

SIMONE DUARTE
Cirurgiã Dentista

**“ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO DA PRÓPOLIS DA BAHIA
(MATA ATLÂNTICA) SOBRE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO
MUTANS E NA ATIVIDADE DAS GLUCOSILTRANSFERASES.”**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do grau
de MESTRE em Odontologia, Área de
Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Piracicaba, SP
2002

2002.2.4544

SIMONE DUARTE
Cirurgiã Dentista

**“ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO DA PRÓPOLIS DA BAHIA
(MATA ATLÂNTICA) SOBRE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO
MUTANS E NA ATIVIDADE DAS GLUCOSILTRANSFERASES.”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do grau de MESTRE em Odontologia, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Co-orientador: Prof. Dr. Hyun Koo

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Prof. Dr. Masaharu Ikegaki
Profa. Dra. Cinthya P. M. Tabchoury

Piracicaba, SP
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SALA DE CIRCULANTE

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CPG-036/83
CPG-30/04/2002
Assinatura do Orientador

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
D85e
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49344
PROC 16.837/02
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 04/06/02
Nº CPD _____

CM00168281-2

BIB ID 242082

Ficha Catalográfica

D85e Duarte, Simone.
Estudo *in vitro* do efeito da própolis da Bahia (mata atlântica) sobre estreptococos do grupo mutans e na atividade das glucosiltransferases. / Simone Duarte. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xx, 104p. : il.

Orientadores : Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Prof. Dr. Hyun Koo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Agentes antibacterianos. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Produtos naturais. I. Rosalen, Pedro Luiz. II. Koo, Hyun. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 15 de Março de 2002, considerou a candidata SIMONE DUARTE aprovada.

1. Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN

Pedro Luiz Rosalen

2. Prof. Dr. MASA HARU IKEGAKI

Masaharu Ikegaki

3. Profa. Dra. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY

Cynthia Machado Tabchoury

A Deus,

*pela vida
e por sempre colocar em meu caminho pessoas e
desafios tão encantadores.*

Ao meu pai, José Aparecido Duarte,

*pela pessoa maravilhosa que foi,
exemplo de bom humor e alegria,
e pela constante presença em minha vida.*

À minha mãe, Maria Diocéia Marconi Duarte,

*pelo amor incondicional
e pelo companheirismo, ajuda e paciência para que eu
pudesse suportar os momentos difíceis.*

*À minha irmã Luciane Ap. Duarte Sáttolo e
aos meus irmãos José Alexandre Duarte e Marcelo Duarte,
pela paciência, colaboração e compreensão*

com muito carinho,

Dedico.

Agradecimento especial

Ao meu orientador Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**,

Pela confiança e credibilidade,
pela contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional
e por ter despertado em mim o amor e o prazer pela ciência.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Hyun Koo (Michel)**,

pesquisador exemplar, que sempre me apoiou e incentivou
e de quem eu sinto muito orgulho.

Obrigada.

Meus sinceros agradecimentos,

Ao Prof. Dr. **Jaime A. Cury**, pesquisador extraordinário, pela ajuda e pelo exemplo.

Ao Prof. Dr. **Masaharu Ikegaki**, pela contribuição fundamental durante a execução deste trabalho.

Ao apicultor **José Elpídio Cerqueira**, pelo fornecimento das amostras de própolis utilizadas neste experimento.

Ao Prof. Dr. **Reginaldo Bruno Gonçalves**, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP-UNICAMP, que gentilmente cedeu os microrganismos isolados recentemente, utilizados neste projeto.

Ao Prof. Dr. **William H. Bowen**, do Centro de Biologia Oral da Universidade de Rochester, que gentilmente cedeu as enzimas purificadas utilizadas neste projeto.

Ao **CPQBA** (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas), pelas análises químicas da própolis e suas frações.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa de estudos concedida (processo #99/11994-8).

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro concedido (processo #466879/00-8).

À profa. Dra. **Altair Antoninha Del Bel Cury**, coordenadora dos cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aos amigos, companheiros de pesquisa, **Mitsue, Regiane, Ramiro Mirella** e **Adriana**, pela ajuda na realização da fase experimental deste trabalho.

Ao meu cunhado **Heraldo**, aos meus sobrinhos **Bruno, Henrique** e **Diogo** e às minhas cunhadas **Allison** e **Cláudia**.

Aos amigos, professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, **Profa. Maria Cristina, Prof. Francisco, Prof. Ranali, Prof. Eduardo e Prof. Thales**, e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP.

Aos professores **Jaime Aparecido Cury, Celso Paulino da Costa e Reginaldo Bruno Gonçalves**, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para a realização e finalização deste projeto.

Aos amigos, funcionários da Farmacologia, **Elisa, Eliane, José Carlos e Miriam**, pelo incentivo e inestimável ajuda.

Às secretárias da Pós-Graduação **Érica e Sônia** pelo auxílio nas fases administrativas.

Aos amigos, funcionários da biblioteca, **Dorinha, Lourdes, Cidinha, Marilene, Janaína, Liliane e Marco** (agregado), pela paciência e alegria.

À bibliotecária **Heloísa Maria Ceccotti**, pela colaboração.

Aos grandes amigos e companheiros **Juliana, Flávia, Ana Paula, Karla, Rogério, Rodrigo, Iriana, Marcelle, Vivi e Lidiany**, por tornarem a minha vida muito mais divertida.

Aos amigos da Farmacologia **Giovana, Patrícia, Vanessa, Karina, Fábio, Marcelo, Roberta e Aline** e aos amigos da Cariologia e da Fisiologia **Andréia, Adriana, André, Celso, Fábio Mialhe, Fábio Koslóvsk, Ynara, Luciane, Nilza, Roberta, Rosane, Vanessa, Dany, Léo, Alexandre e Franco**.

Ao professor **Jorge Valério**, pela colaboração e amizade.

A **Marilena, Esther e Raphael**, pela participação indireta e pela amizade.

A todos os funcionários da FOP (motoristas, funcionários da limpeza, pessoal da portaria, telefonistas, CPD, CRA, cantina, etc) pela colaboração e compreensão.

A todos os apicultores do Brasil, verdadeiros trabalhadores nesta arte de criar e cuidar de abelhas.

À natureza por ser tão simples e completa.

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos, como algo separado do resto do universo – numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é um tipo de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto apenas pelas pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá atingir completamente este objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa libertação e o alicerce de nossa segurança interior”.

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMO | 3 |
| ABSTRACT | 5 |
| 1. INTRODUÇÃO | 7 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1. Placa e Cárie Dental | 17 |
| 2.2. Própolis | 23 |
| 2.2.1. Composição Química da Própolis | 23 |
| 2.2.2. Propriedades Farmacológicas e Toxicidade da Própolis | 30 |
| 3. OBJETIVOS | 37 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 4.1. Obtenção e fracionamento da própolis | 43 |
| 4.2. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> | 47 |
| 4.2.1. Microrganismos | 47 |
| 4.2.2. Preparo da suspensão bacteriana | 48 |
| 4.2.3. Teste de difusão em ágar (halo de inibição) | 49 |
| 4.2.4. Concentração inibitória mínima (CIM) | 51 |
| 4.2.5. Concentração bactericida mínima (CBM) | 52 |
| 4.3. Inibição da aderência celular em superfície de vidro | 53 |
| 4.4. Atividade das Gtfs B, C, D e <i>S. sanguis</i> purificadas | 55 |
| 4.4.1. Obtenção e purificação das Gtfs | 55 |
| 4.4.2. Atividade das Gtfs em solução | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.3. Atividade das Gtfs aderidas à superfície de hidroxiapatita | 57 |
| 4.5. Análise estatística | 58 |
| 5. RESULTADOS | 61 |
| 5.1. Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> | 63 |
| 5.1.1. Teste de difusão em ágar (halo de inibição) | 63 |
| 5.1.2. Concentração inibitória mínima (CIM) | 65 |
| 5.1.3. Concentração bactericida mínima (CBM) | 67 |
| 5.2. Inibição da aderência celular em superfície de vidro | 68 |
| 5.3. Atividade das Gtfs B, C, D e <i>S. sanguis</i> purificadas | 68 |
| 5.3.1. Atividade das Gtfs em solução e aderidas à superfície de hidroxiapatita | 68 |
| 6. DISCUSSÃO | 81 |
| 7. CONCLUSÕES | 89 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CCDAE-FR | Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência - Fase Reversa |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CLAE-FR | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Fase Reversa |
| CG-EM | Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa |
| DL ₅₀ | Dose Letal - 50 |
| EEP | Extrato Etanólico da Própolis |
| <i>et al.</i> | <i>et alli</i> (e colaboradores) |
| GTF | Glucosiltransferase |
| ufc/mL | Unidades formadoras de colônia por mililitro |

RESUMO

Própolis é um produto natural constituído principalmente de compostos fenólicos, como flavonóides e derivados do ácido cinâmico. Entretanto, própolis tipo 6, proveniente da região de mata atlântica da Bahia, nordeste brasileiro, apresenta uma composição química diferente, contendo basicamente compostos apolares, sendo que os flavonóides não foram detectados. Este estudo avaliou o efeito desta própolis e de suas frações sobre o crescimento e a aderência de estreptococos do grupo mutans e na atividade das glucosiltransferases (GTFs). O extrato etanólico da própolis (EEP) e 4 frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol) foram obtidos através de métodos de fracionamento químico. O controle negativo foi etanol 80% (v/v). Para os testes antibacterianos, difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM), e concentração bactericida mínima (CBM) contra *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715 e dois isolados clínicos recentes para cada espécie foram determinados. A aderência dos microrganismos à superfície do vidro também foi medida espectrofotometricamente a 550 nm. O efeito do EEP e suas frações foi analisado na atividade de GTFs em solução e aderidas à superfície de hidroxiapatita. Os valores de CIM foram 50-100 µg/mL para *S. mutans* Ingbritt 1600, e 25-100 µg/mL para *S. sobrinus* 6715. A aderência celular foi também inibida em concentrações menores que 25-50 µg/mL. Entre as frações, hexano (CIM 12,5-50 µg/mL) e clorofórmio (CIM 25-100 µg/mL) foram as mais ativas. A CBM para o EEP e as frações (hexano e clorofórmio) foi 4-8 vezes maior que a CIM. A atividade das Gtfs em solução foi inibida pelo EEP (88-96%) e pelas frações hexano e clorofórmio (60-90% de inibição à 100 µg/mL). Concluindo, esta nova variedade de própolis mostrou notáveis efeitos inibitórios tanto no crescimento bacteriano, quanto na aderência celular e atividade de GTFs, sendo esta atividade relacionada com compostos apolares.

ABSTRACT

Propolis is a natural beehive product, and its main constituents are polyphenolic compounds, such as flavonoids and cinnamic acid derivatives. However, propolis type 6, from Bahia (Atlantic forest, Northeastern, Brazil) presents an unusual chemical composition containing basically non-polar compounds; flavonoids were not detected in this sample. This study evaluated the effects of this propolis and its fractions on growth and adherence of mutans streptococci and on the activity of glucosyltransferases (GTFs). Ethanolic extract of propolis (EEP) and 4 fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate, and ethanol) were obtained according to standard methods of chemical fractionation. Negative control was 80% ethanol (v/v). For the antibacterial assays, agar diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimal bactericidal concentration (MBC) against *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715 and two clinical isolates of each species were determined. Cell adherence of the microorganisms to a glass surface was measured spectrophotometrically at 550 nm. We also explored the effect of propolis and its fractions on the activity of purified GTFs in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. The MIC values were 50-100 µg/mL for *S. mutans* Ingbritt 1600, and 25-100 µg/mL for *S. sobrinus* 6715. The cell adherence was also inhibited at concentrations as low as 25-50 µg/mL. Among the fractions, hexane (MIC 12.5-50 µg/mL) and chloroform (MIC 25-100 µg/mL) were the most active. MBC for EEP and fractions (hexane and chloroform) was 4-8 times higher than MIC. The activity of GTFs in solution was remarkably inhibited by EEP (88-96%), and by hexane and chloroform fractions (60-90% inhibition at 100 µg/mL). In conclusion, the new variety of propolis showed remarkable inhibitory effects on bacterial growth, cell adherence and GTFs activity. The biological activities of propolis are related to the non-polar compounds.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas da cavidade bucal mais comuns nos seres humanos são cárie dental e doença periodontal (LOESCHE, 1986), sendo que a placa dental tem sido extensivamente estudada por sua relação com estas infecções (GIBBONS & VAN HOUTE, 1975). Placa dental é um biofilme bacteriano encontrado naturalmente na superfície dos dentes, apresentando composições bacteriana e bioquímica que podem variar em dependência de fatores intrínsecos e extrínsecos (MARSH, 1992).

A formação deste biofilme inicia-se com a película adquirida, que é uma fina camada aderida à superfície dental, constituída principalmente por componentes salivares, além de produtos bacterianos e constituintes citoplasmáticos (GIBBONS & VAN HOUTE, 1975). Minutos após sua formação, bactérias interagem com a película através de uma série de mecanismos específicos (GIBBONS, 1984; GIBBONS, 1996; JENKINSON & LAMONT, 1997) e na seqüência, outras bactérias da mesma espécie e de espécies diferentes se aderem tanto à película adquirida quanto às bactérias já aderidas (KOLENBRANDER, 1988).

A cavidade bucal apresenta uma microbiota natural com composição característica que na maioria das vezes coexiste de modo

harmônico e pacífico com o hospedeiro, mantendo a integridade dos tecidos bucais (BURNE, 1995). Entretanto, alguns fatores podem causar um desequilíbrio desta comunidade, de modo a favorecer o crescimento e o estabelecimento de bactérias odontopatogênicas, como os estreptococos do grupo mutans. Um dos principais fatores deste desequilíbrio é a dieta rica e freqüente em sacarose. Esta dieta promove um aumento da proporção de estreptococos do grupo mutans, uma vez que estes microrganismos apresentam algumas vantagens ecológicas quando da presença deste açúcar no meio bucal, permitindo a sua aderência, colonização e posterior acúmulo na superfície do esmalte dental (HAMADA & SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

Os estreptococos do grupo mutans, além de serem acidúricos e acidogênicos, não só fermentam a sacarose como, a partir desta, sintetizam glucanos através das enzimas glucosiltransferases - GTFs (GIBBONS & VAN HOUTE, 1975; HAMADA & SLADE, 1980). Atualmente, três GTFs distintas, secretadas pelo *Streptococcus mutans*, estão bem caracterizadas tanto bioquimicamente como ao nível molecular: GTFB, GTFC e GTFD (LOESCHE, 1986; HANADA & KURAMITSU, 1989). Recentemente foi identificada e isolada, a partir do *Streptococcus sanguinis* 804 (NCTC 10904), uma quarta GTF, GTFs. Os glucanos, principalmente os insolúveis em água, têm sido considerados como os principais fatores de aderência e acúmulo de

estreptococos cariogênicos sobre a superfície dental (HAMADA & SLADE, 1980; ROLLA *et al.*, 1983; TANZER *et al.*, 1985; SCHILLING & BOWEN, 1992). Em acréscimo, tem sido demonstrado que estes glucanos aumentam a porosidade (DIBDIN & SHELLIS, 1988; VAN HOUTE, 1994), bem como causam mudanças na composição inorgânica da matriz da placa (CURY *et al.*, 1997), tornando-a ainda mais cariogênica. Assim, estreptococos do grupo mutans e glucanos são considerados fatores críticos no desenvolvimento da placa dental cariogênica.

Deste modo, estratégias têm sido estudadas no sentido de prevenir a cárie dental e a doença periodontal, seja inibindo o crescimento dos estreptococos do grupo mutans na cavidade bucal ou inibindo a aderência destas bactérias à superfície dos dentes através da inibição da atividade das GTFs, principalmente aquelas responsáveis pela síntese de glucanos insolúveis (GTFB e GTFC), impedindo assim a formação da placa dental. Um agente que aliasse eficientemente propriedades antimicrobianas com inibição das GTFs seria extremamente desejável para a prevenção destas doenças bucais.

Nas últimas décadas têm se observado um crescente interesse por medicinas alternativas e terapias naturais, especialmente no uso de substâncias com propriedades antimicrobianas, tendo os produtos apícolas

encontrado grande aceitação (PARK *et al.*, 1997). Dentre estes produtos, a própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades farmacológicas tais como atividade antimicrobiana (BONHEVI *et al.*, 1994; GRANGE & DAVEY, 1990; IKENO *et al.*, 1991; STEINBERG *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1998), antiinflamatória, cicatrizante, anestésica (GHISALBERTI, 1979), anticariogênica (IKENO *et al.*, 1991; PARK *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 1999; KOO *et al.*, 2000a; KOO *et al.*, 2000b; KOO *et al.*, 2000c), antitumoral (SCHELLER *et al.*, 1977; FRENKEL *et al.*, 1993; RAO *et al.*, 1993), citotóxica (GRUNDBERGER *et al.*, 1988; MATSUNO, 1995; MATSUNO *et al.*, 1997a; MATSUNO *et al.*, 1997b; BANSKOTA *et al.*, 1998; BANSKOTA *et al.*, 2000), antiviral (DEBIAGGI *et al.*, 1990; SERKEDJIEVA *et al.*, 1992; AMOROS *et al.*, 1992a; AMOROS *et al.*, 1992b; AMOROS *et al.*, 1994; HARISH *et al.*, 1997; KUJUMGIEV *et al.*, 1999; VYNOGRAD *et al.*, 2000), assim como pela inibição das GTFs (PARK *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 2000a).

Própolis é o nome genérico dado para uma resina de coloração e consistência variada, coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes da planta, como broto, botões florais e também dos exudatos resinosos, sendo transportadas para dentro das colméias e modificadas pelas abelhas através da adição de secreções próprias (GHISALBERTI, 1979).

A composição química da própolis é complexa e pode variar de acordo com a biodiversidade da região em que esta é coletada (KÖNIG, 1985; GREENAWAY *et al.*, 1990; GREENAWAY *et al.*, 1991; GARCIA-VIGUEIRA *et al.*, 1992; BANKOVA *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1997; BANKOVA *et al.*, 1999, KUJUMGIEV *et al.*, 1999; KOO *et al.* 1999), com a variedade da abelha rainha (KOO & PARK, 1997) e ainda, com a variação sazonal (BANKOVA *et al.*, 1998; SFORCIN *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, têm sido considerados como as substâncias biologicamente ativas da própolis (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA *et al.*, 1982, 1996; GRANGE & DAVEY, 1990; BONHEVI *et al.*, 1994; KOO *et al.*, 1999), embora outros compostos também estejam envolvidos, como os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres (IKENO *et al.*, 1991; AGA *et al.*, 1994; TAZAWA *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 1999) e os diterpenos (BANKOVA *et al.*, 1996; MITAMURA *et al.*, 1996).

Entre as própolis brasileiras estudadas, duas amostras têm se destacado quanto à sua atividade contra microrganismos bucais e inibição de GTFs, sendo provenientes do Rio Grande do Sul, classificada como própolis do tipo 3, e Minas Gerais, tipo 12. Estas duas própolis apresentam flavonóides agliconas em sua composição química (KOO *et al.*, 1999, KOO *et al.*, 2000a). Recentemente, uma terceira amostra de própolis, proveniente da região de mata atlântica da Bahia, tipo 6 (KOO *et al.*, 2000b),

demonstrou características bastante particulares, apresentando alta atividade antimicrobiana e uma composição química caracterizada por componentes apolares e ausência de flavonóides agliconas.

Deste modo, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar o efeito *in vitro* dessa nova variedade de própolis e das suas frações sobre os estreptococos do grupo mutans e na atividade das GTFs purificadas (GTF B, C e D e Ss).

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Placa e Cárie Dental

FITZGERALD & KEYES, em 1960, citados por GIBBONS (1996), encontraram que a atividade de cárie poderia estar associada a certos tipos de estreptococos.

Em 1965, KRASSE, citado por GIBBONS (1996), observou que a sacarose era especificamente requerida para a implantação de estreptococos cariogênicos na boca de hamsters e o subsequente desenvolvimento de um grande acúmulo desses microrganismos nos dentes.

Segundo NEWBRUN (1967), a sacarose é o mais importante entre os carboidratos fermentáveis cariogênicos, devido à sua função específica como substrato para a síntese de glucanos extracelulares pelos *S. mutans*.

Em 1967, GIBBONS & BANGHART, citados por GIBBONS (1996), relataram que cepas de estreptococos cariogênicos sintetizavam grandes quantidades de dextrano extracelular (um polissacarídeo) especificamente a partir da sacarose, e não da glicose ou outros açúcares. A síntese de

dextrano foi associada ao acúmulo de estreptococos na gengiva e em uma variedade de superfícies sólidas na boca.

De acordo com VAN HOUTE & GREEN (1974), os *S. mutans* não são particularmente bons colonizadores da superfície dental, já que não têm alta afinidade pelos receptores da película adquirida, necessitando de outros mecanismos de aderência, como a habilidade de sintetizar glucanos a partir da sacarose.

GIBBONS & VAN HOUTE, em 1975, relataram que em muitos ambientes naturais as bactérias têm preferência por colonizar superfícies. Da mesma forma, na boca, um grande número de bactérias cresce em superfícies viáveis. A colonização bacteriana destas superfícies requer inicialmente que os organismos estejam firmemente aderidos e, em seguida, que eles se proliferem sob condições existentes, sendo lógico afirmar que a colonização bacteriana pode ser influenciada por parâmetros que afetam não somente seu crescimento, mas também sua aderência.

Segundo HAMADA & SLADE (1980), entre vários microrganismos orais, os *S. mutans* têm sido identificados como formadores de placa capazes de produzir cárie dental em animais e humanos, associando seu potencial de induzir cárie à sua habilidade em se aderir firmemente à

superfície dental na presença de sacarose e formar ácidos pela fermentação de vários açúcares.

GIBBONS, em 1984, também relata que o potencial cariogênico dos *S. mutans* é principalmente dependente das suas altas propriedades acidogênicas e da habilidade de se acumular nos dentes, sendo que o acúmulo desses microrganismos nos dentes é devido à síntese de glucanos extracelulares a partir da sacarose.

HAMADA *et al.* (1984) relataram que na presença de sacarose os *S. mutans* sintetizam glucanos insolúveis, que são aderentes a qualquer superfície sólida, incluindo a superfície dental. Sendo assim, um modo de prevenir cárie seria interromper o processo de aderência desses microrganismos à superfície dental.

KOHLER *et al.* (1984), estudando um programa profilático para mães, relataram que estratégias de tratamento que interfiram com a colonização de *S. mutans* podem ter um profundo efeito na incidência de cárie dental na população humana.

De acordo com LOESCHE (1986), os glucanos insolúveis (com ligações α -1,3) são de significância patológica na cárie dental de superfície lisa em animais quando uma dieta rica em sacarose é consumida. O autor

também relata que quando a sacarose é ingerida em intervalos freqüentes entre as refeições, a queda do pH da placa torna-se mais freqüente, aumentando assim a chance para a desmineralização do esmalte dental.

Segundo HANADA & KURAMITSU (1989), três GTFs distintas, secretadas pelo *S. mutans*, estão bem caracterizadas tanto bioquimicamente quanto ao nível molecular: 1) GTFB - codificada pelo gene *gtfB*, que sintetiza glucanos insolúveis em água, tendo ligações glicosídicas principais α -1,3; 2) GTFC - codificada pelo gene *gtfC*, que sintetiza uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis, os primeiros apresentando ligações glicosídicas principais α -1,6; e 3) GTFD - codificada pelo gene *gtfD*, que sintetiza basicamente glucanos solúveis

MARSH (1992) relatou que, embora muitos agentes antimicrobianos possam ser adequados para o controle de placa, pouco tem sido encontrado sobre sua eficácia clínica. Além disso, o controle de placa poderia ser atingido por agentes que removessem organismos aderidos ou prevenissem a colonização do esmalte dental. O autor também relata que embora a concentração inibitória mínima (CIM) não seja necessariamente um indicador seguro de eficácia clínica, é geralmente citada como o primeiro indicador da eficácia dos agentes controladores de placa.

De acordo com RUSSEL (1994), além dos *S. mutans*, muitos outros estreptococos orais, como *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. downei*, secretam GTFs extracelulares que podem contribuir para sua aderência à película adquirida.

Em 1995, VENKITARAMAN *et al.* purificaram as enzimas GTFB, GTFC e GTFD e caracterizaram a atividade dessas enzimas em solução e aderidas à superfície, explorando o papel de seus produtos, os glucanos, na aderência bacteriana em uma película experimental. Os autores demonstraram que as enzimas GTFB, GTFC e GTFD são ativas na película experimental e que o comportamento dessas enzimas em solução pode diferir daquele da enzima aderida à superfície de hidroxiapatita. Em acréscimo, os glucanos produzidos pela GTFB ou GTFC, mas não pela GTFD, aumentaram a aderência de *S. mutans* G55 e *S. sobrinus* 6715 à película.

VACCA-SMITH *et al.* (1996) estudaram as interações das GTFs de estreptococos com α -amilase salivar humana em solução e aderidas à superfície de hidroxiapatita coberta com saliva. As GTFB e GTFC, quando aderidas, inibiram parcialmente a atividade da amilase salivar. A GTFD aderida teve a mais alta atividade inibitória sobre a amilase salivar e esta inativação poderia ser causada por uma interação física entre a GTFD e a α -

amilase aderida. Entretanto, não houve interação entre as GTFs e a amilase salivar quando em solução. Embora a atividade da amilase salivar tenha sido reduzida na presença de GTFs, os hidrolisados do amido produzidos pela amilase aderida foram utilizados pela GTFB, resultando em um aumento da síntese de glucanos a partir da sacarose.

Em 1998, VACCA-SMITH & BOWEN examinaram as possíveis interações entre as GTFB, GTFC e GTFD com hidroxiapatita, hidroxiapatita coberta com saliva e em superfície bacteriana, mostrando que a GTFB está relacionada com a ligação à superfície bacteriana, a GTFC à superfície de hidroxiapatita, a GTFD não demonstrou a mesma capacidade de interação com as diferentes superfícies testadas quando comparadas com GTFs B e C.

Segundo WUNDER & BOWEN (1999), os glucanos produzidos pelas GTFs atuam como mediadores da aderência sacarose-dependente de estreptococos mutans na superfície dental, sendo essencial para a cariogenicidade desses microrganismos. Os autores relataram, também, que os glucanos contribuem significativamente na composição exopolissacarídica da matriz da placa dental. Sendo assim, agentes que inibem GTFs podem ter benefício terapêutico. Os autores analisaram várias classes de reagentes químicos (cátions metálicos, reagentes oxidantes e

açúcares) quanto aos seus potenciais em inibir as enzimas responsáveis pela síntese de glucanos insolúveis (GTFB), solúveis/insolúveis (GTFC) e solúveis (GTFD) de *S. mutans*, concluindo que a natureza do inibidor, bem como, o estado físico das GTFs (em solução ou aderidas a superfície da película salivar) são fatores determinantes para a inibição destas enzimas.

CURY *et al.* (2000) avaliaram a composição da placa dental formada na presença de sacarose ou glicose e frutose e sua relação com cariogenicidade e sugeriram que a alta cariogenicidade da placa dental na presença de sacarose pode ser principalmente explicada pela alta concentração de glucanos insolúveis em sua matriz, pela baixa concentração inorgânica e, além disso, sua composição protéica também pode ter alguma contribuição.

2.2. Própolis

2.2.1. Composição Química da Própolis

Em 1926, JAUBERT, citado por GHISALBERTI (1979), isolou da própolis a crisina, um flavonóide, composto responsável pela cor da cera de abelha.

Em 1969, POPRAVKO *et al.*, citados por GHISALBERTI (1979), aplicaram uma técnica de separação e identificação de componentes da própolis em que seis flavonóides foram isolados.

GHISALBERTI (1979), em uma revisão bibliográfica, relatou sobre a origem e uso da própolis, atividade farmacológica atribuída a seus extratos e os compostos que tinham sido isolados e identificados. Segundo o autor, as abelhas coletam própolis de várias partes da planta, sendo que fatores sazonais podem ser responsáveis pela disponibilidade da própolis. O autor também relata que os maiores constituintes da própolis na maioria das fontes são flavonóides e que poucos estudos tem sido realizados para determinar a toxicidade da própolis e seus extratos.

MONTI *et al.* (1983) citam que a composição precisa da própolis varia com a amostra, sendo que em geral, ela é composta por 50% de resina e bálsamos vegetais, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo *debris* orgânicos.

Em 1987, BAKANA *et al.* estudaram a estrutura e a atividade quimioterapêutica de uma benzofenona poliprenilada, identificada como garcinol, também chamada de camboginol, extraída da *Garcinia huillensis*, planta utilizada na medicina popular na África Central. Este composto,

também encontrado em algumas amostras de própolis, mostrou atividade contra cocos gram-positivos e gram-negativos, micobactérias e fungos.

De acordo com ROUBIK (1989), citado por RUBIO *et al.* (1999), exudatos resinosos das flores de diversas espécies de *Clusia* são coletadas por abelhas (*Apis mellifera*) tropicais e essas resinas contêm benzofenonas poliprenilados como principais componentes.

AMOROS *et al.* (1992b) analisaram *in vitro* a atividade da maioria dos flavonóides identificados na própolis contra o vírus da herpes simples tipo 1, encontrando que os flavonols foram mais ativos que as flavonas. Os autores também observaram efeito sinérgico entre os diferentes flavonóides, o que poderia explicar porque a própolis foi mais ativa que os compostos individuais.

TOMÁS-BARBERÁN *et al.* (1993) analisaram compostos fenólicos presentes em trinta e oito amostras de própolis produzidas na Venezuela tropical pela *Apis mellifera* e cinco espécies indígenas de abelhas. As própolis tropicais geralmente mostravam-se caracterizadas pela ocorrência de benzofenonas poliprenilados como principais componentes, sendo que flavonóides estiveram presentes apenas em algumas amostras.

BONHEVI *et al.* (1994) determinaram a composição de quinze amostras de própolis de várias origens botânicas e geográficas, determinando a quantidade de água, cera, sais minerais, metais pesados, resinas e bálsamos, componentes fenólicos, óleos essenciais e carboidratos. Vinte e seis compostos fenólicos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo acacetina e apigenina os mais abundantes.

Em 1995, BANKOVA *et al.* analisaram quatro amostras de própolis brasileiras em cromatografia gasosa - espectrometria de massa (CG-EM) e identificaram trinta e dois compostos voláteis (dez deles novos para a própolis), assim como compostos polares (um deles novo para a própolis). Além disso, encontraram atividade antibacteriana em algumas frações das própolis.

KOO & PARK (1997) investigaram a qualidade e a quantidade de dois tipos de própolis coletadas de duas diferentes variedades de abelhas *Apis mellifera*, uma obtida na região sudeste do Brasil e outra, na região sul do Brasil, onde o experimento foi realizado. Os autores notaram diferença quantitativa e qualitativa, indicando que a composição química da própolis foi dependente da variedade da abelha.

PARK *et al.* (1997) analisaram quarenta e seis amostras de própolis coletadas de sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato grosso do Sul) e sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) do Brasil quanto à concentração total de flavonóides, sendo que os resultados demonstraram grande variabilidade no teor de flavonóides presentes nas diferentes amostras.

TAZAWA *et al.* (1998) isolaram de própolis brasileira, coletada no estado de Minas Gerais, dois novos derivados do ácido cinâmico, juntamente com vinte e dois compostos conhecidos. Além disso, os autores encontraram que alguns dos compostos isolados estavam também presentes em espécies de *Baccharis*, planta utilizada em medicina popular no Brasil.

Em 1999, RUBIO *et al.* analisaram própolis coletada de uma pequena área, Nuevitas, em Cuba e descreveram o isolamento, a identificação e as atividades antimicrobianas e antifúngicas de um novo benzofenona poliprenilado. A própolis foi coletada em áreas onde as plantas dominantes eram *Clusia minor* e *Clusia rosea*.

BANKOVA *et al.* (1999) investigaram própolis e secreções de plantas de três espécies mais freqüentemente mencionadas como fontes

botânicas de própolis no Brasil (*Baccharis drancunculifolia*, *Araucária augustifolia* e *Eucalyptus citriodora*) usando CG-EM. Baseados na evidência química encontraram que *B. drancunculifolia* foi a principal fonte vegetal da própolis do estado de São Paulo.

Em 2000, LOKVAM *et al.* estudaram duas benzofenonas poliisopreniladas (similares estruturalmente, diferindo apenas no grau de prenilação) extraídas de *Clusia grandiflora* contra patógenos de colméias (*Paenibacillus larvae* e *Paenibacillus alvei*). Foi feita a análise antimicrobiana através de teste de difusão em ágar, e os dois compostos apresentaram uma potente atividade contra os microrganismos analisados.

Em 2000, PARK *et al.* identificaram e classificaram 12 tipos de própolis brasileiras, de acordo com suas características químicas. Anteriormente a própolis era classificada pela região em que era coletada, entretanto, notou-se que própolis de um mesmo tipo, ou seja, com características químicas semelhantes, estariam presentes em lugares diferentes. Sendo assim, a partir de agora as própolis serão classificadas de acordo com o perfil em cromatografia em camada delgada (CCD) e não mais pelo local de coleta. Dentre essas própolis estão a do tipo 3, classificada anteriormente como própolis do Rio Grande do Sul, encontrada

também no Paraná, tipo 12, de Minas Gerais e tipo 6, da região de mata atlântica da Bahia.

MOURA (2000) avaliou os aspectos físico-químicos e biológicos das própolis produzidas pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* na região nordeste do Brasil. Analisando própolis da região de mata atlântica da Bahia, o autor observou um perfil cromatográfico não encontrado em nenhuma própolis brasileira estudada até o momento, possuindo compostos de características mais apolares que as demais própolis, sendo que esta própolis também apresentou atividade antimicrobiana, analisada através de halo de inibição, contra *S. aureus* e *S. mutans*.

ALENCAR *et al.* (2001) investigaram quimicamente própolis da região de mata atlântica da Bahia e folhas de *Hyptis devaricata*, mencionada como sua fonte botânica, mediante o uso das técnicas de cromatografia em camada delgada de alta eficiência - fase reversa (CCDAE-FR), cromatografia líquida de alta eficiência - fase reversa (CLAE-FR) e CG-EM. Concluíram que a composição dos compostos fenólicos encontrados na própolis da região de mata atlântica da Bahia possibilitou uma clara diferenciação dos outros grupos de própolis encontradas no Brasil. Além disso, a origem botânica desse tipo de própolis mostrou ser a espécie vegetal *H. devaricata*.

2.2.2. *Propriedades Farmacológicas e Toxicidade da Própolis*

HAVSTEEN (1983), em uma revisão sobre a farmacologia e bioquímica dos flavonóides, relatou que quando contidos nas própolis, estes podem ser responsáveis por suas atividades farmacológicas e antioxidantes.

BURDOCK (1998), revisando sobre as propriedades biológicas e a toxicidade da própolis, relatou que esta possui uma baixa toxicidade, sendo que alguns autores encontraram valores de DL_{50} variando entre 2000 a 7300 mg/Kg para ratos.

KUJUMGIEV *et al.* (1999) relataram resultados de estudos quanto à atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral de amostras de própolis de diferentes locais em trópicos e zonas temperadas. A atividade antibacteriana contra *S. aureus* 209 e *Escherichia coli* WF foi medida através de zona de inibição de crescimento bacteriano em meio ágar, sendo que todos os extratos exibiram significante atividade antibacteriana e antifúngica.

✓ *Efeito antimicrobiano*

KIVALKINA (1948), citado por GHISALBERTI (1979), realizou a primeira investigação sistemática da atividade antibacteriana da própolis, mostrando que própolis apresentou atividade bacteriostática contra *S. aureus* e outras bactérias.

Em 1958, LAVIE, citado por GHISALBERTI (1979), observou que a própolis mostrava uma significativa atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei* e *Proteus vulgaris*.

DEREVICI *et al.* (1965), citados por GHISALBERTI (1979), sugeriram que a própolis seria responsável pela baixa incidência de bactérias e mofo dentro da colméia.

METZNER *et al.* (1975), citado por IKENO *et al.* (1991), demonstraram que alguns compostos presentes no extrato de própolis tinham atividade antimicrobiana.

Segundo RIOS *et al.* (1988), extratos de plantas que são ativos a 100 µg/mL têm um bom potencial antimicrobiano e, dependendo da natureza química do componente responsável por esta atividade, a

subseqüente técnica de purificação, ou seja, o isolamento e identificação dos compostos, poderia ser bastante viável.

IKENO *et al.* (1991) examinaram o efeito de própolis provenientes da China e do Japão na cárie dental em ratos e seus efeitos inibitórios no crescimento bacteriano de *S. sobrinus* 6715, *S. mutans* PS14 e *S. cricetus* OMZ61 (medidos através de halo de inibição) e na atividade das GTFs de estreptococos mutans. Demonstraram que estas própolis tiveram atividade antimicrobiana, inibiram a síntese de glucanos insolúveis em água e inibiram parcialmente a atividade das GTFs. Houve também uma diminuição da cárie dental em ratos que receberam própolis (presentes na água em concentração de 1 mg/mL), sugerindo que a redução da cárie pela própolis depende não somente da ação antimicrobiana, mas também da inibição da síntese de glucanos insolúveis. Os autores também observaram que não houve efeito tóxico nos animais na concentração de própolis utilizada neste experimento (1 mg/mL).

BONHEVI *et al.*, em 1994, analisando a atividade bacteriostática contra *B. subtilis* CIP 155, *E. coli* CECT 434 e *S. aureus* CECT 435 de quinze amostras de própolis de várias origens botânicas e geográficas, encontraram que a atividade bacteriostática do extrato etanólico de própolis (40% v/v) foi maior contra *S. aureus* que *B. subtilis* e muito menor

que contra *E. coli*. A amostra de própolis que demonstrou a maior atividade contra *B. subtilis* e *S. aureus* mostrou um MIC em torno de 80 µg/mL. Os componentes da própolis também foram estudados individualmente, observando-se menor atividade bacteriostática que o extrato da própolis bruta, podendo estar associado ao efeito sinérgico dos flavonóides e outros compostos fenólicos.

STEINBERG *et al.* (1996) investigaram as propriedades antibacterianas de própolis e mel contra bactérias orais *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que própolis teve um efeito antibacteriano contra os estreptococos orais isolados e redução da contagem de bactérias na saliva. O mel induziu o crescimento bacteriano em baixas concentrações, enquanto que em altas concentrações teve um efeito inibitório, podendo este efeito ser atribuído à osmolaridade.

KOO *et al.* (1999) avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis (EEP) coletadas de duas regiões do Brasil (Minas Gerais e Rio Grande do Sul) no desenvolvimento de cáries em ratos dessalivados. As duas amostras apresentaram composição química distinta. O grupo de animais tratado com EEP do Rio Grande do Sul mostrou os menores índices de cárie de superfície e de sulco, bem como menor severidade de cárie. Os

autores concluíram que o efeito cariostático da própolis depende da sua composição e, conseqüentemente, da região em que a amostra é coletada.

Em 2000a, KOO *et al.* analisaram os efeitos de própolis provenientes das mesmas regiões do Brasil mencionadas anteriormente, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, quanto à atividade das GTFs purificadas em solução e aderidas à superfície de hidroxiapatita coberta com saliva, indicando que o EEP é um potente inibidor das GTFs em solução e aderidas em uma película experimental. Entretanto, o seu efeito na atividade das GTFs é variável, dependendo da região em que a própolis é coletada. A amostra proveniente do Rio Grande do Sul demonstrou ser mais efetiva na inibição das GTFs purificadas do que a amostra de Minas Gerais.

SFORCIN *et al.* (2000) verificando o efeito sazonal na atividade biológica da própolis, observaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de própolis da região de Botucatu, SP, Brasil, coletada durante as quatro estações. Para a análise antimicrobiana foram utilizadas cepas bacterianas isoladas de infecções humanas (*S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium*), que foram testadas quanto à CIM em meio ágar, não demonstrando diferença significativa entre as amostras coletadas em diferentes estações do ano.

KOO *et al.* (2000b) avaliaram os efeitos de uma nova variedade de própolis da região de mata atlântica da Bahia, nordeste brasileiro, no crescimento de estreptococos mutans analisado através de CIM e CBM, na aderência celular e na síntese de glucanos insolúveis em água. Demonstraram que esta nova variedade de própolis, cujo perfil cromatográfico é totalmente diferente dos relatados até então, foi excepcionalmente efetiva em todos os testes *in vitro* contra esses microrganismos. Os autores sugeriram que o efeito biológico desta própolis, coletada na região da Bahia, não pode ser somente relacionado aos flavonóides e derivados do ácido cinâmico. Os autores também relataram que o perfil cromatográfico desta própolis é semelhante ao da própolis coletada na Venezuela, que é caracterizada pela ocorrência de benzofenonas poliprenilados.

ALENCAR *et al.* (2001) analisaram, através de antibiograma, a própolis da região de mata atlântica da Bahia, coletada em diferentes estações do ano, quanto à atividade antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25293, demonstrando que, qualitativamente, as amostras de própolis coletadas ao longo do ano demonstraram alta atividade antimicrobiana ao microrganismo, o que poderia estar relacionado principalmente as benzofenonas isopreniladas.

OBJETIVOS

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

3. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis (EEP) tipo 6, proveniente da região de mata atlântica da Bahia, e suas quatro frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol), assim como seus efeitos na atividade das GTFs purificadas.

Para a análise da atividade antimicrobiana, foram utilizadas cepas bacterianas de coleção e isoladas recentemente de pacientes, para, assim, verificar a diferença no comportamento desses microrganismos.

O efeito dos extratos da própolis e das frações foram analisados por meio da:

- a. Determinação da zona de inibição pelo método de difusão em ágar;
- b. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM);
- c. Análise da inibição de aderência celular em superfície de vidro;
- d. Análise da atividade de glucosiltransferase B, C e D e Ss em solução e aderidas à superfície de hidroxiapatita.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e fracionamento da própolis

Amostras de própolis bruta de *Apis mellifera* provenientes da região de mata atlântica da Bahia (tipo 6), nordeste brasileiro (Figura 1) foram coletadas diariamente nos apiários, raspando-se a própolis produzida nas fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colméia. Após raspagem, o material foi acondicionado em sacos plásticos, devidamente etiquetados, e armazenado em refrigerador (4°C) até o momento de sua utilização.

A partir da própolis bruta foram obtidos o EEP (Extrato Etanólico da Própolis) e suas frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol). Para a obtenção do EEP, foram pesados em um béquer de vidro 500 g de própolis triturada em liquidificador (Figura 2). Neste béquer foram adicionados 1000 mL de uma solução de etanol 80% (v/v) e foi feita uma maceração sob agitação a 70°C por 30 minutos (Figura 3). Após a maceração, a mistura foi centrifugada a baixa temperatura (4°C), 10.000 x g, por 5 minutos (Figura 4), e o sobrenadante separado foi armazenado em frasco de vidro âmbar com tampa de rosca. No precipitado (própolis macerada) o procedimento acima foi repetido, utilizando o mesmo volume de etanol 80% (v/v). Após a segunda centrifugação, nas mesmas condições,

os sobrenadantes foram misturados e concentrados sob pressão reduzida em um evaporador rotativo (Figura 5), para que houvesse evaporação do solvente, restando no concentrado apenas os componentes extraídos pelo etanol 80% (v/v). A partir deste concentrado foi preparada uma solução inicial a 20% (p/v) do extrato etanólico da própolis bruta em etanol 80% (v/v).



Figura 1 - Própolis Bruta

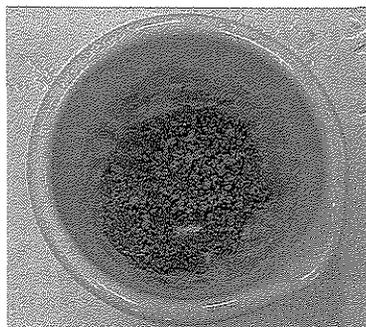


Figura 2 - Própolis Bruta triturada

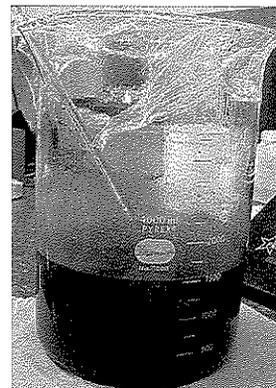


Figura 3 - Extração com etanol 80% (v/v)



Figura 4 - Centrífuga (4°C, 10.000 x g, 5 min)

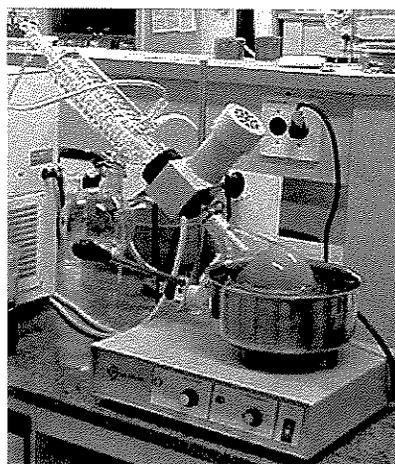


Figura 5 - Evaporador Rotativo



Figura 6 - EEP sendo concentrado

O restante deste concentrado foi utilizado para a obtenção das frações através de sucessivas extrações com solventes orgânicos de acordo com um gradiente de polaridade padrão (em ordem crescente de polaridade, representado na Tabela 1: hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol). O acompanhamento das diferentes etapas de fracionamento foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), cujo desenvolvimento foi observado através de radiação ultravioleta a 254 e 366 nm, de acordo com PARK *et al.* (1997). Inicialmente, foi adicionado a este concentrado o solvente hexano, extraíndo assim do extrato bruto todos os componentes com polaridade semelhante à deste solvente. Este procedimento foi repetido até que não houvesse mais extração de nenhum componente pelo hexano, confirmado através da CCD. Após esta etapa, ao mesmo concentrado foi adicionado clorofórmio (Figura 7), que, embora também apolar, possui uma polaridade maior que a do hexano, repetindo os procedimentos. Assim sucessivamente com o acetato de etila e o etanol, resultando nas quatro frações, que também foram concentradas sob pressão reduzida em um evaporador rotativo. Foi preparada uma solução inicial a 10% (p/v) para todas as frações em etanol 80% (v/v).

Tabela 1

Escala de polaridade dos solventes utilizados no fracionamento da própolis

| SOLVENTE | POLARIDADE |
|------------------|------------|
| n-hexano | 0,01 |
| Clorofórmio | 0,40 |
| acetato de etila | 0,58 |
| Etanol | 0,88 |

escala de polaridade segundo Snyder & Kirkland, 1979

Fonte: COLLINS *et al.*, 1995

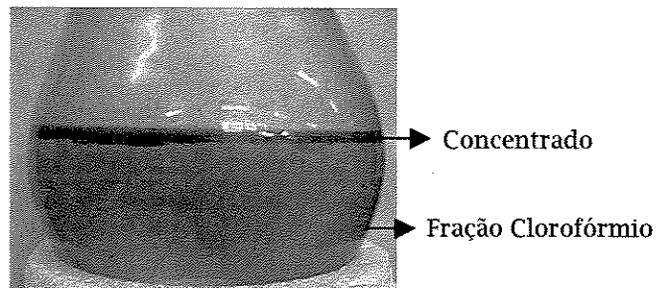


Figura 7 - Obtenção da Fração Clorofórmio

4.2. Atividade antimicrobiana *in vitro*

4.2.1. Microrganismos

Para os testes de Técnica de Difusão em Ágar (Halo de Inibição), Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima

(CBM) e Inibição da Aderência Celular em Superfície de Vidro, foram utilizados os seguintes microrganismos:

- ✓ *S. mutans* Ingbritt 1600 e mais dois isolados clínicos recentes, que foram denominados *S. mutans* 1 e *S. mutans* 2.

- ✓ *S. sobrinus* 6715 e mais dois isolados clínicos recentes, que foram denominados *S. sobrinus* 1 e *S. sobrinus* 2.

Os microrganismos isolados de pacientes há menos de um ano foram gentilmente cedidos pelo “Laboratório de Microbiologia e Imunologia Oral” da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

4.2.2. Preparo da suspensão bacteriana

Os microrganismos foram reativados de suas culturas originais (armazenadas em meio líquido “Brain Heart Infusion” [BHI], contendo 20% de glicerol e mantidos a -70°C) em 10 mL de meio de cultura BHI nas seguintes condições: temperatura a 37°C, em atmosfera contendo 10% de CO₂, por um tempo de incubação de 18 a 24 horas. Após o crescimento, as bactérias foram inoculadas em placas de petri contendo BHI ágar e incubadas nas mesmas condições descritas acima. As bactérias foram constantemente verificadas através da análise de morfologia e coloração de

Gram. Em acréscimo, as culturas sempre foram verificadas quanto a possível contaminação.

Colônias isoladas foram, então, retiradas da placa e suspensas em 5 mL de solução de NaCl a 0,89% esterilizada até atingir uma turbidez com leitura de absorbância de aproximadamente 0,135 a 660 nm, o que equivale a um crescimento bacteriano semi-confluyente na superfície do ágar de $1-2 \times 10^8$ ufc/mL.

4.2.3. Teste de difusão em ágar (Halo de Inibição)

Para o teste de difusão em ágar, segundo técnica descrita por PIDDOCK (1990), PHILLIPS (1991) e KOO *et al.* (2000b), uma alíquota (300 μ L) da suspensão bacteriana descrita foi inoculada em 30 mL do meio BHI ágar à 45°C, sendo a mistura homogeneizada através de um agitador magnético. Após a homogeneização, o meio, inoculado com bactéria, foi imediatamente distribuído em placas de petri contendo uma camada base preexistente de “Mueller Hinton” (MH) ágar.

Após total solidificação do meio, seis (6) cilindros de aço-inoxidável (medindo 6 mm de diâmetro interno, 8 mm de diâmetro externo e 10 mm de altura) esterilizados foram colocados sobre a superfície do ágar semeado (Figura 8). Foi realizada uma diluição a partir dos extratos etanólicos iniciais, descritos anteriormente, e neste teste, todos os extratos

(bruto, frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol) foram utilizados na concentração de 5% (p/v) em etanol 80% (v/v). Um volume de 40 μ L (equivalente à concentração de 400 μ g/mL) do EEP, das quatro frações e do controle negativo [etanol 80% (v/v)] foi colocado no interior de cada cilindro (Figura 9). As placas foram mantidas em repouso por duas (2) horas na temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos e, após esse procedimento, incubadas em estufa à 37°C, atmosfera parcial de 10% de CO₂ por 24 horas. Mediu-se então a zona de inibição de crescimento ao redor do cilindro (Figura 10), com auxílio de um paquímetro digital.

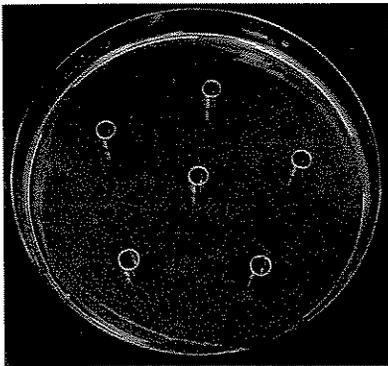


Figura 8 - seis cilindros colocados sobre o ágar semeado

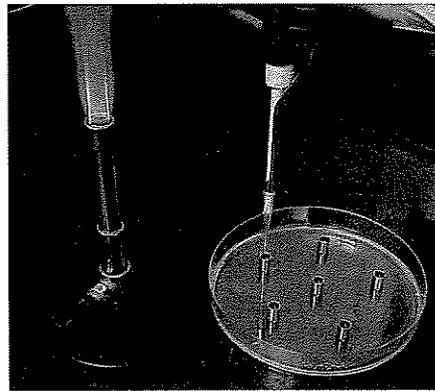


Figura 9 - 40 μ L de extrato colocados no interior de cada cilindro

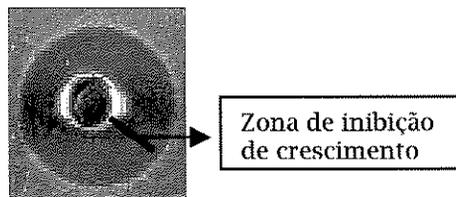


Figura 10 -Halo de Inibição

4.2.4. Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada de acordo com a técnica descrita por PIDDOCK (1990), PHILLIPS (1991) e KOO *et al.* (2000b), sendo utilizados tubos contendo meio de cultura líquido BHI. Um volume de 100 μL da suspensão bacteriana, descrita no item 4.2.2., foi inoculado em 100 mL do meio BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ ufc/mL, sendo a mistura homogeneizada através de um agitador magnético. Imediatamente após a homogeneização, um volume de 4960 μL de meio de cultura inoculado foi colocado em cada tubo. Um volume de 40 μL do EEP ou de suas quatro frações (concentrações finais variando entre 1600 $\mu\text{g/mL}$ a 12,5 $\mu\text{g/mL}$, com diluição seriada de razão 2) foi acrescentado em cada tubo, resultando em um volume final de 5 mL de solução. Em seguida, os tubos foram agitados e incubados em estufa à 37°C de temperatura, atmosfera parcial de 10% de CO_2 , por 24 horas.

Após a incubação, os tubos foram agitados e foi feita a leitura através de um espectrofotômetro (Figura 11) a 660 nm. Foram feitos três controles para todos os microrganismos: 1) meio de cultura inoculado de bactéria, 2) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 40 μL de etanol 80 % (v/v) e 3) meio de cultura (sem inóculo) acrescido de 40 μL dos extratos (EEP ou frações), para cada uma das concentrações, sendo este utilizado como “blank” para espectrofotometria. A CIM foi considerada a

menor faixa de concentração do EEP e de suas frações em que não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura da absorbância a 660 nm, menor que 0,05.

4.2.5. Concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima, segundo técnica descrita por PHILLIPS (1991) e KOO *et al.* (2000b), foram utilizadas placas de petri contendo meio de cultura BHI ágar com 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

Baseando-se nos resultados obtidos no teste da CIM, utilizaram-se como inóculo as suspensões provenientes dos tubos que apresentaram um resultado de leitura de absorbância, a 660 nm, inferior a 0,05. As placas foram semeadas utilizando 50 µL de inóculo com auxílio de uma “Spiral-plater” (Whittley Automatic Spiral Plater, DW Scientific®) (Figura 12), sendo posteriormente incubadas em estufa a 37° C, atmosfera parcial de 10% de CO₂ por 48 horas. A CBM foi considerada a menor concentração do EEP e das duas frações (hexano e clorofórmio) que apresentaram CIM em que não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado, ou seja, 99,9% de morte bacteriana.

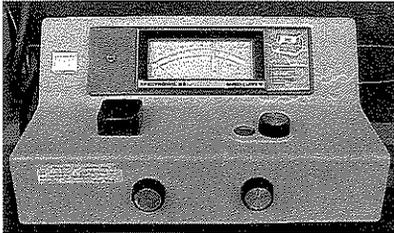


Figura 11 - espectrofotômetro



Figura 12 - inoculação com o auxílio de uma "Spiral Plater"

4.3. Inibição da aderência celular à superfície de vidro

Para determinar a inibição da aderência celular, foi utilizada a metodologia descrita por HAMADA & TORII (1978) e KOO *et al.* (2000b), modificada.

Um volume de 100 μL da suspensão bacteriana descrita no item 4.2.2. foi inoculado em 100 mL do meio BHI contendo 1% de sacarose, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ ufc/mL, sendo a mistura homogeneizada. Imediatamente após a homogeneização, um volume de 2480 μL do meio foi colocado em cada tubo previamente esterilizado. Um volume de 20 μL do EEP e de suas frações foi então acrescentado em cada tubo, resultando em um volume final de 2,5 mL de solução. A concentração final de cada extrato foi de $\frac{1}{4}$ do valor da CIM para cada microrganismo. Em seguida, os tubos foram suavemente agitados.

Esses tubos foram inclinados em um ângulo de aproximadamente 30° (Figura 13) e incubados em estufa à 37°C de temperatura, atmosfera com 10% de CO₂, por 18 horas. Foram feitos dois (2) controles para todos os microrganismos: 1) meio de cultura inoculado de bactéria e 2) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 40 µL de etanol 80 % (v/v).

Após a incubação, os tubos foram retirados cuidadosamente da estufa, desprezado o conteúdo, seguido de um processo de lavagem para remover o meio de cultura e células não aderidas ao tubo. Essa lavagem foi feita com uma solução tampão de fosfato de potássio 0,05 M; pH 6,8. Um volume de 2 mL deste tampão foi colocado no tubo, girando-o gentilmente em torno de si mesmo e desprezando a solução, este procedimento foi repetido por 3 vezes. Um volume de 5 mL dessa solução tampão foi então colocado no tubo e aplicou-se no interior deste três (3) pulsos de ultra-som (Sonics & Material Inc. Vibracell®) (Figura 14) de 30 segundos, com intervalos de 5 segundos cada, com potência de 40 W, seguido de vigorosa agitação para o desprendimento das células aderidas à superfície do vidro. Foi feita a leitura da suspensão através de um espectrofotômetro a 550 nm, utilizando o tampão como “blank”. A inibição total da aderência bacteriana foi considerada quando a leitura de absorbância foi menor que 0,05.

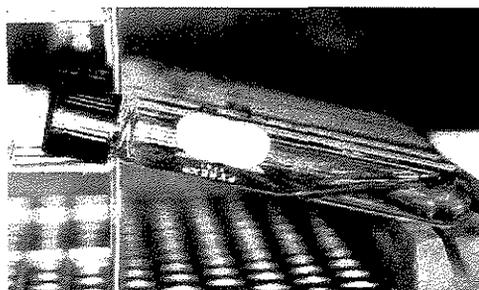


Figura 13 - Tubos incubados com um ângulo de 30°

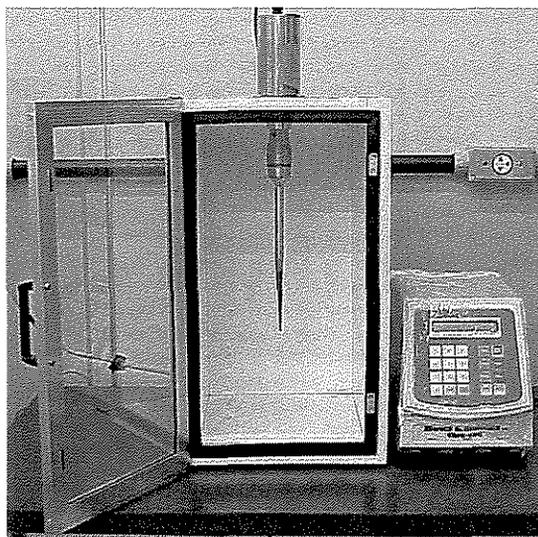


Figura 14 - Sonics & Material Inc. Vibracell®

4.4. Atividade das GTFs B, C, D e Ss purificadas

4.4.1. Obtenção e purificação das GTFs

As GTFs B e D foram obtidas a partir do sobrenadante das culturas de *S. milleri* KSB8, o qual contém o gene *gtfB* e *S. milleri* NH5, o qual contém o gene *gtfD* e a GTFC a partir do *S. mutans* WHB 410, do qual os genes *gtfB*, *gtfD* e *ftf* (frutossiltransferase) foram deletados. Além dos três tipos de GTFs propostos, a GTFSs, recentemente purificada a partir do *S. sanguinis* 804 (NCTC 10904), também foi avaliada.

Todos os sobrenadantes obtidos das culturas foram purificados em colunas de hidroxiapatita 1X30 cm (MacroPrep ceramic Hydroxyapatite Type-I, 80 µm-particle size, Biorad, Hercules, CA). As enzimas foram

armazenadas a 4°C em tampão Adsorption buffer - AB (50 mM KCl, 1,0 mM KPO_4 , 1,0 mM $CaCl_2$, 0,1 mM $MgCl_2$, pH 6,5) contendo 10% de glicerol. As enzimas foram analisadas quanto ao grau de purificação, através de SDS-PAGE.

A atividade da glucosiltransferase foi determinada pela incorporação do ^{14}C -glicose da sacarose marcada [^{14}C -(glucosil)-sacarose; NEN Research Products, Boston, MA] no glucano sintetizado (KOO *et al.* 2000a).

Estas GTFs purificadas foram gentilmente cedidas pelo Centro de Biologia Oral da Universidade de Rochester, Rochester, NY, EUA.

4.4.2. Atividade das GTFs em solução

Segundo técnica descrita por WUNDER & BOWEN (1999) e KOO *et al.* (2000a), as GTFs B, C, D e Ss, individualmente, foram misturadas com o EEP ou suas frações em concentração variando entre 0,078 a 5,0 mg/mL para o extrato bruto e 25 a 400 μ g/mL para as frações. Essas concentrações foram obtidas através de uma diluição seriada de razão 2. Após este procedimento, as amostras foram incubadas com substrato de ^{14}C -(glucosil)-sacarose (200,0 mmol/L sacarose, 40 μ mol/L dextrana 9000, 1,0 mmol/L PMSF, 0,02% de NaN_3 em tampão AB, pH 6,5). A concentração final de sacarose foi de 100 mmol/L (200 μ L, volume final). Para o controle, a

mesma reação foi feita, porém adicionou-se etanol 80% ao invés de EEPs e suas frações, com concentração final de 8,0% para o EEP e 9,95% para as frações. As amostras foram então incubadas a 37°C sob agitação por 4 horas. Após a incubação, um volume de 1,0 mL de etanol à -20°C, foi adicionado para precipitação dos glucanos e as amostras foram armazenadas por 18 horas a 4°C. O glucano formado foi determinado por cintilometria, com o auxílio de um cintilógrafo (Beckman LS-600 IC®) (Figura 15). A porcentagem de atividade de GTF foi calculada considerando o controle como a máxima atividade enzimática.

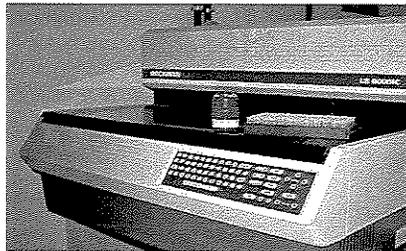


Figura 15 - Cintilógrafo Beckman LS-600 IC®

4.4.3. Atividade das GTFs aderidas à superfície de hidroxiapatita

As GTFs foram as mesmas utilizadas na avaliação da atividade das GTFs em solução (GTFs B, C, D e Ss).

Esferas de hidroxiapatita (Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite Type I Bio-Rad®, 80 µm) foram tratadas com saliva humana clarificada (saliva total estimulada obtida de um único doador e centrifugada a 8500xg, 4°C, por 10 minutos) para a formação da película experimental como detalhado por VENKITARAMAN *et al.* (1995), SCHILLING & BOWEN (1998) e KOO *et al.* (2000a). Em seguida, a superfície de HA foi tratada com 300 µL do EEP ou das frações (nas mesmas concentrações da análise em solução) por 30 minutos a 37°C. Para o controle, etanol 80% foi adicionado ao invés do EEP ou das frações, com concentração final de 8,0% para o EEP e 9,95% para as frações. As esferas de HA foram lavadas e expostas a 300 µL do substrato ¹⁴C-(glucosil)-sacarose, sendo posteriormente incubadas por quatro horas a 37°C. Após incubação, etanol (1,0 mL, -20°C) foi adicionado em cada amostra e armazenado por 18 horas a 4°C. Os glucanos foram quantificados como descrito na análise das GTFs em solução. A porcentagem de atividade de GTF foi calculada considerando o controle como a máxima atividade enzimática.

4.5. Análise estatística

Foram realizadas duplicatas de seis experimentos distintos para os testes antimicrobianos (teste de difusão em ágar, CIM e CBM) e para a análise da inibição de aderência bacteriana em superfície de vidro. Para os testes de inibição da atividade das GTFs, tanto em solução quanto aderidas

à superfície de hidroxiapatita, foram realizadas triplicatas de três experimentos distintos.

Para análise estatística do teste de difusão em ágar (halo de inibição), foi feita, inicialmente, uma análise de variância bifatorial através do teste F, seguida de uma comparação entre as médias, utilizando o teste de Tukey. Foi utilizado o programa Sanest¹.

¹ ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **Sanest**, Sistema de Análise Estatística. Empresa de Pesquisa Brasileira de Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Atividade antimicrobiana *in vitro*

Em todos os testes realizados, o extrato bruto e as frações hexano e clorofórmio apresentaram atividade antimicrobiana.

5.1.1. Teste de difusão em ágar (*halo de inibição*)

Os resultados da determinação das zonas de inibição estão demonstrados nas Tabelas 2 e 3. O extrato bruto, assim como as frações hexano e clorofórmio apresentaram zonas de inibição de crescimento para todos os microrganismos testados, diferindo estatisticamente do controle negativo (etanol 80%) e das frações acetato de etila e etanol, que não apresentaram inibição bacteriana. A fração hexano apresentou os maiores valores de zona de inibição, diferindo-se estatisticamente dos outros extratos testados para todos os microrganismos avaliados, com exceção do *S. mutans* 2 (em que não houve diferença entre a fração hexano e o extrato bruto).

De um modo geral, os isolados clínicos recentes foram mais resistentes do que os obtidos da cultura de coleção.

O *S. mutans* Ingbritt 1600 mostrou-se mais sensível, diferindo estatisticamente do isolado clínico recente *S. mutans* 2. O *S. mutans* 1 não apresentou diferença estatística quando comparado aos outros dois microrganismos desta espécie (Tabela 2).

Tabela 2
Médias das zonas de inibição de crescimento bacteriano (mm) para *S. mutans*.

| Tratamentos | <i>S. mutans</i> Ingbritt 1600 | <i>S. mutans</i> 1 | <i>S. mutans</i> 2 |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Extrato Bruto | 6,03 ± 0,44 ^{a A} | 5,57 ± 0,32 ^{a AB} | 5,51 ± 0,51 ^{ab B} |
| Fração Hexano | 6,72 ± 0,74 ^{b A} | 6,31 ± 0,38 ^{b AB} | 5,99 ± 0,56 ^{a B} |
| Fração Clorofórmio | 5,78 ± 0,78 ^{a A} | 5,04 ± 0,50 ^{a AB} | 5,39 ± 0,57 ^{b B} |
| Fração Acetato de Etila | 0,0 ^{c A} | 0,0 ^{c A} | 0,0 ^{c A} |
| Fração Etanol | 0,0 ^{c A} | 0,0 ^{c A} | 0,0 ^{c A} |
| Etanol 80% (Controle negativo) | 0,0 ^{c A} | 0,0 ^{c A} | 0,0 ^{c A} |

Os dados são médias ± desvio padrão de 6 repetições. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na vertical, indicam que os tratamentos diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na horizontal, indicam diferença estatística na sensibilidade dos microrganismos. Teste Tukey ($p < 0,05$).

Entre as cepas de *S. sobrinus* (Tabela 3), também houve diferença estatística, sendo que o *S. sobrinus* 6715 mostrou ser a cepa mais sensível. Quanto aos isolados clínicos também houve diferença estatística com relação ao extrato bruto e às frações hexano e clorofórmio. O *S. sobrinus* 2 mostrou os menores valores de zona de inibição, sendo o microrganismo mais resistente desta espécie.

Tabela 3
Médias das zonas de inibição de
crescimento bacteriano (mm) para *S. sobrinus*.

| Tratamentos | <i>S. sobrinus</i> 6715 | <i>S. sobrinus</i> 1 | <i>S. sobrinus</i> 2 |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Extrato Bruto | 5,04 ± 0,55 ^{aA} | 4,79 ± 0,69 ^{aB} | 4,31 ± 0,69 ^{aC} |
| Fração Hexano | 5,99 ± 0,57 ^{bA} | 5,33 ± 1,00 ^{bB} | 5,42 ± 0,50 ^{bC} |
| Fração Clorofórmio | 4,84 ± 0,44 ^{aA} | 4,76 ± 0,72 ^{aA} | 4,29 ± 0,36 ^{aB} |
| Fração Acetato de Etila | 0,0 ^{cA} | 0,0 ^{cA} | 0,0 ^{cA} |
| Fração Etanol | 0,0 ^{cA} | 0,0 ^{cA} | 0,0 ^{cA} |
| Etanol 80% (Controle negativo) | 0,0 ^{cA} | 0,0 ^{cA} | 0,0 ^{cA} |

Os dados são médias ± desvio padrão de 6 repetições. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na vertical, indicam que os tratamentos diferem estatisticamente. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na horizontal, indicam diferença estatística na sensibilidade dos microorganismos. Teste Tukey (p<0,05).

5.1.2. Concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados da CIM (Tabela 4), demonstram que o extrato etanólico da própolis bruta (EEP), assim como das frações hexano e clorofórmio, foram capazes de inibir o crescimento de estreptococos do grupo mutans em baixas concentrações. A fração hexano apresentou menores CIMs que o extrato bruto e a fração clorofórmio e as frações acetato de etila e etanol não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Os valores das CIMs dos extratos da própolis bruta e de suas frações para o *S. sobrinus* 6715 foram menores do que os obtidos para os isolados clínicos recentes. Entretanto, o mesmo não foi observado para as diferentes cepas de mutans.

Tabela 4
Valores da CIM do EEP e suas frações para
estreptococos do grupo mutans

| Microrganismos | Extrato Bruto | Fração Hexano | Fração Clorofórmio |
|-------------------------|---------------|---------------|--------------------|
| S. mutans Ingbritt 1600 | 50 †100 | 25 †50 | 50 †100 |
| S. mutans 1 | 50 †100 | 25 †50 | 50 †100 |
| S. mutans 2 | 50 †100 | 25 †50 | 50 †100 |
| S. sobrinus 6715 | 25 †50 | 12,5 †25 | 25 †50 |
| S. sobrinus 1 | 50 †100 | 25 †50 | 50 †100 |
| S. sobrinus 2 | 50 †100 | 25 †50 | 50 †100 |

Os resultados estão apresentados em faixas de concentração em µg/mL. † indica que o valor da CIM está entre as concentrações especificadas no intervalo.

5.1.3. Concentração bactericida mínima (CBM)

Os resultados de CBM obtidos, expressos na Tabela 5, demonstraram que a fração hexano se destaca, apresentando os menores valores de concentração bactericida mínima para todos os microrganismos. A fração clorofórmio não apresentou efeito bactericida nas concentrações testadas. O extrato bruto também não foi bactericida para o *S. mutans* Ingbritt 1600 e *S. mutans* 2 nas concentrações utilizadas.

Tabela 5
Valores da CBM do EEP e suas frações para
estreptococos do grupo mutans

| Microrganismos | Extrato Bruto | Fração Hexano | Fração Clorofórmio |
|-------------------------|---------------|---------------|--------------------|
| S. mutans Ingbritt 1600 | > 1600 | 400 † 800 | > 800 |
| S. mutans 1 | 800 † 1600 | 400 † 800 | > 800 |
| S. mutans 2 | > 1600 | 400 † 800 | > 800 |
| S. sobrinus 6715 | 400 † 800 | 100 † 200 | > 800 |
| S. sobrinus 1 | 400 † 800 | 200 † 400 | > 800 |
| S. sobrinus 2 | 400 † 800 | 200 † 400 | > 800 |

Os resultados estão apresentados em faixas de concentração em µg/mL. † indica que o valor da CBM está entre as concentrações especificadas no intervalo.

5.2. Inibição da aderência celular à superfície de vidro

Os resultados, expressos na Tabela 6, demonstram que o extrato bruto inibiu a aderência de todos os microrganismos à superfície do vidro em concentrações abaixo da CIM de cada extrato para cada microrganismo. As frações hexano e clorofórmio também inibem a aderência para a maioria dos microrganismos testados, sendo que a fração hexano apresentou os melhores resultados.

Tabela 6
Valores das Concentrações em que houve Inibição de
Aderência Bacteriana em Superfície de Vidro

| Microrganismos | Extrato Bruto | Fração Hexano | Fração Clorofórmio |
|-------------------------|---------------|---------------------|--------------------|
| S. mutans Ingbritt 1600 | 25 + 50 | > 25 [†] | > 50 [†] |
| S. mutans 1 | 25 + 50 | 12,5 + 25 | 25 + 50 |
| S. mutans 2 | 25 + 50 | 12,5 + 25 | 25 + 50 |
| S. sobrinus 6715 | 12,5 + 25 | > 12,5 [†] | > 25 [†] |
| S. sobrinus 1 | 12,5 + 25 | 12,5 + 25 | 25 + 50 |
| S. sobrinus 2 | 25 + 50 | 12,5 + 25 | 25 + 50 |

Os resultados estão apresentados em faixas de concentração em µg/mL.

+ indica que o valor está entre as concentrações especificadas no intervalo.

[†] indica que a inibição da aderência bacteriana é maior ou igual a CIM.

5.3. Atividade das Gtfs B, C, D e *S. sanguis* purificadas

5.3.1. Atividade das Gtfs em solução e aderidas à superfície de hidroxiapatita

Os resultados da análise de inibição da atividade das Gtfs purificadas estão ilustrados nas Figuras 16 a 25. O EEP da própolis bruta da Bahia, região de mata atlântica, mostrou-se um potente inibidor de todas as Gtfs analisadas, tanto em solução quanto aderidas à superfície de hidroxiapatita. A atividade enzimática de todas as Gtfs, quando analisadas em solução, foi reduzida em mais de 80% em concentrações do EEP menores que 0,5 mg/mL. Para as Gtfs aderidas à superfície de hidroxiapatita, o EEP também foi bastante eficiente, inibindo a atividade de

todas as Gtfs nas concentrações avaliadas, destacando-se a inibição da atividade das Gtfs B e C em mais que 70% em concentrações menores que 1,5 mg/mL.

Entre as quatro frações, a hexano e a clorofórmio apresentaram os melhores resultados, inibindo a atividade de todas as Gtfs analisadas em solução em aproximadamente 60 a 90% na concentração de 100 µg/mL. Para as Gtfs aderidas à superfície de hidroxiapatita, estas frações inibiram a atividade das Gtfs B e C em aproximadamente 50 a 60% em concentrações menores que 200 µg/mL. As Gtfs D e Ss também foram inibidas, porém em menor escala.

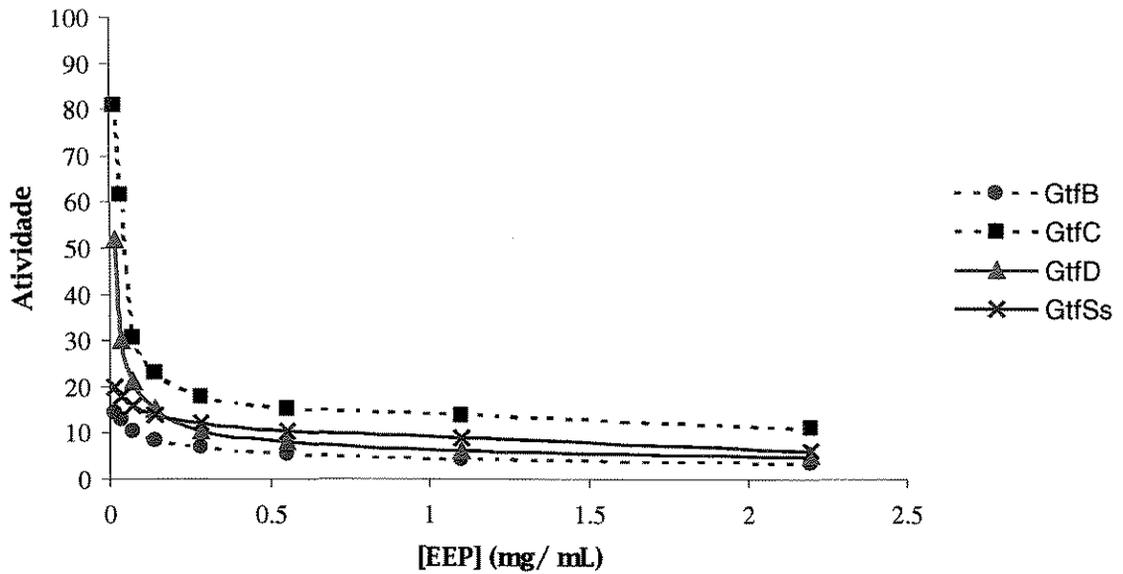


Figura 16 - Análise do efeito do EEP na atividade das Gtfs em solução.

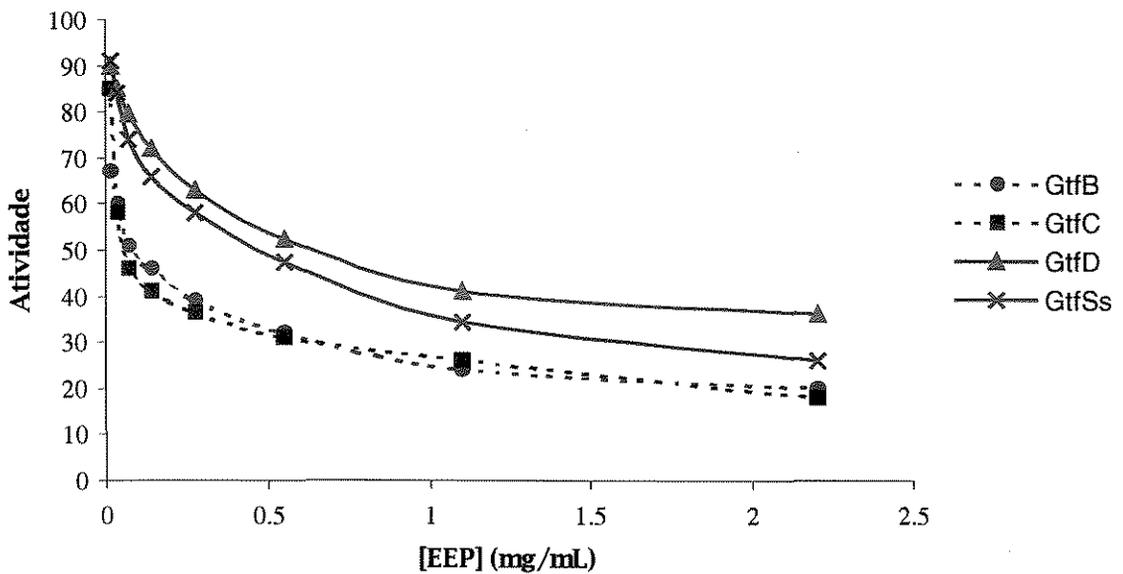


Figura 17 - Análise do efeito do EEP na atividade das Gtfs aderidas à superfície de hidroxiapatita.

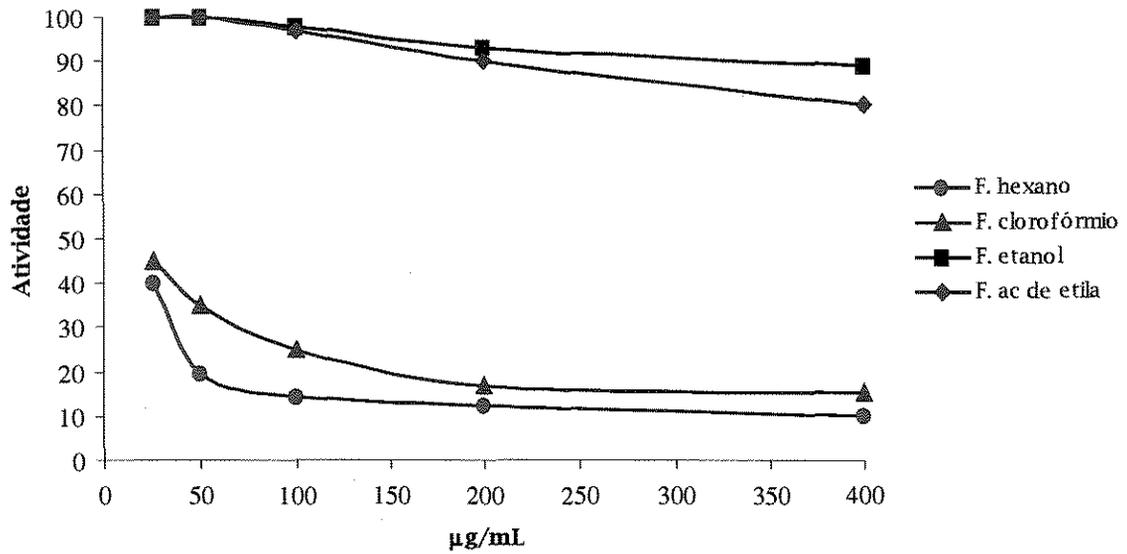


Figura 18 - Efeito das frações da própolis na atividade da GtfB em solução.

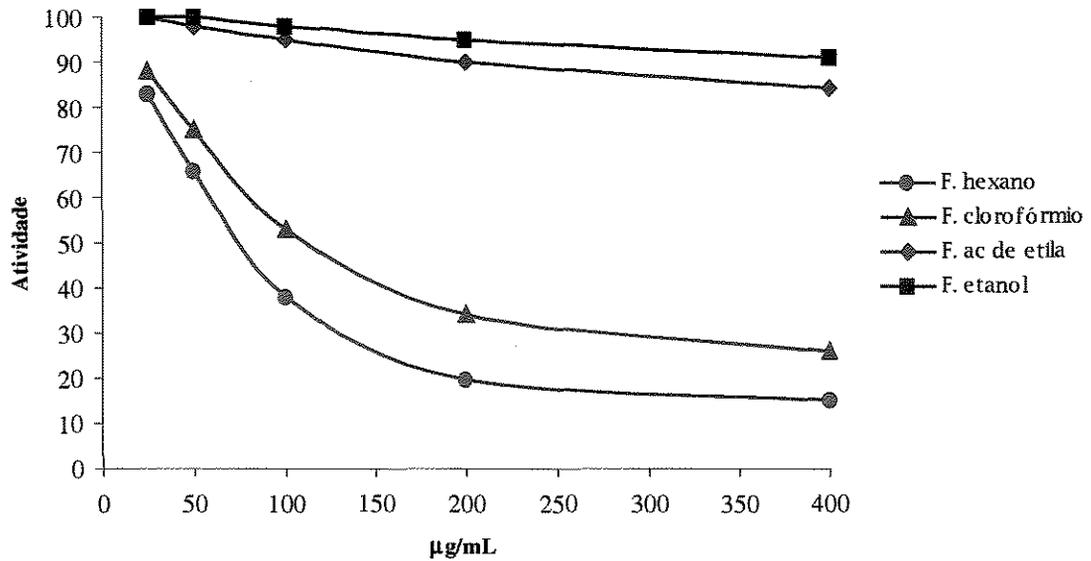


Figura 19 - Efeito das frações da própolis na atividade da GtfC em solução.

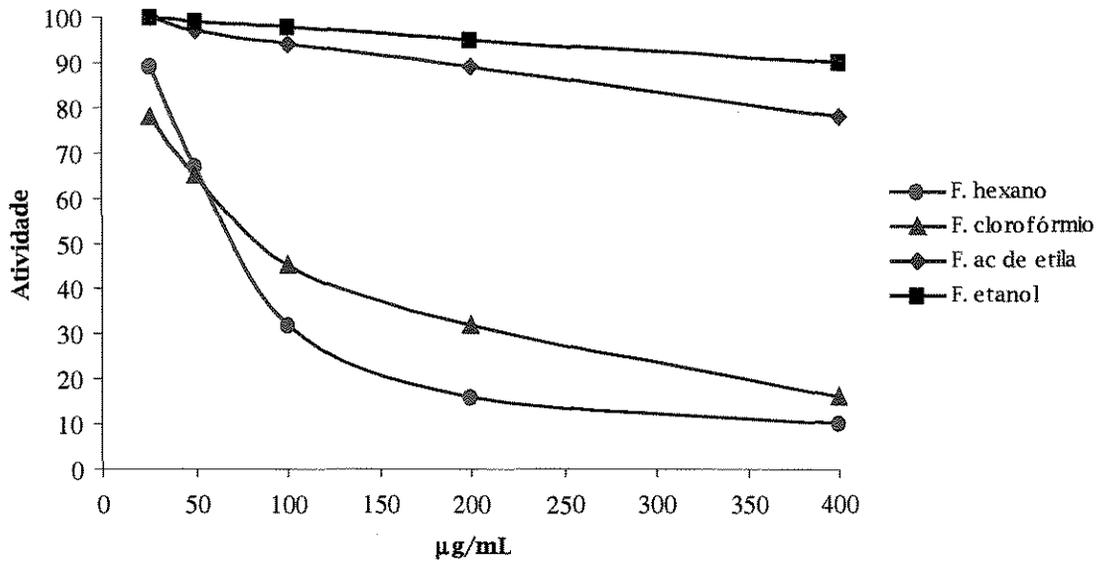


Figura 20 - Efeito das frações da própolis na atividade da GtFD em solução

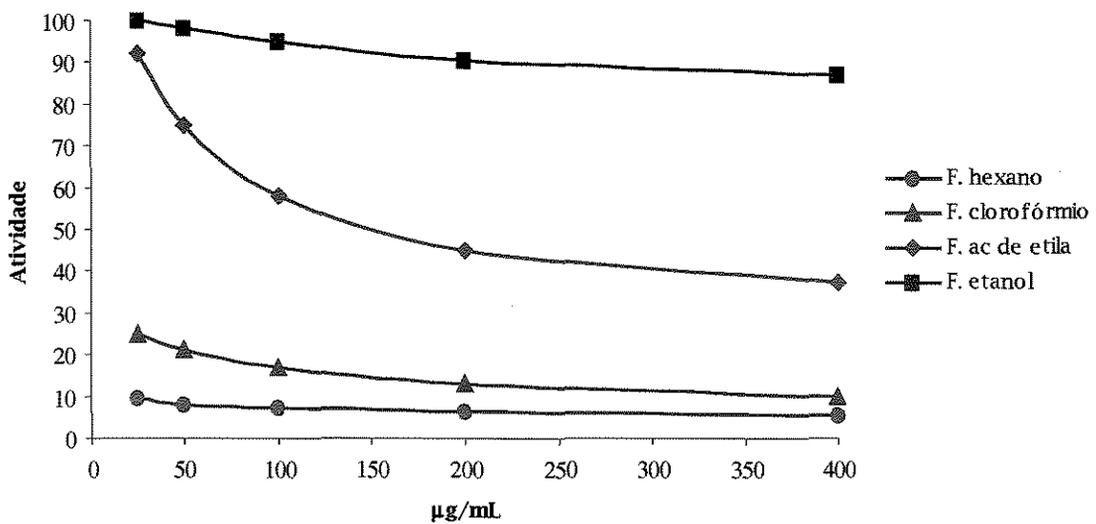


Figura 21 - Efeito das frações da própolis na atividade da GtFSs em solução.

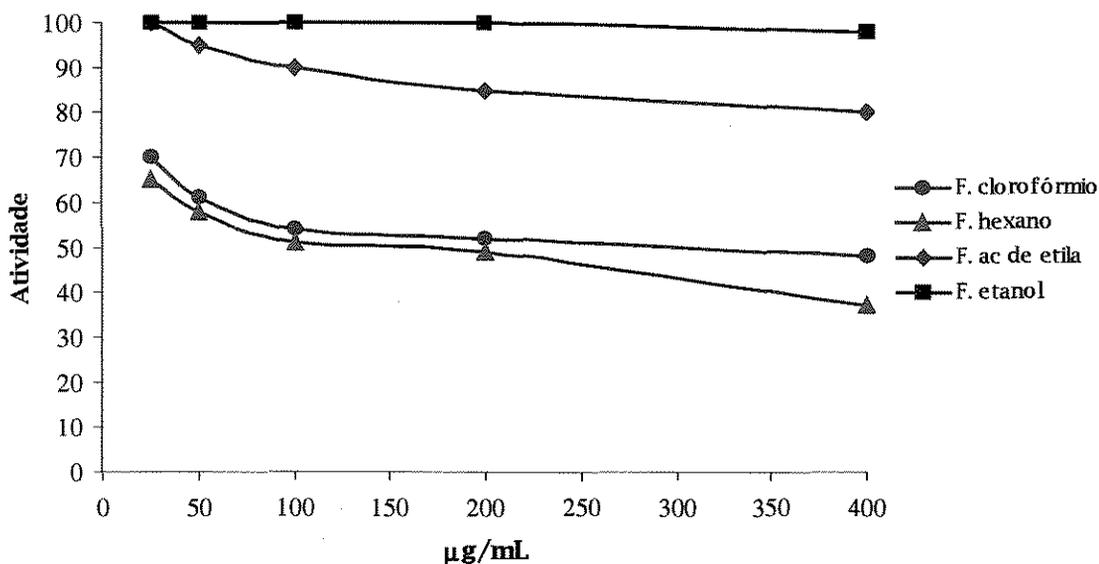


Figura 22 - Efeito das frações da própolis na atividade da GtfB aderida à superfície de hidroxiapatita.

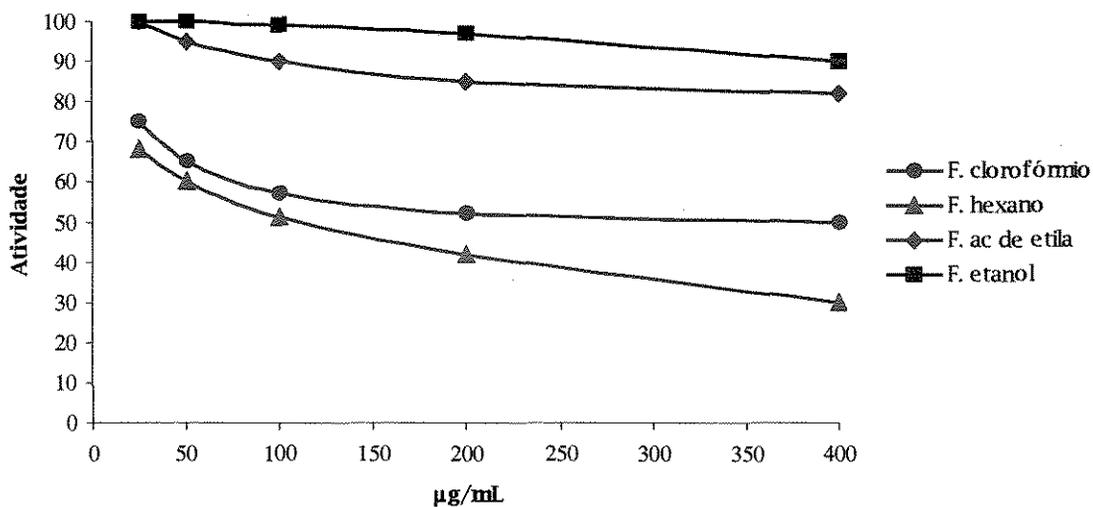


Figura 23 - Efeito das frações da própolis na atividade da GtfC aderida à superfície de hidroxiapatita.

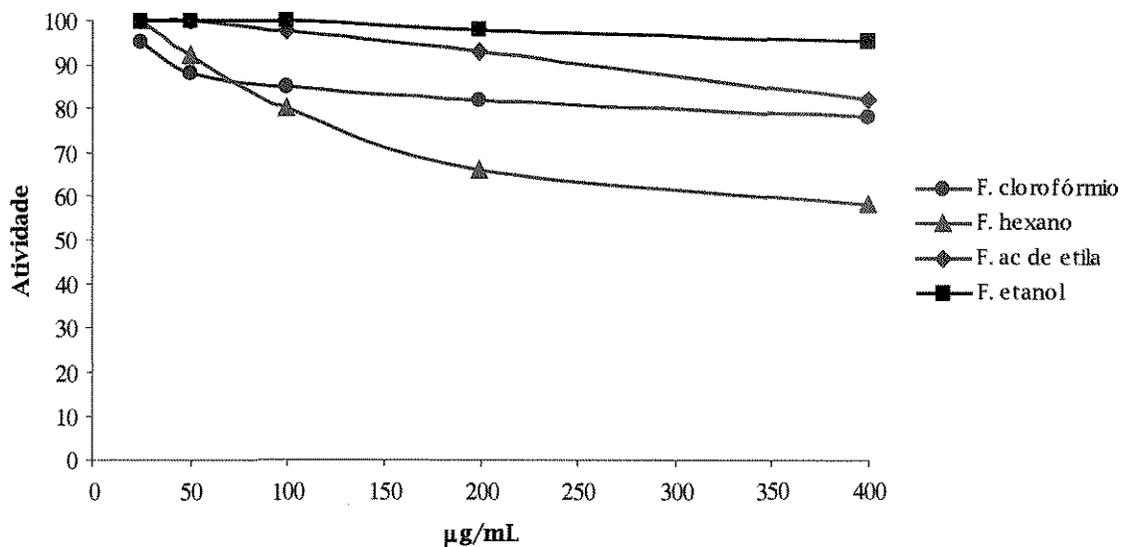


Figura 24 - Efeito das frações da própolis na atividade da GtfD aderida à superfície de hidroxiapatita.

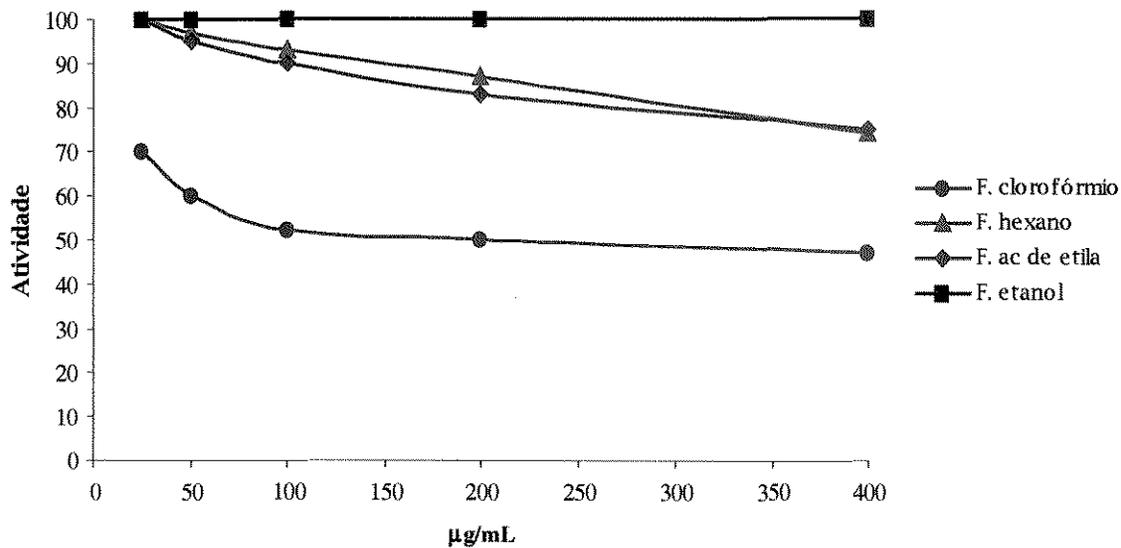


Figura 25 - Efeito das frações da própolis na atividade da GtfSs aderida à superfície de hidroxiapatita.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que o extrato etanólico de algumas própolis apresenta atividade antibacteriana (BONHEVI *et al.*, 1994; GRANGE & DAVEY, 1990; IKENO *et al.*, 1991; PARK *et al.*, 1998; STEINBERG *et al.*, 1996), assim como inibição da atividade das GTFs (PARK *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 2000a). Os flavonóides agliconas, até o momento, vêm sendo considerados como principais compostos ativos da própolis (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA *et al.*, 1982, 1996; GRANGE & DAVEY, 1990; BONHEVI *et al.*, 1994; KOO *et al.*, 1999), além de outros compostos, como os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres (IKENO *et al.*, 1991; AGA *et al.*, 1994; TAZAWA *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 1999) e os diterpenos (BANKOVA *et al.*, 1996; MITAMURA *et al.*, 1996).

A própolis proveniente da região de mata atlântica da Bahia, classificada como tipo 6, cuja composição química é diferente das própolis brasileiras relatadas até o momento, apresenta em sua composição, constituintes apolares e ausência dos flavonóides agliconas. No entanto, esta própolis tem demonstrado uma potente atividade antimicrobiana.

Em acréscimo, a composição desta amostra de própolis é bastante semelhante à da Venezuela (KOO *et al.*, 2000b), caracterizada pela presença de benzofenonas poliprenilados (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993).

Neste trabalho, os resultados das análises da atividade antibacteriana para o extrato etanólico dessa própolis bruta (EEP) demonstraram que a própolis do tipo 6 é um agente antimicrobiano bastante promissor, confirmando relatos da literatura (MOURA, 2000; KOO *et al.*, 2000b; ALENCAR *et al.*, 2001) e ampliando as informações já existentes, de que a própolis estudada, além das atividades antimicrobianas contra *S. aureus* e *S. mutans*, inibe o crescimento de estreptococos do grupo mutans em baixas concentrações, sendo bactericida para a maioria dos microrganismos testados.

Além disso, o EEP foi capaz de inibir o crescimento tanto de cepas de coleção quanto de microrganismos isolados recentemente de pacientes. Porém, houve diferença estatística entre as cepas, sugerindo a existência de comportamentos diferentes entre uma mesma espécie de microrganismo. Estes resultados podem ser considerados significativos, uma vez que a maioria dos estudos atuais utiliza cepas de coleção, que como foi demonstrado, não estão mais se comportando como cepas da mesma espécie, porém isoladas recentemente.

Analisando as frações desta própolis, observa-se que apenas as frações hexano e clorofórmio tiveram resultados significativos, demonstrando que os compostos biologicamente ativos têm características apolares. Em acréscimo, foi possível notar neste trabalho, a importância do

fracionamento da própolis, que, além de auxiliar numa possível identificação dos compostos ativos, permitiu um ganho de atividade, quando comparado ao extrato bruto, principalmente nos testes de inibição da atividade das GTFs.

O mecanismo de ação antimicrobiana da própolis ainda não está claro e, aparentemente, é bastante complexo, podendo resultar do efeito sinérgico de alguns compostos (BONHEVI *et al.*, 1994; AMOROS *et al.*, 1992a).

Os possíveis compostos biologicamente ativos que estejam modulando a atividade antibacteriana da própolis do tipo 6 ainda são desconhecidos. ALENCAR *et al.* (2001), identificaram nesta própolis benzofenonas poliisoprenilados, sendo que alguns trabalhos, como BAKANA *et al.* (1987) e LOKVAM *et al.* (2000), demonstraram que estes compostos apresentam um alto potencial antimicrobiano contra alguns tipos de bactérias e fungos. Entretanto não há relatos de estudos dos benzofenonas poliprenilados em relação às bactérias relacionadas à placa e cárie dental.

Além da atividade antimicrobiana, observou-se que o EEP e as frações hexano e clorofórmio inibiram a aderência bacteriana à superfície de vidro para a maioria dos microrganismos, em concentrações menores que a CIM. Esta capacidade de inibição de aderência é um indicativo da

provável inibição da atividade das GTFs, principalmente aquelas que produzem glucanos insolúveis em água (GTFB e GTFC).

Para confirmar esta hipótese, o EEP e as quatro frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol), foram analisados quanto à capacidade de inibir as GTFs purificadas, tanto em solução quanto aderidas à superfície de hidroxiapatita. Os resultados demonstraram que tanto o EEP quanto as frações hexano e clorofórmio foram capazes de inibir, em baixas concentrações, as GTFs testadas. Entretanto, as aderidas à superfície de hidroxiapatita mostraram-se mais resistentes. Isto está de acordo com trabalhos publicados por VACCA-SMITH & BOWEN (1998) e WUNDER & BOWEN (1999), que encontraram resultados semelhantes quando compararam GTFs em solução e aderidas, sugerindo que estas enzimas, quando aderidas, podem sofrer uma mudança conformacional, o que poderia levar a alterações de suas propriedades físicas e cinéticas (SHILLING & BOWEN, 1992; VENKITARAMAN *et al.*, 1995).

No entanto, a própolis analisada foi capaz de inibir as GTFs B e C, quando aderidas à superfície de hidroxiapatita, na ordem de 50 a 60%, sendo que as enzimas aderidas apresentam um papel primordial na aderência de *S. mutans* e *S. sobrinus* e, conseqüentemente, na formação e acúmulo de placa dental cariogênica. Além disso, as enzimas aderidas

demonstram maior resistência aos principais inibidores enzimáticos conhecidos (VACCA-SMITH & BOWEN, 1997; WUNDER & BOWEN, 1999).

Quanto aos tipos de GTFs analisados, O EEP e as frações apolares (hexano e clorofórmio) foram capazes de inibir os quatro tipos de GTFs, destacando-se a inibição das GTFs B e C em superfície, que são as GTFs responsáveis pela síntese de glucanos insolúveis (WUNDER & BOWEN, 1999), os principais responsáveis pela colonização e acúmulo de *S. mutans* e *S. sobrinus* na superfície dental (HAMADA & SLADE, 1980).

Além disso, a inibição da GTFC é de extrema importância, uma vez que este é o tipo de GTF predominante na superfície de apatita, tendo uma maior afinidade pela hidroxiapatita. Em acréscimo, embora o papel das GTFs D e Ss ainda não esteja claro, estas agem provavelmente como *primers* para outras GTFs (VACCA-SMITH & BOWEN, 1998).

Os resultados obtidos neste estudo *in vitro* demonstraram que a própolis do tipo 6, cujas características químicas são bastante particulares, pode ter um efeito biológico *in vivo* na prevenção da placa dental cariogênica e cárie dental. No entanto, são necessários estudos *in vivo* tanto em formação de placa quanto cárie para maiores esclarecimentos. Além disso, fica claro neste estudo que os compostos biologicamente ativos têm características apolares, sendo encontrados tanto na fração hexano quanto na clorofórmio, mostrando-se importante o isolamento e

identificação destes compostos, assim como a análise de seus possíveis mecanismos de ação.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados dos testes de difusão em ágar, CIM e CBM demonstram que o EEP da Bahia, região de mata atlântica (tipo 6) é um agente antimicrobiano natural bastante promissor.
- ✓ Verificou-se que as cepas de coleção *S. mutans* Ingbritt 1600 e *S. sobrinus* 6715 mostraram diferença no comportamento quando comparadas com cepas da mesma espécie porém isoladas recentemente.
- ✓ O EEP do tipo 6 é um potente inibidor de todas as GTFs analisadas, tanto em solução quanto aderidas à superfície de hidroxiapatita.
- ✓ Os compostos biologicamente ativos têm características apolares, sendo encontrados nas frações hexano e clorofórmio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGA, H. *et al.* Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosci Biotech Biochem**, Tokyo, v.58, p.945-946, 1994.
2. ALENCAR, S.M. *et al.* Evidências fitoquímicas da própolis da região de mata atlântica do estado da Bahia. **TecBahia: Revista baiana de tecnologia**, Camaçari, v.16, n.1, p.153-160, jan/abr 2001.
3. AMOROS, M. *et al.* In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, Paris, v.23, p.231-240, 1992a.
4. AMOROS M. *et al.* Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes-simplex virus type-1 in cell-culture - comparison with the antiviral activity of propolis. **J Nat Prod**, Columbus, v.55, n.12, p.1732-1740, Dec. 1992b.
5. AMOROS, M. *et al.* Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. **J Nat Prod**, Columbus, v.57, n.5, p.644-647, May 1994.
6. BAKANA, P. *et al.* Structure and chemotherapeutical activity of a polyisoprenylated benzophenone from the stem bark of *Garcinia huillensis*. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.21, n.1, p.75-84, Sept./Oct. 1987.
7. BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. High performance liquid chromatography analysis of flavonoids from propolis. **J Chromatogr**, Amsterdam, v.242, n.1, p.135-143, 1982.
8. BANKOVA, V.S. *et al.* Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, Paris, v.23, p.79-85, 1992.

9. BANKOVA, V.S. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z Naturforsch**, Tubingen, V.50c, n.3-4, p.167-172, Mar./Apr. 1995.
10. BANKOVA, V.S. *et al.* Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.**, Tubingen, v.51c, n.5-6, p.277-280, May/June 1996.
11. BANKOVA, V.S. *et al.* Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, Paris, v.29, n.4, p.361-367, 1998.
12. BANKOVA, V.S. *et al.* Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Z Naturforsch**, Tubingen, v.54c, n.5-6, p.401-405, May/June 1999.
13. BANSKOTA, A.H *et al.* Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **J Nat Prod**, Columbus, v.61, n.7, p.896-900, July 1998.
14. BANSKOTA, A.H *et al.* Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.72, n.1-2, p.239-246, Sept. 2000.
15. BONHEVI, J.S.; COLL, F.V.; JORDA, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **J Am Oil Chem Soc**, Chicago, v.71, p.529-532, 1994.
16. BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food Chem Toxicol**, Exeter, v.36, n.4, p.347-363, Apr. 1998.

17. BURNE, R.A. Desastres ecológicos na cavidade bucal: o papel dos polissacarídeos extracelulares de armazenagem a curto prazo *In*: BOWEN, W.H.; TABAK, L.A. **Cariologia para a Década de 90**. São Paulo: Santos, 1995. p.351-364.
18. CURY, J.A.; REBELLO, M.A.B.; DEL BEL CURY, A.A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, Basel, v.31, n.5, p.356-360, 1997.
19. CURY, J.A. *et al.* Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in presence of sucrose or glucose and fructose *in situ*. **Caries Res**, Basel, v.34, n.6, p.491-497, Nov./Dec. 2000.
20. DEBIAGGI, M *et al.* Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Microbiologica**, Bologna, v.13, n.3, p.207-213, July 1990.
21. DEREVICI, A.; POPESCO, A.; POPESCO, N. Biological properties of própolis. **Revue path comp**, v.2, n.1, p.21-4, 1965. *Apud* GHISALBERTI, E. L. Própolis: a review. **Bee World**, Bucks, v.60, p.59-84, 1979.
22. DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factor linking with cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J Dent Res**, Washington, v.67, n.6, p.890-895, June 1988.
23. FITZGERALD, R.J.; KEYES, P.H. demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.76, p.301-304, 1960. *Apud* GIBBONS, R.J. *Op. cit.* Ref. 28.

24. FRENKEL, K. *et al.* Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. **Cancer Res**, Baltimore, v.53, n.6, p.1255-1261, Mar. 1993.
25. GARCIA-VIGUEIRA, C.; GREENAWAY, W.; WHATLEY, F.R. Composition of propolis from two different Spanish regions. **Z. Naturforsch**, Tubingen, v.47c, p.634-637, 1992.
26. GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, Bucks, v.60, p.59-84, 1979.
27. GIBBONS, R.J. Adherence interactions that may affect microbial ecology in the mouth. **J Dent Res**, Washington, v. 63, n.3, p. 378-385, Mar. 1984.
28. GIBBONS, R.J. Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: A contribution of oral microbiology. **J Dent Res**, Washington, v.75, n.3, p.866-870, Mar. 1996.
29. GIBBONS, R.J.; BANGHART, S.B. Synthesis of extracellular dextran by cariogênico bacteria and its presence in human dental plaque. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.12, n.1, p.11-23, jan 1967. *Apud* GIBBONS, R.J. *Op. cit.* Ref. 28.
30. GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Ann Rev Microbiol**, Palo Alto, v.29, p.19-44, 1975.
31. GRANGE, J. M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J R Soc Med**, London, v.83, n.3, p.159-160, Mar. 1990.
32. GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis: A report of work at Oxford. **Bee World**, Bucks, v.71, p.107-118, 1990.

33. GREENAWAY, W. *et al.* Identification by gas chromatography - mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Z. Naturforsch.**, Tubingen, v.46, p.111-121, 1991.
34. GRUNDBERGER, D *et al.* Preferential citotoxicity on tumor cell by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, Basel, v.44, p.230-232, 1988.
35. HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J Dent Res**, Washington, v.63, p.407-411, 1980.
36. HAMADA, S. & TORII, M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. **Infect Immun**, Washington, v.20, n.3, p.592-599, June 1978.
37. HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J Dent Res**, Washington, v.63, n.3, p.407-411, Mar. 1984.
38. HANADA, S.; KURAMITSU, H.K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* gtfD gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infect Immun**, Washington, v.57, n.7, p.2079-2085, July 1989.
39. HARISH, Z. *et al.* Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. **Drugs Exp Clin Res**, Geneva, v.23, p.89-96, 1997.
40. HAVSTEEN, B. **Biochem Pharmacol**, v.32, n.7, p.1141, apr 1983. *Apud* BONHEVI, J.S.; COLL, F.V.; JORDA, R.E. *Op. cit.* Ref. 15.

41. IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res**, Basel, v.25, n.5, p.347-351, 1991.
42. JAUBERT, G.F. Origin of colour of beeswax and the composition of propolis. **C R Hebd Séanc Acad Sci**, Paris, v.184, p.1134-1136, 1926. *Apud* GHISALBERTI, E.L. *Op. cit.* Ref. 26.
43. JENKINSON, H.F.; LAMONT, R.J. Streptococcal adhesion and colonization. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.8, p.175-200, 1997.
44. KIVALINA, B.P. **Pchelovodstvo**, v.10, 1948. *Apud* GHISALBERTI, E. L. Própolis: a review. **Bee World**, Bucks, v.60, p.59-84, 1979.
45. KOHLER, B.; ANDREEN, I.; JONSSON, B. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and lactobacilli in their children. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.29, n.11, p.879-883, 1984.
46. KOLENBRANDER, P.E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Ann Rev Microbiol**, Palo Alto, v.42, p.627-656, 1988.
47. KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, Bucks, v.66, p.136-139, 1985.
48. KOO, H.; PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Biosci Biotech Biochem**, Tokyo, v.61, p.367-369, 1997.
49. KOO, H. *et al.* Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res**, Basel, v.33, n.5, p.393-400, Sept./Oct. 1999.

50. KOO, H. *et al.* Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. **Caries Res**, Basel, v.34, n.5, p.418-426, Sept./Oct. 2000a.
51. KOO, H. *et al.* Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Curr Microbiol**, New York, v.41, n.3, p.192-196, Sept. 2000b.
52. KOO, H. *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.45, n.2, p.141-148, Feb. 2000c.
53. KRASSE, B. The proportional distribution of *Streptococcus salivarius* and other streptococci in various parts of the mouth. **Odontol Revy**, Lundy, v.5, p.203-211, 1965. *Apud* GIBBONS, R.J. *Op. cit.* Ref. 28.
54. KUJUMGIEV, A. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.64, n.3, p.235-240, Mar. 1999.
55. LAVIE, P. Étude de substance antibiotiques présentés chez *Apis mellifica* et chez quelques insects sociaux. **C R Acad Sci**, Paris, v.244, p.2653-2655, 1958. *Apud* GHISALBERTI, E.L. *Op. Cit.* Ref. 26.
56. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
57. LOKVAM, J. *et al.* Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Phytochemistry**, Oxford, v.55, n.1, p.29-34, Sept. 2000.

58. MARSH, P.D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J Dent Res**, Washington, v.71, n.7, p.1431-1438, July 1992.
59. MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Z Naturforsch**, Tübingen, v.50c, p.93-97, 1995.
60. MATSUNO, T. *et al.* Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Res**, Athens, v.17, n.5a, p.3565-3568, Sept./Oct. 1997a.
61. MATSUNO, T. *et al.* Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Z Naturforsch**, Tübingen, v.52c, n.9-10, p.702-704, Sept./Oct. 1997b.
62. METZNER, J. *et al.* Bioautographische erfassung der antimikrobiell wirksamen inhaltsstoffe von propolis. **Pharmazie**, Berlin, v.30, p.799-800, 1975. *Apud* IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. *Op. citi.* Ref. 41.
63. MITAMURA, T. *et al.* Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. **Anticancer Res**, Athens, v.16, n.5A, p.2669-2672, Sept./Oct. 1996.
64. MONTI, M. *et al.* Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v.9, p.163, 1983.
65. MOURA, F.F. **Determinação das propriedades físico-químicas e biológicas da própolis produzida por *Apis mellifera* na região nordeste do Brasil.** Campinas, 2000. 69p. [Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].

66. NEWBRUN, E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. **Odontol Revy**, Lundy, v.18, n.4, p.373-386, 1967.
67. PARK, Y.K. *et al.* Investigations of the flavonoid aglycones of propolis collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Arq Biol Tecnol**, Curitiba, v.40, p.97-106, 1997.
68. PARK, Y.K. *et al.* Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr Microbiol**, New York, v.36, n.1, p.24-28, Jan. 1998.
69. PARK, Y.K. *et al.* Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honey Bee Sci**, Tamagawa, v.21, n.2, p.85-90, 2000.
70. PHILLIPS, I. A guide to sensitivity testing. Report of the working on antibiotic sensitivity testing of the British Society for Antimicrobial Chemoterapy **J Antimicrob Chemother**, London, v.27, p.1-50, June 1991. [Suppl. D]
71. PIDDOCK, L.J. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v.68, n.4, p.307-318, Apr. 1990.
72. POPRAVKO, S.A.; GUREVICH, A. I.; KOLOSOV, M. N. Flavonoid components of propolis. **Khimlya Prir Soedin**, v.5, n.6, p.476-82, 1969. *Apud* GHISALBERTI, E.L. *Op. Cit.* Ref. 26.
73. RAO, C.V. *et al.* Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. **Cancer Res**, Baltimore, v.53, n.18, p.4182-4188, Sept. 1993.

74. RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.23, n.2-3, p.127-149, July/Aug. 1988.
75. RÖLLA, G. *et al.* Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth *in vivo*. *In*: DOYLE, R.J. & CIARDI, J.E. (ed.) **Glucosyltransferases, glucans, sucrose, and dental caries**. Washington, IRL Press, p.21-30, 1983. [Chemical Senses, Sp. Suppl.].
76. ROUBIK, D.W. Ecology and natural history of tropical bees. **Cambridge University Press**, New York, 1989. *Apud* RUBIO, O.C. *et al.* *Op. cit.* Ref. 76.
77. RUBIO, O.C. *et al.* A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **J Nat Prod**, Columbus, v.62, n.7, p.1013-1015, July 1999.
78. RUSSEL, R.R.B. The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. **Caries Res**, Basel, v.28, n.2, p.69-82, 1994.
79. SCHILLING, K.M. & BOWEN, W.H. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, Washington, v.60, n.1, p.284-295, Jan. 1992.
80. SCHELLER, S. *et al.* Biological properties and clinical application of propolis.VI. Investigation of the influence of ethanol extracts of propolis (EEP) on cartilaginous tissue regeneration. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v.27, p.2138-2140, 1977.
81. SERKEDJIEVA, J.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V. Antiinfluenza virus effect of some propolis constituents and their analogs (esters of substituted cinnamic-acids). **J Nat Prod**, Columbus, v.55, n.3, p.294-302, Mar. 1992.

82. SFORCIN, J.L. *et al.* Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.73, n.1-2, p.243-249, Nov. 2000.
83. SNYDER, L.R. & KIRKLAND, J.J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**, 2ª edição, John Wiley & Sons, New York, 1979 *Apud* COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. ed. Campinas: Ed Uni, 1995. p.270-271.
84. STEINBERG, D.; KAINE, G.; GEDALIA, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. **Am J Dent**, San Antonio, v.9, n.6, p.236-239, Dec. 1996.
85. TANZER, J.M.; FEEDMAN, M.L.; FITZGERALD, R.J. Virulence of mutants defective in glucosyltransferase, dextran-mediated aggregation, or dextranase activity. *In*: MERGENHAGEN, S.E. & ROSAN, B. **Molecular basis of oral microbial adhesion**. Washington, p.204-211, 1985.
86. TAZAWA, S. *et al.* Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chem Pharm Bull**, Tokyo, v.46, p.1477-1479, 1998.
87. TOMÁS-BARBERÁN, F. A. *et al.* Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Oxford, v.34, n.1, p.191-196, 1993.
88. VACCA-SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite, and bacterial surfaces. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.43, n.2, p.103-110, Feb. 1998.

89. VACCA-SMITH, A.M. *et al.* Interactions of streptococcal glucosyltransferases with α -amylase and starch on the surface of saliva-coated hydroxyapatite. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.41, n.3, p.291-298, Mar. 1996.
90. VAN HOUTE, J. Role of of microorganisms in the caries etiology. **J Dent Res**, Washington, v.73, n.3, p.672-681, Mar. 1994.
91. VAN HOUTE, J.; GREEN, D.B. Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization o teeth in humans. **Infect Immun**, Washington, v.9, n.4, p.624-630, Apr. 1974.
92. VENKITARAMAN, A.R. *et al.* Characterization of glucosyltransferase B, GtFC, and GtFD in solution and the surface of hydroxyapatite. **J Dent Res**, Washington, v.74, n.10, p.1695-1701, Oct. 1995.
93. VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z.A Comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, Stuttgart, v.7, n.1, p.1-6, Mar. 2000.
94. WUNDER, D. & BOWEN, W.H. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.44, n.3, p.203-214, Mar. 1999.