. Já a associação PV/VB não eliminou por completo as bactérias, isso foi verificado pela presença do formazam, indicador de respiração celular.

5.5 Caracterização física por DSC

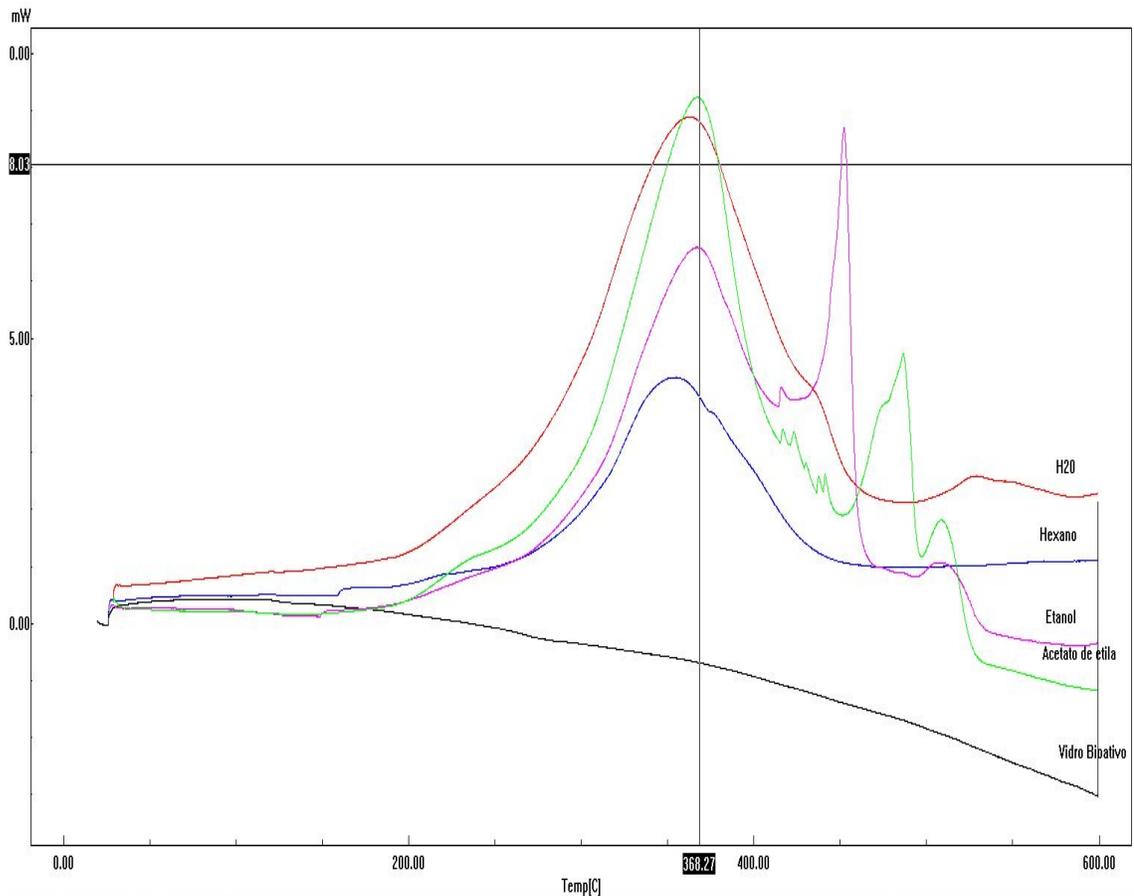


Figura 5 – Curva DSC obtidas em atmosfera de ar sintético de extratos de própolis verde e frações hidroalcoólica, hexano e acetato de etila, de própolis verde.

Os resultados da calorimetria diferencial de varredura demonstraram por diferença na altura dos picos de energia, que cada uma das frações de EPV incorporadas ao VB apresenta substâncias distintas, possivelmente flavonóides, e interagem ao VB de maneira diferente

6 DISCUSSÃO

A própolis é uma substância complexa, resinosa, formada de resíduos vegetais por abelhas *Apis mellifera* (COUTO & COUTO, 2002 ; JOHNSON *et al.*, 1994). Tem sido utilizada como remédio popular desde o antigo Egito, devido suas atividades antiinflamatória, antioxidante, anti-séptica, anticariogênica, bactericida, bacteriostática, antitumoral, antifúngica e cicatrizante (GALVÃO & GALVÃO, 2003; COSTA & OLIVEIRA, 2005; LONGHINI *et al.*, 2007).

No mundo, o consumo de própolis é cerca de 700-800 toneladas / ano, e o Brasil é o segundo produtor mundial, atrás somente da China (LUSTOSA *et al.*, 2008). O seu uso em Odontologia tem crescido, principalmente em periodontia, por ser uma aliada no tratamento periodontal, visto sua atividade antimicrobiana (GEBARA *et al.*, 2002; SWERTS *et al.*, 2002, SPERANÇA *et al.*, 2007) e de inibição do biofilme (ZÁRATE-PEREIRA, 2003 ; BRUSCHI *et al.*, 2005; DE CARLI *et al.*, 2010).

A própolis varia sua composição de acordo com a época da coleta, flora, espécie de abelha, densidade da colméia e contaminantes (MARCUCCI, 1996; PARK *et al.*, 2000a; COUTO & COUTO, 2002.). Em um tipo de própolis são encontrados diferentes flavonóides, o que confirma os relatos de que a própolis varia a composição de compostos fenólicos de acordo com a região e flora onde é produzida (PARK *et al.*, 1997). Embora, Souza *et al.* (2010), após avaliarem os efeitos da sazonalidade sobre EP, não encontraram diferenças significativas sobre as características físico-químicas do produto.

A *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), é a principal fonte vegetal da própolis verde, (ALENCAR *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2008), tipo que tem grande aceitação não só pela coloração e aroma, mas também devido suas excelentes propriedades biológicas decorrentes da presença de derivados do ácido cafeico, substâncias fenólicas como flavonóides e artepelin C, presentes em alta proporção nesse tipo da própolis (ALENCAR *et al.*, 2005; SALATINO *et al.*, 2005).

Marcucci *et al.* (2007), citaram a CLAE como um processo químico de tipificação de substâncias presentes na própolis. Isso foi verificado neste estudo, que após análise química por CLAE mostrou que a própolis utilizada é rica em compostos orgânicos, devido a quantidade e altura dos picos observados no cromatograma (Figura 1). O extrato estudado também passou por uma partição

líquido-líquido separando-o em frações, a fim de distinguir as possíveis porções com maior concentração de flavonóides e artepelin C, e, conseqüentemente, com atividade antimicrobiana.

Teste de CIM contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram desenvolvidos por diversos autores. No entanto, há diferenças entre o grau de sensibilidade, principalmente devido a diversidade de metodologia empregada nos testes. Alguns autores utilizaram o método de difusão em ágar, que usa discos de papel embebidos em diferentes concentrações de própolis e verifica a presença de halo de inibição (PARK *et al.*, 1998c; ARY – JÚNIOR F *et al.*, 2006; REZENDE *et al.*, 2006), demonstrando a efetividade de EP contra essas bactérias. Já Silva *et al.* (2006), com a mesma metodologia não encontraram nenhuma atividade antimicrobiana de EP para *S. Aureus*, mostrando que, além da metodologia, a fisiologia bacteriana e sua resistência podem influenciar nos resultados.

Scazzochio *et al.* (2006), utilizaram o método de diluição seriada da própolis e incorporação em meio sólido, seguido da inoculação de quantidade padrão de bactérias, segundo (NCCLS, 2006), método também utilizado neste trabalho, e encontraram como CIM 1,25 mg/ml para *S. Aureus*. Os resultados por nós encontrados foram diferentes (Tabela 1), embora além do teste de CIM para extrato total, também realizamos para cada uma das frações. Com valores de 640 µg/ml para o extrato total, e variando de 160 a 1280 µg/ml para as frações de própolis verde. Confirmando a interferência da fisiologia bacteriana nos resultados, como também do tipo de própolis utilizada que pode apresentar características físico-químicas diferentes.

Gonzales *et al.* (2006), utilizando a metodologia de difusão em ágar contra *S. Aureus* e *E.coli.*, só encontraram inibição contra *S. Aureus.*, mostrando que bactérias Gram-negativas são naturalmente mais resistentes à ação de própolis, devido às propriedades de permeabilidade da parede celular dessas bactérias. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que tanto a *E coli.* como *S. Aureus* foram sensíveis ao extrato total e suas frações, o que denota a natureza antimicrobiana dos componentes presentes na própolis após a solubilização para separar as frações. Mais estudos são necessários para definir quais substâncias são responsáveis pelas atividades em cada uma das frações.

A própolis sendo um antibiótico natural tem sido muito utilizada pela população, mas ainda existem dúvidas com relação à dose recomendada, visto que

não há padronização quanto a posologia, indicação e contra-indicações (Santos V, 1999). Embora não seja um produto tóxico (RIBEIRO *et al.*, 2004) e os flavonóides sejam muito bem metabolizados pelo organismo (BURDOCK, 1998), esse deve ser utilizado com cautela, assim como todo antibiótico.

Os vidros bioativos são compostos cerâmicos que, devido à bioatividade, extraem uma resposta biológica em soluções orgânicas e se decompõem, formando uma camada de hidroxiapatita carbonata responsável pela união dos tecidos ao material. São formados por silício, sódio, cálcio e fósforo (NASSER-NETO, 2008) e atualmente utilizados na Odontologia para preencher cavidades ósseas, enxertos para correção de defeitos periodontais e tratamento de dentina hipersensível (CARBONARI *et al.*, 2011). Devido suas propriedades de osteocondução e osteoestimulação (VILHAÇA *et al.*, 2005; NASSER-NETO, 2008), forma um arcabouço que permite penetração de capilares, vasos sanguíneos e células, que possibilitam o crescimento ósseo.

Um dos destaques do VB é a biocompatibilidade, Carbonari *et al.* (2011), demonstraram que suas partículas não apresentam toxicidade, nem estimulam inflamação e rejeição.

Uma das propriedades do VB que tem despertado grande interesse é seu potencial antimicrobiano, embora comercialmente o VB só seja utilizado em correção de defeitos ósseo, alguns autores têm demonstrado sua importância quanto à inibição de bactérias periodontopatogênicas (STOOR *et al.*, 1998; ALLAN *et al.*, 2001; DOMINGUES, *et al.*, 2004; EBERHARD *et al.*, 2005; TAI *et al.*, 2006). Esta atividade está relacionada ao pH, devido as reações alcalinas provocada pelas partículas de VB, que inibem o crescimento bacteriano (LEE *et al.*, 2003; VILHAÇA *et al.*, 2005; WALTIMO *et al.*, 2007).

A capacidade antiinflamatória dos VBs em reduzir a resposta e diminuir o eritema já foi citada, embora esse fato ainda não esteja bem esclarecido (LEE *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 2005).

Os vidros bioativos podem ser dopados de substâncias com potencial para controlar infecções e inflamações (GUPTA & KUMAR, 2008). Após a incorporação das frações de própolis ao VB, as partículas passaram por testes físicos de DSC para verificar a presença de substâncias entre as frações (Figura 4). Os resultados demonstraram, por diferença na altura dos picos de energia, que cada uma das frações de EPV incorporadas ao VB apresentam substâncias distintas,

possivelmente flavonóides, e interagem ao VB de maneira diferente. Em nossas condições experimentais, muito provavelmente essa interação química promove uma reação de neutralização no VB que é alcalino, devido à acidez da própolis.

Em relação à atividade antimicrobiana do VB associado à própolis não se encontrou na literatura estudos a respeito, onde foi necessário desenvolver uma metodologia para pesquisa, devido ao aspecto inovador do trabalho.

Após incorporação da própolis ao VB, o material foi seco em estufa formando um pó fino, inodoro e de coloração esverdeada. Waltimo *et al.* (2007), afirma que quanto menor o tamanho da partícula do VB, maior a liberação de sílica e aumento do pH, o que conseqüentemente promove maior atividade antimicrobiana.

Para verificar a atividade antimicrobiana do VB puro e associado às frações de própolis, utilizamos a técnica *Pour Plate* através da curva de sobrevivência das bactérias *S. Aureus.* e *E. coli.* (resultados Figuras 2 e 3). Para morte total das bactérias o tempo variou de 4 dias para *E. coli* e 9 dias para *S. Aureus*, diferente de resultados encontrados na literatura onde a inviabilidade de bactérias orais ocorreu após 1 hora de exposição ao VB (STOOR *et al.*, 1998; ALLAN *et al.*, 2001). Essas diferenças podem ser novamente relacionadas com a sensibilidade das bactérias padrão utilizadas.

Munukka *et al.* (2008) testaram a atividade antimicrobiana de VBs obtidos pela técnica Sol-Gel, a mesma técnica utilizada neste estudo. Encontraram forte inibição no crescimento de bactérias de importância clínica, embora o tempo necessário para o efeito foi variável.

Neste teste foi possível observar que tanto o VB como a associação VB e frações de própolis verde apresentaram atividade contra os micro-organismos na forma planctônica.

Sabe-se que o biofilme periodontopatogênico é o responsável por desencadear as doenças periodontais (BONIFÁCIO *et al.*, 1999; NERCOLINI, 2004; LORENZO, 2004; SILVA 2006a). No biofilme, as bactérias ficam protegidas da ação de substâncias químicas e antimicrobianas, o que dificulta sua eliminação e nos revela a importância da realização de testes de destruição dos biofilmes *in vitro*, além dos tradicionais testes de CIM (PITTS *et al.*, 2003).

Nossa avaliação de exposição de biofilmes periodontopatogênicos formados *in vitro* sobre VB, VB associado ao extrato total de PV e tetraciclina por 60 minutos, mostrou que o VB e a já consagrada tetraciclina, são eficientes na inibição da

atividade metabólica do biofilme, enquanto a associação VB/PV não eliminou por completo as bactérias. Verificou-se que em ambientes mais complexos como biofilmes, esta associação não é favorável. Futuros estudos devem ser realizados para comprovar esses efeitos, e em que grau as reações de neutralização entre o VB e EPV podem comprometer essa associação.

Em relação ao VB puro, Tai *et al.* (2006), também verificou que o VB tem potencial para ser usado no controle de placa, após avaliar clinicamente os efeitos de um creme dental com vidro bioativo na inibição do biofilme e controle da gengivite.

Enquanto Eberhard *et al.*, em 2004, através de testes *in vivo* para avaliar os efeitos do uso tópico de Vidro Bioativo em pacientes com gengivite induzida, verificaram diminuição nos sinais clínicos da inflamação, porém não na inibição na formação de biofilme. Os resultados divergem ao apresentado neste trabalho, possivelmente influenciado pela metodologia utilizada de formação de biofilme *in vitro*.

Frente aos resultados apresentados, foi possível inferir que este estudo mostrou efetividade antimicrobiana do VB contra bactérias isoladas e na destruição de biofilmes. E que sua associação com a própolis pode ser comprometida, o que contribui para que novos estudos e ensaios clínicos promovam o avanço do uso do VB em Periodontia, sendo um potencial contribuinte no fator antimicrobiano para o tratamento e eliminação da doença periodontal.

7 CONCLUSÕES

Após análise dos resultados foi possível concluir que:

a) A própolis verde possui grande quantidade de compostos fenólicos como flavonóides e derivados de ácidos cafeicos. As frações de própolis verde possuem distintas substâncias, se diferenciando, possivelmente, pela presença dos flavonóides.

b) O extrato total de própolis verde e suas frações apresentam atividade antimicrobiana frente às bactérias padronizadas.

c) O Vidro Bioativo mostrou-se efetivo contra as bactérias isoladas testadas, assim como a associação VB/EPV.

d) O Vidro Bioativo promoveu a inibição da atividade metabólica de biofilme periodontopatogênico, o que não ocorreu na associação VB/EPV.

8 REFERÊNCIAS*

Abreu EG, Estrada EC, López AR, Padrón M. Actividad anticaries de una crema dental com propóleos. Rev. Cubana Estomatol 2000; 37 (3).

Alencar SM, Aguiar CL, Paredes-Guzmán, Park YK. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Cienc. Rural 2005; 35 (4).

Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate Bioglass against supra- and subgingival bactéria. Biomaterials 2001; 22: 1683-1687.

Angelo AR, Silva YTS, Castro RD, Almeida RVD, Padilha WWN. Atuação Clínica e Microbiológica da solução de própolis para bochecho em crianças cárie ativas. Arquivos em Odontologia 2007; 43 (03): 60-66.

Ary-Júnior F, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. Cienc. Rural 2006; 36 (1).

Bankova V. Recente trends and important developments in propolis research. Evid Based Complemente Altern Med 2005; 2 (1): 29-32.

Biscarde AO, Andrade LP, Bittencourt S, Ribeiro EDP. Diretrizes para a utilização adjunta da antibioticoterapia sistêmica no tratamento das doenças periodontais. Innov. Implant. J., Biomater. Esthet. (Online) 2010; 5 (2).

*Conforme International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style) – Grupo Vancouver

Blosfeld AM, Schmitt MB, Matte LCG, Cristelli HL, Padilha JF. Avaliação *In Vitro* da ação de diferentes Própolis produzidas no estado de Santa Catarina, sobre microorganismos presentes na placa supra-gengival. In: Livro do XV Congresso Brasileiro de Apicultura; 2004; Natal (RS).

Bonifácio KC, Tanomaru Filho M, Pizzolito AC, Silva LAB, Guerreiro JM, Perassi FT, *et al.* Biofilme na Odontologia. JAO: J Assess Prestação Serv Odont 1999; 3 (14): 34-38.

Bosco AF, Furlaneto FAC, Nagata MJH, Garcia VG. Tratamento periodontal com vidro bioativo associado à RTG: Relato de caso clínico com acompanhamento de 4 anos. RGO 2006; 54 (4): 363-368.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2003. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Brasília-DF, 2004.

Bruschi ML, Panzieri H, Lara EHG. Progressos recentes na pesquisa de própolis em Periodontia. Revista ABO Nac. 2005; 13 (2): 86-91.

Burdock GA. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. Food and Chemical Toxicology 1998; 36: 347-363.

Buriol L, Finger D, Schmidt EM, Dos Santos JMT, Rosa MR, Quináia SP, *et al.* Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. Quím. Nova 2009; 32(2).

Carbonari MJ, Martinelli, Sene FF, König – Jr. , Rogero SO. Obtenção de vidros bioativos utilizados na reparação óssea. Rev Mackenzie de Engenharia e Computação 2011; v. 6-10 – Edição Especial: 78-89.

Carranza FA, Takei HH, Newman MG. Periodontia Clínica. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2004. cap.9; p. 13- 50 .

Chambrone LA. Prevalência da Doença Periodontal no Brasil: UM alerta aos Cirurgiões-Dentistas. Revista Odonto – São Bernardo do Campo 1993; 2 (5): 339 - 343.

Chang R, Veloso-Piló, Morais SAL, Nascimento EA. Análise de uma própolis verde brasileira da *Baccharis dracunculifolia* por CLAE-ICPA-EM e CG-EM. Rev. bras. farmacogn. 2008; 18 (4).

Chiapinotto GA. Etiologia e Prevenção da doença periodontal. In: Pinto G.V. Saúde Bucal Coletiva. 4º ed. São Paulo 2000 Ed. Santos cap.5 p.429-444.

Coelho, MB. Desenvolvimento de metodologia para a produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação em engenharia dos tecidos. [Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

CONAPIS. Própolis, poderoso antibiótico natural tem vários efeitos terapêuticos. [acesso 30 julh 2008]. Disponível em: <http://www.conapis.com.br/propolis.htm>.

Corbi SCT, Spin-Neto R, Marcantonio-JR.E, Marcantonio RAC. Avaliação física e radiográfica de biomateriais usados para regeneração óssea. Rev Odontol UNESP 2010; 39(2): 101-107.

Costa PSC, Oliveira JS. Manual Prático de Criação de abelhas. Viçosa : Ed. Aprenda Fácil; 2005. cap. 9, p. 309-342.

Couto RHN, Couto LA. Apicultura: Manejo e Produtos. Jaboticabal: Ed. FUNEP/ FCAV Unesp; 2002. cap. 5, p. 106 -115.

Cruz ACC, Silva JCZ, Pilatti GL, Santos FA. Utilização de vidros bioativos como substitutos ósseos: Revisão de literatura. Rev de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo 2006; 18(3) 287-95.

Cunha IBS, Meurer Ec, Lemos AB, Eberlin MN. Perfil de Extratos Etanólicos de Própolis Obtidos após diferentes tempos de maceração e análise por GC-MS. In: Livro do XIV Congresso Brasileiro de Apicultura – Conbrapi; 2002; Campo Grande (MS). p. 96.

De-Carli, AD, Zárate-Pereira P, De-Carli G, Zafalon EJ, Zárate CBR , *et al.* Ação da Própolis de *Apis mellifera* Associada ao Fluoreto de Sódio Sobre o Biofilme Dental: Ensaio Clínico Duplo Cego Randomizado. Rev Odontol Bras Central 2010;19(51): 310-313.

Ditterich RG, Romanelli MCMO, Rastelli MC, Portero PP, Santos EB. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de substâncias naturais presentes nos dentifrícios. Odontologia. Clín.-Científ. 2007; 6 (4): 303-307.

Domingues ZR, Cortés ME, Gomes TA, Diniz HF, Freitas CS. Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with β -cyclodextrin. Biomaterials 2004; 25: 327-333.

Dottori RH, Tunchel S, Sendyk WR, Gromatzky, Cosimato P. Controle Químico da Placa Bacteriana em Periodontia. Rev. Odontol. Univ. Santo Amaro 2002; 7 (2): 4-6.

Duarte CA. Tratamento cirúrgico e não cirúrgico. Cirurgia periodontal pré-protética e estética. 2ª Ed. São Paulo: Editora Santos; 2003.cap. 1; p.1-19.

Eberhard J, Reimers-N, Dommisch-H, Hacker-J, Freitag S *et al.* The effect of the topical administration of bioactive glass on inflammatory markers of human experimental gingivitis. *Biomaterials* 2005; 26 (13): 1545-1551.

Faria Jr. LRR, Bendini JN, Barreto LMRC. Perfil Físico-Químico dos Extratos Etanólicos de Própolis analisados no centro de estudos apícolas da Universidade de Taubaté. In: Livro do XIV Congresso Brasileiro de Apicultura – Conbrapi; 2002; Campo Grande (MS). p. 97.

Galvão J, Galvão VG. O Uso da Própolis em Periodontia. UFES Rev. Odontol. 2003; 5 (1): 54-56.

Gatti AM, Yamamuro T, Hench LL, Andersson OH. *In vivo*- reactions in some bioactive glasses and ceramics granules. Cell and Materials 1993; 3 (3): 283-291.

Gebara ECE, Lima LA, Mayer MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. Braz. J. Microbiol. 2002. 33 (4): 365-9.

Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes-Júnior A, Rodrigues P, Funari SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis 2006. 12 (2).

Gupta R & Kumar A. Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology. *Biomed Mater.* 2008; 3 (3): 034005.

Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). Journal of the Royal Society of Medicine 1990; (83).

Johnson KS, Eischen FA, Giannasi DE. Chemical composition of North American bee propolis and biological activity towards larvae of greater wax moth (*lepidoptera: pyralidae*). J Chem Ecol, 1994; 20 (7): 1783-91.

Juiz PJL, Alves RJC, Barros TF. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. Rev. bras. farmacogn. 2010; 20 (1).

Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solution able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic. J Bio Materials Research. 1990; 24 (6): 721-734.

Konish S, Sawaya ACHF, Custódio AR, Cunha IBS, Shimizu MT, Araujo CEP. Análise da influência de Agentes Solubilizantes na Atividade Antimicrobiana de Extratos de Própolis. Rev. Mensagem Doce 2004; (75): 9-16.

Koo H, Cury JA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Ikegaki M, Park YK. Effects of a Mouthrinse Containing Selected Propolis on 3- Day Dental Plaque Accumulation and Polysaccharide Formation. Caries Res 2002a; (36): 445-448.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, ParkYK, Bowem WF. Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus Mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity. Antimicrob Agents Chemother 2002b; 46(5): 1302-1309.

Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowem WH, Cury JA *et al.* Apigenin and tt-Farnesol with Fluoride on *S. mutans* Biofilm and Dental Caries. J Dent Res 2005; 84 (11): 1016-1020.

Lee S, Zimmer J, Fechner J, Uzunian GE, Song L. Bioactive Glasses: A Potential New Class of Active Ingredients for Personal Care Products. SÖFW-Journal 2003; 129: 1-7.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2005.

Longhini R, Raska SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Rev. bras. farmacogn. 2007; 17(3).

Lorenzo JL. Microbiologia para o estudante de odontologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. cap. 9; p.127-150.

Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim-Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Rev. bras. farmacogn. 2008; 18 (3).

Manara LRB, Gromatzky A, Conde MC, Bretz WA. Utilização da Própolis na Odontologia. Rev. FOB 1999; 7 (3/4): p.15-20.

Marcucci MC. Própolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidol 1995; 26(2): 83-99.

Marcucci MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Quim Nova; 1996; 529-35.

Marcucci MC, Custódio AR, Pereira RMS. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. Rev Mensagem Doce [periódico on line] 2007; (90). [acesso em 01 julh 07]. Disponível em <http://www.mensagemdoce.com.br>.

Marinho BVS, Araújo ACS. O uso de enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. Int J of Dentistry 2007; 6(4): 124-131.

Marques JG, Galvão VG. O uso da própolis em Periodontia. UFES Rer. Odontologia 2003; 5 (1): 54-56.

Martins EOB, Janjacomo LA, Milanezi LA, Martins F. Regeneração tecidual guiada, uma solução atual para tratamento de lesões de furca grau II. FOL- Faculdade de Odontologia de Lins / Unimep 2001; 13 (1): 17-25.

Moreira ACA, Pereira MHQ, Porto MR, Rocha LAP, Nascimento BC, Andrade PM. Avaliação "in vitro" da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. R. Ci. méd. biol. 2009; 8 (2): 153-161.

Moreira ACA, Santos TAM, Carneiro MC, Porto MR. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. R. Ci. méd. biol., Salvador 2008; 7(3): 266-272 .

Munukka E, Leppäranta O, Korkeamäki M, Vaahtio M, Peltola T *et al.* Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *J of Mat Science: Materials in Medicine* 2008; 19(1): 27-32.

Nasser-Neto B, Deliberador TM, Storrer CLM, Sousa AM, Campos EA, *et al.* O uso de vidro bioativo na terapia regenerativa: revisão de literatura. *RSBO*. 2008; 5 (2): 82-89.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 16th informational supplement. NCCLS document M100-S15. Wayne, PA: NCCLS, 2006.

Nercolini DJB. Doença Periodontal. *Rev. Racine* 2004; 14 (78): 14-20.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 2004. cap. 4, p. 133-155.

Oppermann RV, Nodari D. O efeito da aplicação de solução alcoólica de própolis sobre a formação da placa bacteriana. *Stomatos – Rev. de Odontologia* 1996; (2): 16-23.

Orlando-Júnior A, Ferraz CL, Tomé MS, Tavares SPR, Baldo VMO. Controle da placa bacteriana ou biofilme dental como determinante do sucesso em terapias periodontais cirúrgicas ou não cirúrgicas. *Revista Ceciliana* 2010; 2(2): 29-31.

Panzeri H, Pedrazzi V, Ogasawara MS, Ito IY, Lara EHG, Gabarra FR. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliação física, microbiológica e clínica. *Rev. ABO Nac.* 1999; 7 (1): 26-30.

Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL. Comparison of the Flavonoid Aglycone Contents of *Apis mellifera* Propolis From Various Regions of Brazil. *Arq Biol Technol* 1997; 40 (1): 97-106.

Park YK, Ikegaki M, Abreu JAS, Alcici NMF. Estudo das preparações dos extratos de própolis e suas aplicações. Ciênc. Tecnol. Aliment. 1998a; 18 (3).

Park YK, Ikegaki M, Koo MH, Cury JÁ, Rosalen PL. Andamento das Pesquisas sobre Própolis na Unicamp. Rev. Mensagem Doce 1998b; (47): 6-8.

Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Effects of Propolis on *Streptococcus Mutans*, *Actinomyces Naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. Revista de Microbiologia 1998c; (29): 143-148.

Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. Classificação das Propólis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Rev. Mensagem doce [periódico on line] 2000a; (58). Disponível em [http:// www.mensagemdoce.com.br](http://www.mensagemdoce.com.br). [2011 Mar 21].

Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Wang HK, Bastow K, Cosentino M, *et al.* Determinação das Atividades Citotóxicas e Anti-HIV dos Extratos Etanólicos de Própolis Coletadas em Diferentes Regiões do Brasil. Rev. Mensagem Doce [periódico on line] 2000b; (56). Disponível em [http:// www.mensagemdoce.com.br](http://www.mensagemdoce.com.br). [2006 Mar 21].

Pedron IG, Tortamano IP, Borsatti MA, Adde CA, Rocha RG. Antimicrobianos locais coadjuvantes ao tratamento periodontal. Rev. Odonto 2007; 15 (29): 67-72.

Pitts B, Hamilton MA, Zilver N, Stewart PS. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbiol Meth 2003; (54): 269-276.

Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino Neto FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Quim Nova 2002; 25(2): 321-6.

Rezende GPSR, Pimenta FC, Costa LRRS. Antimicrobial activity of two brazilian commercial propolis extracts. Bras J Oral Sci 2006; 5 (16): 967-970.

Ribeiro FV, Casarin RCV, Nociti- Júnior FH, Sallum EA, Sallum AW, Casati MZ. Tomada de decisão em defeitos de furca III: tratamento ressectivo? Extração? Implantes? RGO 2009; 57 (2): 223-227.

Ribeiro JN, Oliveira TT, Nagem TJ, Flores AV. Ausência de toxicidade da própolis. Mensagem Doce [periódico on line] 2004; (77). Disponível em <http://www.mensagemdoce.com.br>. [2006 março 22].

Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Evid Based Complement Altern Med 2005; 2 (1): 33-38.

Salomão K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC, *et al.* Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. Oxford Journal [periódico on line] 2007; Disponível em <http://ecam.oxfordjournals.org> [2007 agosto 22].

Santos VR. Própolis: um antibiótico natural alternativo em Odontologia? (Revisão de Literatura). Revista CRO-MG 1999; 5 (3): 192-195.

Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. Microbiological Research 2006; (161): 327-333.

Silva EB, Silva FB, Franco SL, Ramalho LTO, Peruchi CMS. Efeito da Ação da Própolis na Lâmina Própria da Mucosa Bucal de Ratos. Revista Robrac 2000; 9 (28): 4-8.

Silva ECA. Preparo do extrato de própolis legal. Rev. Mensagem Doce 2003; (70): 5-9.

Silva FIP, Alves RA. A eficácia de três enxaguatórios bucais sobre a placa bacteriana: estudo comparativo. Rev. ABO Nac. 2000; 8 (2): 307-311.

Silva CHPM. Características da microbiota subgengival em pacientes com periodontite. RBAC 2006a; 38 (3): 201-206.

Silva RA, Rodrigues AE, Ribeiro MCM, Custódio AR, Andrade NED, Pereira WE. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural* 2006b; 36(6) : 1842-1848.

Sivakumar R. On the relevance and requirements of biomaterials. *Bull. Mater Sci.* 1999; 22 (3):647-655.

Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. *Practical HPLC method development*. Academic Press. 2ª Ed. New York: 1997.

Souza EA, Inoue, HT, Gomes, SMA, Funari SRC, Orsi RO. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. *Arch. Zootec.* 2010; 59 (228): 571-576.

Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Rev. bras. farmacogn.* 2008; 18 (1).

Sperança PA, Santiago LM, Carvalho TBT, Neves WKF. Verificação da atividade antimicrobiana de soluções à base de própolis, sobre microbiota oriunda de bolsas periodontais – Estudo *in vitro*. *R. Periodontia* 2007 ; 17 (04): 54-59.

Steinberg D, Kaine G, Gedalia I. Antibacterial Effectes of Propolis and Honey on Oral Bacteria. *American Journal of Dentistry* 1996; 9 (6): 236-239.

Stoor P, Söderling E, Salonen JI. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontologica Scandinavica* 1998; 56(3): 161-165.

Swerts MSO, Costa AMDD, Fiorini JE. Efeito da solução associada de clorexidina e própolis na inibição da aderência de *Streptococcus ssp.* RPE 2005; 2 (4): 10-16.

Swerts MSO, Freitas e Silva DS, Maldonado DV, Totti da Costa JM, Medeiros UV. Atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias bucais. JBE 2002; 3 (10): 256-261.

Swerts MSO, Medeiros UV. Novas Tendências de Prevenção e Tratamento da doença Periodontal Frente aos seus Fatores Modificadores. JBC 2003; 7(39): 234-241.

Tai BJ, Bian Z, Jiang H, Greenspan DC, Zhong J. Anti-gingivitis effect of a dentifrice containing bioactive glass (NovaMins) particulate. J Clin Periodontol 2006; 33: 86–91.

Tengerdy RP, Nagy JG, Martin B. Quantitative Measurement of Bacterial Growth by the Reduction of Tetrazolium Salts. American Society for Microbiology 1967; 15 (4): 954-955.

Thomas MV, Puleo DA, AL-Sabbagh M. Bioactive Glass Three Decades On. J of Long Term Effects of Med Imp 2005; 15(6): 585-597.

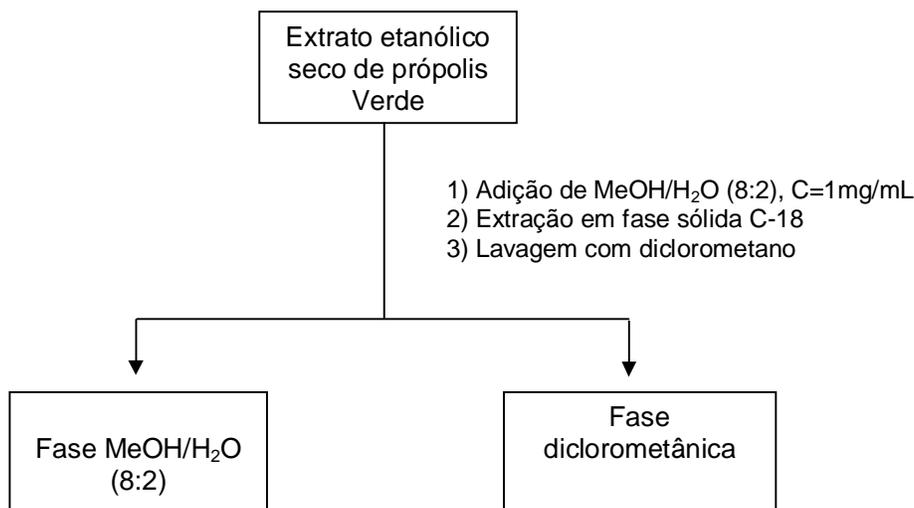
Vilhaça JH, Novaes-Jr. AB, Souza SLS, Taba-Jr., Molina GO, *et al.* Bioactive Glass Efficacy in the Periodontal Healing of Intrabony Defects in Monkeys. Braz. Dent. 2005; 16 (1).

Waltimo T, Brunner TJ, Vollenweider M, Stark WJ, Zehnder M. Antimicrobial Effect of Nanometric Bioactive Glass 45S5 2007; J Dent Res 2007; 86 (8): 754-757

Zárate PP. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%, fluoreto de sódio a 0,2% e própolis 05% acrescida de fluoreto de sódio a 0,05% sobre níveis salivares de *Estreptococcus* do grupo mutans em paciente cárie-ativos. (Tese de Doutorado); São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

Zárate PP. 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.

ANEXO 1 – Sequência da CLAE.



Esquema da obtenção da fase hidrometanólica de própolis Verde para análise em CLAE.

A fase hidrometanólica [MeOH/H₂O(8:2)] foi submetida a análise por CLAE. A primeira etapa consistiu em obter um gradiente exploratório (Snyder, 1997)¹ utilizando as seguintes condições:

- ❖ Coluna: Phenomenex Luna C-18, 5 μ , 4.6X250mm.
- ❖ Eluente: Gradiente acetonitrila/água 5 a 100% de acetonitrila em 20 minutos, mais 10 minutos com 100% de acetonitrila
- ❖ Volume injetado: 10 μ L
- ❖ Fluxo: 1mL/min

Esta primeira etapa tem por objetivo dimensionar a complexidade do extrato analisado e assim permitir o ajuste das condições analíticas para uma melhor resolução do cromatograma. Após os ajustes dos parâmetros cromatográficos a condição que favorece a melhor resolução para o extrato de própolis verde foi definida como:

- ❖ Coluna: Phenomenex Luna C-18, 5 μ , 4.6X250mm.
- ❖ Eluente: Gradiente acetonitrila/água

% Acetonitrila	30	60	70
Tempo(min)	0	25	35

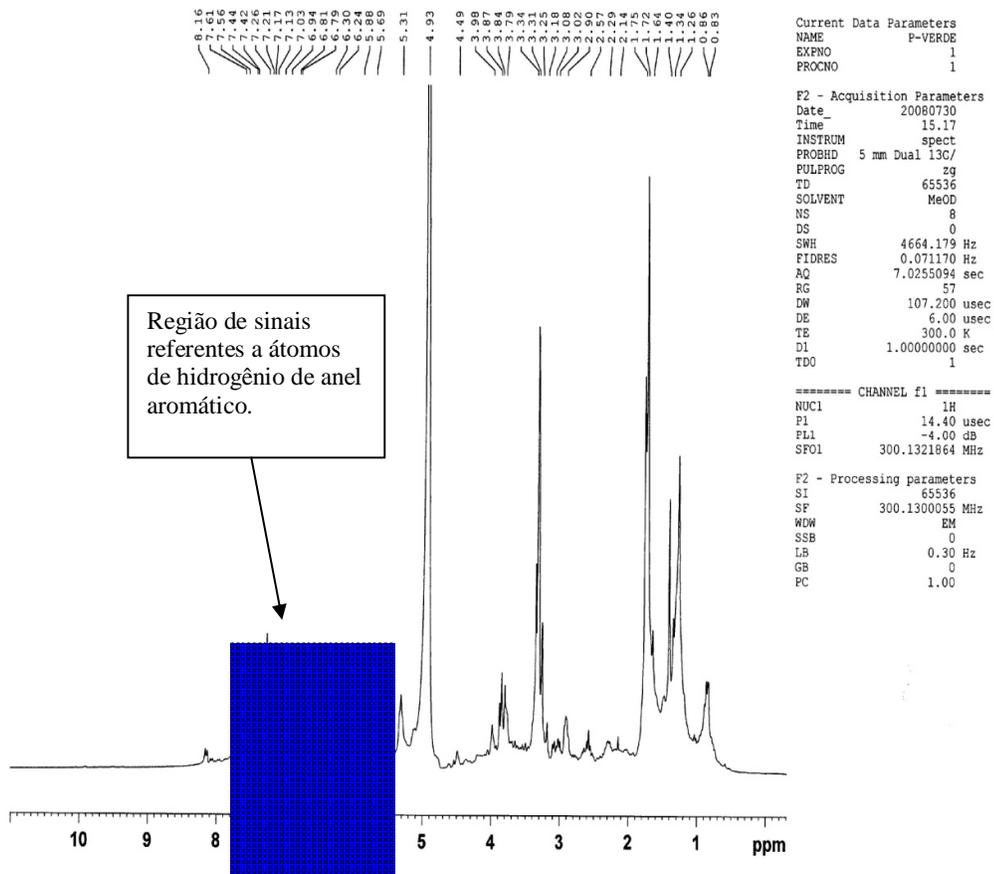
- ❖ Volume injetado: 10 μ L Fluxo: 1mL/mi

¹ Snyder, L.R.; Kirkland, J. J. and Glajch, J. L. Practical HPLC method development, 2nd. Edition, Academic Press, New York, 1997.

ANEXO 2 - Materiais de consumo para cromatografia líquida e espectro da RMN da própolis.

Item	Especificação
1	Hidróxido de potássio (Vetec)
2	Metanol HPLC (Vetec)
3	Acetonitrila HPLC (Vetec)
4	Acetato de etila HPLC (Vetec)
5	Acetona PA (Vetec)
6	Metanol deuterado (para RMN)
7	Etanol PA (Vetec)
8	Etanol 96 GL
9	Tubos para RMN
10	Dessecador
11	Erlenmeyer com tampa
12	Balão volumétrico
13	Béquer
14	Membrana para filtração-CLAE 0,25um
15	Membrana para filtração-CLAE 0,45um
16	Pipeta volumétrica
17	Filtro de vidro sinterizado
18	Seringa de vidro para injeção de Amostra-CLAE

ANEXO 3 - Espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico da própolis verde (300MHz, CD_3OD).



ANEXO 4 – Etapas da síntese do vidro bioativo segundo Coelho (2003), através da técnica SOL-GEL no sistema Si:Ca:P.

- 1) Mistura dos precursores
- 2) Hidrólise
- 3) Gelatização
- 4) Envelhecimento
- 5) Secagem e estabilização

Entre cada adição de compostos, a mistura foi homogeneizada por meio de um agitador magnético (marca FANEM ®) por uma hora. As amostras foram preparadas no sistema 60SiO₂:36CaO:4P₂O₅ como descrito a seguir:

- I) Em um Becker foram adicionados sequencialmente: 103,5 mL de água deionizada, 90 mL de Etanol e 5,76 mL de Ácido nítrico 2M.
- II) A seguir foram adicionados 29,7 mL de Tetraetilortosilicato, 3,03 mL de Tetraetilfosfato, e 21,408 g de Nitrato de Cálcio.
- III) Hidróxido de Amônia foi adicionado em gotas sob agitação até início da gelificação.
- IV) Após gelificação as amostras foram secas a 130°C/24h, tratadas a 600°C/4h sob aeração para eliminação de resíduos da reação, compostos orgânicos, hidroxilas e estabilização da estrutura vítrea. As seguintes composições relativas foram alcançadas:
SiO₂= 60% em mol
CaO= 36% em mol
P₂O₅= 4% em mol
- V) A desaglomeração de partículas primárias em partículas menores de VB foi obtida por trituração e filtração em peneiras de aço inox com trama 12 mesh que permite a passagem de partículas menores de 120µm.

O produto final foi um pó branco, fino e inodoro. Acondicionado em ambiente seco por ser muito higroscópico.

ANEXO 5 – Protocolo para preparação de Fluido Simulado Corpóreo (SBF), segundo Kokubo *et al.*, 1990:

a) Lavar bem a parede de uma garrafa de polietileno e de um bastão de vidro de 1N HCl, detergente neutro e água destilada deionizada. Secar bem;

b) Colocar 500 ml de água destilada deionizada da garrafa de polietileno e fechá-la com tampa de vidro;

c) Com a agitação da água em um agitador magnético, dissolver totalmente os reagentes, um a um na ordem dada na tabela abaixo:

Tabela 2 – Reagente para a preparação de SBF (pH 7,4, 1L)

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	7.996 g
2	NaHCO ₃	0.350 g
3	KCl	0.224 g
4	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0.228 g
5	MgCl ₂ . 6H ₂ O	0.305 g
6	1M – HCl	40 ml
7	CaCl ₂	0.278 g
8	Na ₂ SO ₄	0.071 g
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6.057 g

d) Ajustar a temperatura da solução a 36,5°C em banho Maria, e ajustar o pH da solução em 7.4, agitando-a e titulando com uma solução de HCl 1N gota a gota;

e) Transferir a solução da garrafa de polietileno para um frasco volumétrico de vidro. Adicione água usada para lavar a garrafa de polietileno ao frasco de solução;

f) Ajustar o volume total da solução a um litro pela adição de água destilada deionizada, e agite o frasco a 20°C;

g) Transferir a solução do frasco à garrafa de polietileno e estocar a garrafa no refrigerador a 5-10°C (se houver precipitado, não use essa solução nem seu contêiner novamente).

ANEXO 6 – Meio de Cultura Caldo BHI pré - reduzido.

- 0,5 g de extrato de levedura
- 100 ml de água destilada
- 1,6 ml de rezazurina (indicador de meio reduzido)
- 0,05 g de cloridrato de cisteína (reduzidor químico)
- 1ml de solução vitamina K e Hemina (10 mg vit K, 50 mg hemina, 10ml álcool etílico) .
- 3,7g de BHI
- pH 7,4

O meio é fervido para redução do O₂ e colocado CO₂. Os tubos são lacrados e autoclavados.
