

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS (*Apis mellifera*):
CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA.

Bolsista: Lucianne Franco de Lima, CNPq

MANAUS
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-S/0036/2009
EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS (*Apis mellifera*):
CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA.

Bolsista: Lucianne Franco de Lima, CNPq
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fulgência Costa Bandeira

MANAUS
2010

Resumo

A própolis consiste numa substância resinosa coletada, transformada e utilizada pelas abelhas com o propósito de selar orifícios presentes nas colméias, vedando a parede interna da mesma e protegendo-a contra a entrada de intrusos. Segundo relatos da literatura, a própolis tem sido utilizada como produto medicinal desde 300 a.C. apresentando como características biológicas: atividade anticancerígena, antioxidante, antiinflamatória, antibiótica e antifúngica. O presente estudo visou obter o extrato aquoso de própolis nas concentrações de 0,1%, 1% e 10% e realizar controle de qualidade e estabilidade microbiológica com o objetivo de avaliar a viabilidade de, a partir deste extrato, ser formulado um enxaguatório bucal. As amostras de propolis foram coletadas no município de Presidente Figueiredo, no estado do Amazonas, identificado e transportado para o laboratório de pesquisa da faculdade de odontologia da UFAM para a preparação dos extratos. Os resultados da avaliação microbiológica, estabilidade, densidade e sedimentação foram tabulados e descritos pela estatística descritiva. Os dados mostraram que a amostra estudada encontra-se dentro dos parâmetros exigidos pelo ministério da agricultura para os valores de fenóis e flavonóides totais, apresentando condições de estabilidade e qualidade do produto. Diante destes fatos observou-se a viabilidade da formulação de um enxaguatório bucal para controle do biofilme dental, no entanto, estudos complementares necessitam ser realizados.

DESCRITORES: própolis, flavonóides, compostos fenólicos.

Abstract

The propolis is a resinous substance collected, processed and used by bees with purpose of saddle holes present in beehives, sealing the inner wall of the same and protecting it against outside intruders. According to reports in literature, propolis has been used as medicinal product since 300 a.C . presenting as biological characteristics: activity anticancer, antioxidant, anti-inflammatory, antibiotics and antifungal. This study aimed to obtain the aqueous extract of propolis in concentrations of 0.1%, 1% and 10% and perform quality control, microbiological stability with the objective of evaluating the feasibility of, from this extract, be formulated mouthwash. Samples of propolis were collected in the city of Presidente Figueiredo, Amazonas State, identified and transported to research laboratory of faculty of dentistry of UFAM for preparation of suspensions. The results of microbiological evaluation, stability, density and sedimentation were tabulated and described using descriptive statistics. The data showed that the sample studied is within the parameters required by the ministry of agriculture for the values of phenols and total flavonoids, presenting conditions of stability and quality of the product. Given these facts pointed to the feasibility formulating a mouthwash for the control of dental biofilm, however, additional studies need to be made.

DESCRIPTORS: propolis, flavonoids, phenolic compounds.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ❖ °C: graus Celsius
- ❖ μL : microlitros
- ❖ A-S: Agar Sabouraud
- ❖ B: brilho
- ❖ BP: Baird-Parker
- ❖ et al.: e outros (abrev. de “ et alli”)
- ❖ EEP: extrato etanolico de propolis.
- ❖ h: horas
- ❖ mm: milímetros
- ❖ M-H: Miller-hinton
- ❖ PCA: Plaque Count Agar
- ❖ rpm: rotação por minuto
- ❖ *L. casei*: *Lactobacillus casei*
- ❖ *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*
- ❖ *S. mutans*: *Streptococcus mutans*
- ❖ SAP: *suspencoes aquosa de própolis.*
- ❖ T0: Tempo inicial
- ❖ T1: Tempo após sete dias
- ❖ T2: Tempo após 15 dias
- ❖ T3: tempo após 30 dias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 e 2- Própolis in natura retirada da melgueira.....	20
Figura 3- propolis coletada.....	20
Figura 4 - Pilão e cadinho de porcelana utilizado na trituração da própolis.....	20
Figura 5 - Amostra sob agitação em banho de água termostatizada.....	22
Figura 6 - Sobrenadante – EEP.....	22
Figura 7 - Tubos de ensaio com 5mL de EEP.....	22
Figura 8 - Centrivap Concentrator da Labconco.....	22
Figura 9 - Béquer com “Pasta de Própolis”.....	23
Figura 10 - As três Suspensões Aquosas de Própolis finalizadas. (8A) 0,1%, (8B) 1,0% e (8C) 10,0%.....	23
Figura 11 - SAP a 0,1%, 1% e 10%.....	23
Figura12- Obtendo o valor do pH do extrato.....	24
Figura 13- Extrato após processo de centrifugação.....	25
Figura 14- Branco do sistema e solução de própolis pronta para leitura.....	25
Figura 15- Microplaca após adição do carbonato de sódio.....	29
Figura 16- microplaca após adição do carbonato de sódio.....	30
Figura 17– placas com presença e ausência de crescimento de microorganismos.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores para pH e densidade.....	32
TABELA 2: Resultado das análises de fenóis e flavonóides e limites estabelecidos pelo Ministerio da Agricultura.....	34
TABELA 3: contagem de microorganismos totais T0.	35
TABELA 4: contagem total de microorganismos T1.....	35
TABELA 5: contagem de microorganismos totais T2.....	36
TABELA 6: contagem de microorganismos totais T3.....	36

SUMÁRIO

1. Introdução	8
2. Objetivos	10
2.1 Geral	10
2.2 Específicos	10
3. Revisão de literatura	11
4. Materiais e Métodos	19
4.1. Obtenção da matéria-prima	19
4.1.1 Coleta das amostras de própolis da <i>Apis mellifera</i>	19
4.1.2 Tratamento das amostras de própolis <i>In Natura</i>	20
4.1.3 Obtenção do extrato etanólico de própolis	21
4.1.4 Obtenção das Suspensões de Própolis a 0,1%, 1% e 10%	21
4.2 Caracterização do extrato	23
4.2.1. Teste de pH.	23
4.2.2. Teste de sedimentação	23
4.2.3. Determinação da densidade do extrato de própolis	24
4.2.4. Estudo da estabilidade do extrato	25
4.2.5. Avaliação microbiológica	25
4.2.5.1. Preparo dos meios de cultura	26
4.2.5.2. Preparo e semeadura do inóculo	26
4.2.6. Perda por dessecação a 105°C	27
4.2.7. Teor de flavonóides totais	27
4.2.8. Teor de fenóis totais	28
6. Resultados e Discussão	30
7. Conclusão	39
8. Cronograma	40
9. Referências	41

1.Introdução

A própolis consiste numa substância resinosa coletada, transformada e utilizada pelas abelhas com o propósito de selar orifícios presentes nas colméias, vedando a parede interna da mesma e protegendo-a contra a entrada de intrusos. Segundo relatos da literatura, a própolis tem sido utilizada como produto medicinal desde 300 a.C. (GHISALBERTI, 1979) apresentando como características: atividade anticancerígena, antioxidante, antiinflamatória, antibiótica e antifúngica (BURDOCK, 1998; BANSKOVA et al. 2001; MARCUCCI, 1995). Algumas outras propriedades biológicas e farmacológicas tem sido observada como por exemplo regeneração óssea e da polpa dental (RAMOS; MIRANDA, 2007).

A própolis apresenta aroma característico, cor variando entre amarelada, esverdeada clara ao pardo escuro e consistência também variada, dependendo da sua origem botânica. Coletada pelas abelhas *Apis mellifera* em diferentes pontos das plantas: broto, botões florais e exsudatos resinosos, sendo transportadas até a colméia, onde são acionadas e modificadas em sua composição, através de secreções próprias das abelhas, como cera e secreções salivares essenciais ou, ainda, sendo resultante do processo de digestão do pólen (GHISALBERTI, 1979).

Mais de trezentas substâncias foram identificadas, com predominância de flavonóides (flavonas, flavonóis, flavanonas) das quais se destacam: galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, campferol e quercetina, bem como os aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzóico) e alguns oligoelementos, tais como: alumínio, vanádio, ferro, cálcio, silício, manganês, estrôncio, e vitaminas B1, B2, B6, e C (BANKOVA et al., 1998; BANKOVA et al., 2000; MARCUCCI et al., 2001). Destes, os flavanóides podem ser considerados os principais compostos, encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus

ésteres, aldeídos fenólicos e seus ésteres, álcoois e cetonas (BANKOVA et al.,1983; BANKOVA et al., 1992).

A própolis é um potencial antiinflamatório de baixo custo atuando nos estágios agudos e crônicos. Estudos em ratos e coelhos tem mostrado que soluções hidro-alcoólicas de própolis possuem atividade antiinflamatória, seja pela administração tópica, injetável ou mesmo uso oral (RAMOS; MIRANDA, 2007).

Ota et al. (2001) avaliaram a atividade antifúngica da própolis através de testes de sensibilidade, utilizando 75 espécies de *Candida*: 20 *Candida albicans*, 20 *Candida tropicalis*, 20 *Candida krusei* e 15 *Candida guilliermondii*. As amostras apresentaram atividade antifúngica em ordem decrescente: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*. Afirmaram também, que pacientes portadores de prótese total que utilizaram o extrato hidroalcoólico de própolis apresentaram diminuição na quantidade de *Candida* sp.

Ishida (2006) avaliou *in vitro* a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis coletadas em apiários do estado do Amazonas sobre culturas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius*. Os resultados demonstraram a presença de compostos fenólicos. Os extratos etanólicos testados apresentaram atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*.

Sendo assim, nos propomos a obter o extrato de própolis nas concentrações de 0,1%, 1% e 10%, realizar controle de qualidade dos mesmos com o objetivo de avaliar a viabilidade, a partir deste extrato, para a formulação de um enxaguatório bucal no futuro.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar características sensoriais, requisitos físico-químicos, teor de fenóis totais, teor de flavonóides, contaminantes, estabilidade microbiológica de extrato de própolis.

2.2 Específicos

1. Preparar do extrato aquoso da própolis em diferentes concentrações, a partir da própolis bruta de forma que seus constituintes sejam preservados para que suas atividades farmacológicas, até então conhecidas sejam conservadas.
2. Fixar identidade da própolis, segundo análises sensoriais preconizadas pelo ministério da saúde.

3. Revisão de literatura

Própolis é o termo genérico utilizado para denominar um material resinoso coletado pelas abelhas de várias fontes. O nome própolis é derivado do grego *pro*, em defesa de, e *polis* a cidade, o que quer dizer “em defesa da cidade ou da colméia”. As abelhas, de fato usam esta substância para protegê-las contra insetos e microorganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colméia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (DEBUYSIER, 1983). Costuma-se encontrar na colméia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação (GOJMERAC,1980).

Do aspecto etnofarmacológico, a própolis é um dos poucos "remédios naturais" que vêm sendo utilizados por um longo período de tempo por diferentes civilizações (CASTALDO & CAPASSO, 2002).

Ao longo da história, o homem aprendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Das várias formas de utilização destacam-se as plantas brutas (ex.: ervas) além das tradicionais preparações Galênicas (ex.: extratos). Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis administrada sob diversas formas (PEREIRA *et al*, 2002).

Segundo relatos da literatura, a própolis tem sido utilizada como produto medicinal desde 300 a.C. (GHISALBERTI, 1979) apresentando como características: atividade anticancerígena, antioxidante, antiinflamatória, antibiótica e antifúngica (BURDOCK, 1998; BANSKOVA *et al*. 2001; MARCUCCI, 1995). Além disso, sabe-se que apesar deste produto poder apresentar algumas reações alérgicas, ele é relativamente não tóxico (DOS SANTOS *ET AL*, 2003).

A própolis apresenta aroma característico, cor variando entre amarelada, esverdeada clara ao pardo escuro e consistência também variada, dependendo da sua origem botânica. Coletada pelas abelhas *Apis mellifera* em diferentes pontos das plantas: broto, botões florais e exsudatos resinosos, sendo transportadas até a colméia, onde são acionadas e modificadas em sua composição, através de secreções próprias das abelhas, como cera e secreções salivares essenciais ou, ainda, sendo resultante do processo de digestão do pólen (GHISALBERTI, 1979). As características da própolis variam conforme a espécie vegetal visitada pelas abelhas, bem como o clima predominante; ou seja, sua cor, sabor, odor, consistência, composição química e sua atividade biológica dependem das procedências das espécies vegetais e das estações do ano (MARCUCCI, 1995).

Segundo a CONAPIS (órgão de informação da CONAP, Conselho Nacional de Apicultura Ltda), a própolis ideal é aquela produzida em regiões onde exista o mínimo possível de poluição ambiental, longe dos centros urbanos e de fábricas que emitam poluentes.

A própolis possui uma composição complexa, formada por material gomoso e balsâmico, coletado pelas abelhas de brotos e exsudatos de árvores e de outras partes do tecido vegetal e modificados na colméia por adição de secreções salivares e cera (NIKOLAEV, 1978). A própolis recolhida de uma colméia de abelhas, também conhecida como própolis bruta, apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (MONTI *et al.*, 1983; CIRASINO *et al.*, 1987). Além de micro-elementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (GHISALBERTI, 1979).

A composição de uma própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA *et al.*, 2004). Entretanto, a

composição da própolis também varia sazonalmente em uma mesma localidade (SFORCIN *et al.*, 2000). Variações na composição também foram observadas entre amostras de própolis coletadas em uma mesma região, por diferentes raças de *A. mellifera* (SILICI & KUTLUCA, 2005). Não só a composição química da própolis é determinada pelas características da vegetação da região, mas também as reservas de pólen e mel. Como consequência desta composição química diferenciada da própolis, ocorre também uma variação nas suas atividades farmacológicas (MENEZES, 2005).

Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas. Mais de trezentas substâncias foram identificadas, com predominância de flavonóides (flavonas, flavonóis, flavanonas) das quais se destacam: galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, campferol e quercetina, bem como os aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzóico) e alguns oligoelementos, tais como: alumínio, vanádio, ferro, cálcio, silício, manganês, estrôncio, e vitaminas B1, B2, B6, e C (BANKOVA *et al.*, 1998; BANKOVA *et al.*, 2000; MARCUCCI *et al.*, 2001).

De todos esses grupos de compostos, certamente o que mais vem chamando a atenção dos pesquisadores é o dos flavonóides (HAVSTEEN, 2002). Os flavonóides são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (BEECHER, 2003; MANACH *et al.*, 2004). A presença e a concentração destes compostos são utilizadas como índice de qualificação de amostras de própolis (LU *et al.*, 2004). A ingestão de flavonóides interfere em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, atuando nos processos de cicatrização como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune (WILLIAMS *et al.*, 2004). Apesar de os flavonóides serem os componentes da própolis mais

extensivamente estudados, eles não são os únicos responsáveis pelas suas propriedades farmacológicas. Diversos outros compostos têm sido relacionados com as propriedades medicinais da própolis (AWALE *et al.*, 2005).

Vários trabalhos têm sido publicados divulgando e revisando as propriedades biológicas da própolis como a antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoária, antioxidante e antiviral (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998) antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, anticariogênica e algumas outras propriedades biológicas e farmacológicas tem sido observada como, por exemplo, regeneração óssea e da polpa dental (RAMOS; MIRANDA, 2007).

A própolis é um potencial antiinflamatório de baixo custo atuando nos estágios agudos e crônicos. Suas propriedades são usualmente aplicadas para inflamações musculares e nas articulações, bem como para outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções. Estudos em ratos e coelhos tem mostrado que soluções hidro-alcoólicas de própolis possuem atividade antiinflamatória, seja pela administração tópica, injetável ou mesmo uso oral. Algumas substâncias antiinflamatórias encontradas no própolis já foram isoladas. Essas substâncias são o ácido cafeico, quercetin, naringenin, e ácido cafeico fenetil ester. Estes componentes contribuem para a supressão da síntese de prostaglandinas e leucotrienos por macrófagos e tem efeito inibitório da atividade das mieloperoxidases, NADPH-oxidase, ornitina decarboxilase e tyrosine-proteína-kinase. Também se atribue a atividade antiinflamatória da própolis a outros componentes, incluindo ácido salicílico, apigenin, ácido ferulico e galangin. (RAMOS; MIRANDA, 2007).

Ota *et al.* (2001) avaliaram a atividade antifúngica da própolis através de testes de sensibilidade, utilizando 75 espécies de *Candida*: 20 *Candida albicans*, 20 *Candida tropicalis*, 20 *Candida krusei* e 15 *Candida guilliermondii*. As amostras apresentaram atividade antifúngica em ordem decrescente: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C.*

guilliermondii. Afirmaram também, que pacientes portadores de prótese total que utilizaram o extrato hidroalcoólico de própolis apresentaram diminuição na quantidade de *Candida* sp.

Longhini et al. (2007) avaliaram a atividade antifúngica de própolis através da obtenção de extrato sob diferentes condições testando frente a leveduras isoladas de onicomioses, que são infecções de difícil e longo tratamento e que causam efeitos indesejáveis ao paciente. As amostras de própolis foram coletadas das colméias de abelhas *Apis mellifera* L., na Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (FEI-UEM). Todos os extratos alcoólicos e os glicólicos apresentaram atividade antifúngica, sendo o extrato etanólico mais eficiente que o extrato glicólico.

Fierro (2000) demonstrou que pacientes com feridas superinfetadas, quando tratados localmente com própolis e um antibiótico sistêmico, apresentavam melhor evolução que os pacientes tratados apenas com o antibiótico.

Vargas et al. (2004) avaliaram a ação antibacteriana da própolis através da inoculação de placas de ágar BHI contendo 5% de extrato alcoólico de própolis a 50% em solução de álcool etílico 96°GL, com inóculo bacteriano de 1×10^6 células/mL⁻¹. Testaram 161 isolados bacterianos, Gram-positivo e Gram-negativo. Observaram que os isolados foram sensíveis ao extrato, pois não ocorreu crescimento bacteriano na placa após 72 horas de incubação a 72°C. O extrato alcoólico de própolis a 50% avaliado foi capaz de exercer ação antibacteriana efetiva contra a maioria dos isolados testados, inibindo o crescimento de 67,70% das amostras de *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Rhodococcus equi*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosas* avaliadas. As bactérias Gram positivas mostraram-se mais sensíveis (92,6%) ao extrato testado do que as Gram negativas (42,5%). Dentre as bactérias avaliadas, *Nocardia asteroides* foi a bactéria Gram positiva mais sensível (100%) e *Pseudomonas aeruginosas* a Gram negativa que apresenta maior sensibilidade (72,41%) ao extrato de própolis.

Gonzales et al. (2006) avaliaram a atividade antibacteriana de própolis coletada em diferentes regiões do Brasil com amostras dos estados de Goiás, Paraná e São Paulo, e suas concentrações de flavonóides. Extratos etanólicos foram preparados (30g de própolis em 70% de etanol), testando sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Ampicilina e tetraciclina foram utilizadas como controle. Os resultados mostraram que o Extrato etanólico de própolis inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, mas não para a *Escherichia coli*. Tetraciclina e Ampicilina mostraram-se eficazes para ambas as bactérias. A concentração de flavonóides foi variável, de acordo com a amostra de própolis. Os resultados do trabalho mostraram que o extrato etanólico de própolis tem uma efetiva ação contra bactérias Gram positivas, independente da origem geográfica, e uma positiva correlação entre atividade antibacteriana e concentração de flavonóides.

Ishida (2006) avaliou *in vitro* a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis coletadas em apiários do estado do Amazonas sobre culturas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius*. Análises como reações de identificação para hidróxidos fenólicos, espectrofotometria U.V., espectrofotometria infravermelho, cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas. Os resultados demonstraram a presença de compostos fenólicos. Os extratos etanólicos testados apresentaram atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*. As características dos espectros de absorção das amostras estudadas na análise com espectrofotômetro U.V. foram similares, correspondente a benzenos substituídos, ou seja, de substâncias aromáticas do tipo compostos fenólicos, sendo uns dos principais compostos com atividade biológica.

Almeida et al. (2006) avaliaram uma solução anti-séptica à base de extrato de própolis sobre os índices clínicos e contagem de *Streptococcus mutans*. Confeccionaram uma solução

para bochecho à base de própolis (6,25%) a partir da concentração inibitória mínima, sendo considerada a solução teste, e compararam-na ao controle positivo: clorhexidina (0,12%). Através de um ensaio clínico cruzado, quinze crianças utilizaram a solução teste durante 15 dias consecutivos, e, com intervalo de 21 dias, realizaram bochechos com clorhexidina. Foram coletados os índices para acúmulo de biofilme oral e doença gengival antes e 24 horas após o uso das soluções. Realizou-se a contagem de *S. mutans* de amostras da saliva nos seguintes períodos: antes e 24 horas, 07 dias, 15 dias e 21 dias depois do final de ambos os bochechos. Os resultados indicaram que a solução de própolis apresentou satisfatória atividade antimicrobiana semelhante à ação da clorhexidina, atuando na presença de biofilme oral e doença gengival.

Em Gebara et al. (2002) a atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontopatogênicas foi investigada através de testes *in vitro*. As cepas bacterianas testadas foram: *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada usando-se o método de diluição do extrato de própolis no meio de cultura em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram CIM de 1 µg/mL para *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Capnocytophaga gingivalis*; e 0,25 µg/mL para *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Alguns microrganismos que desempenham *in vivo* papel de superinfectantes também foram testados: a susceptibilidade de *Candida albicans* ao extrato etanólico de própolis foi observada na concentração de 12 µg/mL. A CIM para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (tipo selvagem) foi de 14 µg/mL. Todos os patógenos periodontais e microrganismos superinfectantes testados foram sensíveis ao extrato de própolis testado. Os

resultados obtidos encorajam a realização de novos estudos com esse extrato de própolis, para avaliar sua utilização como coadjuvante ao tratamento periodontal.

Ikeno; Miyazawa (1991) demonstraram em ratos a eficácia da própolis na inibição do crescimento da microbióta cariogênica, especificamente os estreptococos do grupo mutans, os quais estão fortemente associados com o início do processo da cárie dentária. Ratos inoculados com os estreptococos do grupo mutans apresentaram 50% das fissuras cariadas nos dentes. Nos ratos submetidos ao uso da própolis as cáries de fissuras nos dentes, foi significativamente menor ($p=0.01$). Este mesmo estudo utilizou a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e a análise indicou, que os compostos presentes, ácido cafeico e ácido cinâmico, estariam supostamente relacionados com a atividade anti-estreptococos do grupo mutans, e conseqüentemente, com a atividade anticariogênica da própolis.

Toker et al. (2008) avaliaram o efeito da utilização da própolis na perda óssea alveolar em periodontite experimental induzida por ligaduras em 40 ratos wistar divididos em 4 grupos experimentais. 10 ratos sem ligadura, 10 ratos apenas com ligaduras, 10 ratos com ligaduras e administração sistêmica de própolis com dose de 100mg/kg e 10 ratos com ligadura e administração sistêmica de 200mg/Kg. O estudo durou 11 dias com o sacrifício ao final desse período. Os grupos que receberam a administração da própolis tiveram menor perda óssea, mas não houve diferença significativa entre as doses de própolis administradas. Os achados desse estudo mostraram evidências morfológicas e histológicas que a própolis, quando administrada sistemicamente, previne a perda óssea alveolar em ratos.

4. Materiais e Método

4.1. Obtenção da matéria-prima

4.1.1 Coleta das amostras de própolis da *Apis mellifera*

As amostras de própolis foram coletadas no município de Presidente Figueiredo, no Estado do Amazonas (Latitude 2,0378° S, Longitude 60,0205° O). A coleta foi através de raspagem com o auxílio de espátula nas partes internas e bordas da melgueira, ninho e tampa das colméias. O material coletado foi separado dos resíduos de madeira e excessos de cera e acondicionado em caixas metálicas com tampa (figura 1), esterilizadas, identificadas e transportadas ao laboratório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas para preparação das suspensões.



Figuras 1 e 2. Própolis in natura retirada da melgueira.

4.1.2 Tratamento das amostras de própolis *In Natura*

Posteriormente à coleta, as amostras foram acondicionadas em recipientes de vidro fechado com lâmina de papel alumínio perfurada para saída de umidade e colocadas em um dessecador com sílica gel, permanecendo por 14 dias em temperatura ambiente. Após esse

período, as amostras foram trituradas e homogeneizadas com auxílio de um pilão e cadinho (figura 4).



Figura 3- Própolis coletada.

Figura 4 - Pilão e cadinho de porcelana utilizado na trituração da própolis.

4.1.3 Obtenção do extrato etanólico de própolis

Para a obtenção do extrato etanólico de própolis 2,0 gramas de própolis triturado foram depositado em tubos de ensaio (25mm X 180mm). Em seguida, foi pipetado 25 mL de álcool etílico a 80%. A extração do extrato foi realizada em banho de água termostaticada (Dubnoff modelo 145-FANEM-São Paulo/Brasil) a 35°C durante quatro horas, sob agitação constante (figura 5).

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 26 minutos a 5°C (Sigma Laborzentrifugen, 2K15, Alemanha, 2000). O sobrenadante obtido, denominado extrato etanólico de própolis (EEP) foi acondicionado em frascos de vidro âmbar previamente lavados, desinfetados e esterilizados (figura 6). O extrato foi envasilhado e lacrado em condição asséptica, seguindo o criterioso protocolo de controle de qualidade para evitar contaminação.

4.1.4 Obtenção das Suspensões de Própolis a 0,1%, 1% e 10%.

Inicialmente foi realizada a remoção do álcool do EEP, onde cada tubo de ensaio contendo 5mL de EEP foi centrifugado à vácuo (Centrivap Concentrator, Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, 2000) por 4 horas a temperatura de aproximadamente 35°C (Figuras 7 e 8).

Após a remoção do álcool a “Pasta de Própolis” foi transferida para um béquer de 10mL com auxílio de uma espátula nº 24 e levado ao dessecador por 48 horas (figura 9).

A “Pasta de Própolis” foi pesada com o auxílio de uma balança analítica (Electronic Balance FA-2104N, Bioprecis, TDS Instrumental Tecnológica LTDA, Tijucas do Sul, PR, 2005) e depositado nos béqueres 5mg, 50mg e 500mg respectivamente. Em seguida foram adicionados nos béqueres 250µL de Tween 80, e com auxílio de um bastão de vidro em uma cuba ultra-sônica (UltraCleaner USC-1400, Unique Ind. e Com. Prod. Eletr. LTDA, Brasil), foi realizado a dissolução inicial com Tween 80 e gradativamente incorporando água destilada até completar um volume total de 5,0mL para cada concentração (Figura 10).

As suspensões foram armazenadas em frascos âmbar previamente esterilizados. Foi preparada uma solução aquosa de Tween 80 a 5% (T80 a 5%) para obtenção da solução controle ((figura 11).

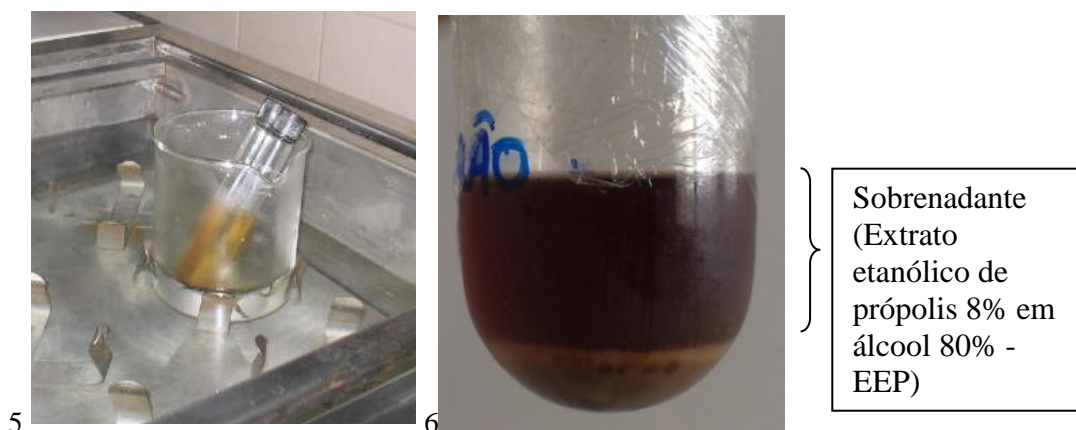
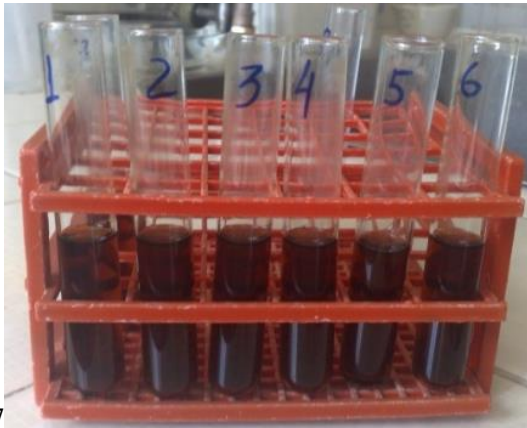


Figura 5- Amostra sob agitação em banho de água termostaticada.

Figura 6 - Sobrenadante – EEP.



7



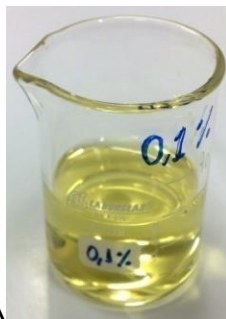
8

Figura 7 - Tubos de ensaio com 5mL de EEP.

Figura 8 - Centrivap Concentrator da Labconco.



9



10A



10B



10C

Figura 9 - Béquer com “Pasta de Própolis”.

Figura 10 - As três Suspensões Aquosas de Própolis finalizadas. (10A) 0,1%, (10B) 1,0% e (10C) 10,0%.



Figura 11 - SAP a 0,1% , 1% e 10%..

4.2 Caracterização do extrato

A caracterização do extrato foi realizada para cada ambiente de armazenamento (estufa, ambiente e geladeira) e período experimental (0, 7,15 e 30 dias) onde foram retiradas, assepticamente, alíquotas dos extratos com auxílio de um pipetador automático com pontas estéreis.

4.2.1. Teste de pH.

O pH do extrato de própolis foi obtido através do uso do pHmetro (pHmetro Tec-3MP, Tecnal) A determinação do pH foi realizada pela medida da diferença de potencial entre dois eletrodos adequados, imersos na solução em exame (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).



Figura12 - Obtendo o valor do pH do extrato.

4.2.2. Teste de sedimentação

O teste foi baseado na velocidade rotativa de tubos de ensaio contendo os extratos, utilizando-se a centrífuga em 1500 e 3000 rpm durante 5 minutos (Novatécnica, Nt810, 2004), para uma possível separação das fases dos extratos.

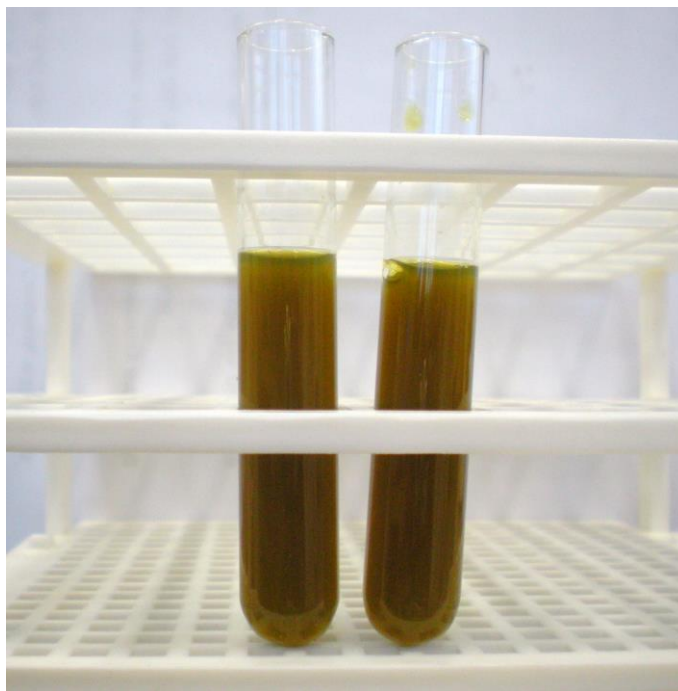


Figura 13- Extrato após processo de centrifugação.

4.2.3. Determinação da densidade do extrato de própolis.

A densidade do extrato foi determinada seguindo a Farmacopéia Brasileira (1988). Foram definidas as densidades do picnômetro seco, picnômetro com água e picnômetro com o extrato.



Figura 14- Obtenção da densidade do picnômetro com água

4.2.4. Estudo da estabilidade do extrato

O extrato previamente acondicionado foi mantido em locais com diferentes temperaturas e condições ambientes. Os locais escolhidos para o teste foram: estufa (37°C), geladeira ($\pm 4-8^{\circ}\text{C}$) e temperatura ambiente (24_26°C).

Em cada ambiente foram avaliadas, correspondentes ao tempo “zero”, as características organolépticas (cor, odor, brilho e consistência) para cada período experimental (0,7,15 e 30 dias).

4.2.5. Avaliação microbiológica.

Foi realizada a contagem de microrganismos, a verificação da presença ou ausência de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosas* em meios PCA, Baird-Parker (BP) e Cetrimid, respectivamente (em triplicada para cada ambiente e período experimental). A presença ou ausência de fungos e leveduras foi pesquisada utilizando-se ágar Saboraud. Com finalidade de padronizar as leituras das placas foi denominado o termo ausência para placa sem crescimento macroscópico de colônias bacterianas e presença para placa com crescimento macroscópico de colônias bacterianas; neste caso seria utilizada a contagem das unidades formadora de colônias (UFC).

4.2.5.1. Preparo dos meios de cultura

Os meios de culturas foram preparados seguindo as recomendações dos fabricantes. Para cada meio, os componentes foram dissolvidos em água destilada no interior de um Erlenmeyer e aquecidos para completa homogeneização. Em seguida, foram esterilizados em meio úmido sob pressão, a 121° C, durante 15 minutos e posteriormente distribuídos em placas de Petri (90 x 150 mm) na proporção de 15 mL para cada placa, proporcionando uma espessura uniforme da camada do meio. As placas foram distribuídas de acordo com os grupos experimentais.

Os meios preparados foram acondicionados sob refrigeração a 4°C até o momento de sua utilização.

4.2.5.2. Preparo e semeadura do inóculo.

O extrato de própolis foi diluído e homogeneizado na proporção 1/10, foram utilizados 9 mL de água destilada estéril distribuída em béqueres.

Para cada ambiente de armazenamento (estufa a 37°C, ambiente ± 24 a 26°C e geladeira ± 4 -8°C) e período experimental (0, 7, 15 e 30 dias) foram retiradas, assepticamente, alíquotas dos extratos com auxílio de um pipetador estéril e colocado no tubo contendo água destilada estéril. Colocando-se 0,5 mL nas placas contendo os meios de cultura PCA, Baird Parker, Cetrimid e àgar saboroub. A solução foi semeada nos meios pela técnica de esgotamento utilizando-se um Swab descartável.

Todo o procedimento experimental foi realizado em cabine de biossegurança Classe II, previamente limpa e esterilizada.

As placas com os meios PCA, Ceftrimid, Baird-Parker contendo as amostras de extrato, foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C, sendo as leituras realizadas após 24 e 48 horas. As placas semeadas em ágar Saboraud foram deixadas invertidas em temperatura ambiente e as leituras realizadas após 24 e 48 horas. Todo o procedimento experimental foi realizado em cabine de segurança biológica classe II.

4.2.6. Perda por dessecação a 105°C.

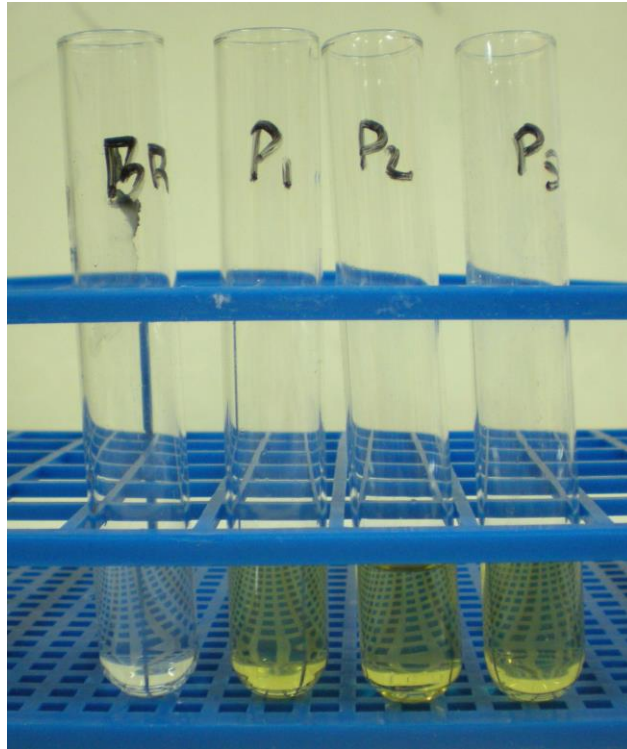
Aproximadamente 1g de própolis bruta pulverizada foram acondicionados em cadinho de porcelana previamente aquecido em estufa a 105°C, por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O conjunto foi aquecido em estufa por 3 h, a 105°C, resfriado em dessecador e pesado. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto foi repetido com intervalos de 2 h, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excederam 5mg). Esta análise foi realizada em triplicata e a perda por dessecação a 105°C foi calculada pela razão entre a massa do material volatilizado e a massa inicial de própolis, em porcentagem.

4.2.7. Teor de flavonóides totais.

Inicialmente, uma curva padrão com quercetina dihidratada, tomada como substância de referência, foi construída. Alíquotas de 1 a 10 mL de solução etanólica de quercetina, a 50 µg/mL, foram transferidas para tubos de 10 mL, contendo 0,4 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5%. O volume final de cada tubo foi ajustado com etanol. Como branco do sistema, 0,4 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído em tubo de 10 mL foi utilizada. Decorridos 30 min, foi tomada a leitura de cada solução a 425 nm, em

espectrofotômetro. Para a quantificação de flavonóides na amostra, foram utilizados 2 mL de solução de própolis a 1 mg/mL.

Figura 15- Branco do sistema e solução de própolis pronta para leitura.



4.2.8. Teor de fenóis totais.

Inicialmente, uma curva padrão com o ácido gálico, tomado como substância de referência, foi construída. Após preparado o ácido gálico em etanol em proporção de 1:20, seguido de diluição seriada, alíquotas de 100µl desta solução de ácido gálico, a 10 mg/mL, foram transferidas para microplaca e foram adicionados 50µl de reagente Folin-Ciocalteu previamente diluído em água na proporção de 1:10. A microplaca foi incubado no escuro por oito minutos e então adicionou-se 240µl de carbonato de sódio à 0,4%, aguardados três minutos a placa foi levado à leitura a 760nm em leitor de microplaca. O branco do sistema foi

preparado distribuindo na microplaca 50µl de etanol, 100µl do extrato de própolis à 1% e 240µl de carbonato de sódio.

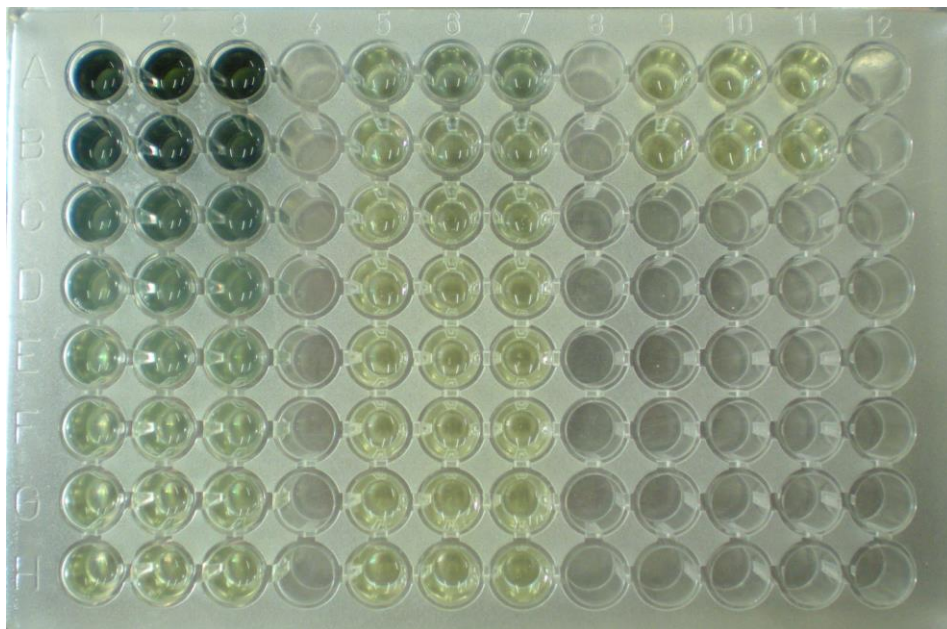


Figura 16- Microplaca após adição do carbonato de sódio.

6. Resultados e Discussão

Em odontologia, as pesquisas com produtos naturais têm aumentado nos últimos anos devido à busca por novos produtos com maior atividade farmacológica, com menor toxicidade e mais biocompatíveis, além de apresentarem custos mais acessíveis à população. Esses produtos com atividade antimicrobiana podem ser considerados um instrumento de apoio na terapia de diversas patologias bucais, como na prevenção e no tratamento das doenças cárie, periodontal e candidíase oral (CASTILHO et al, 2006). Estudos científicos vêm corroborando que a própolis possui um grande potencial terapêutico, principalmente, em relação às atividades antiinflamatória, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante (MENEZES 2005).

Nesta pesquisa, foram obtidos valores de pH, densidade e sedimentação além de avaliada a estabilidade do extrato de própolis, visando um controle dos aspectos físico-químicos na fase preliminar para, no futuro, ser formulado um enxaguatório bucal respeitando as normas da ANVISA.

Ao exame organoléptico a própolis apresentou aroma resinoso e balsâmico, cor acastanhada, consistência maleável à temperatura ambiente e pedaços heterogêneos. O exame organoléptico da própolis merece atenção, pois pode indicar o caminho analítico a se seguir ou até mesmo permitir deduções prévias de algumas características físico-químicas da amostra. A consistência à temperatura ambiente também pode dar indícios da relação resina/cera na própolis, que tem estes dois tipos de material em sua composição, a amostra estudada por apresentar aspecto maleável á temperatura ambiente indicou possuir grande teor de cera em sua composição, o que é pouco desejável, pois as atividades biológicas constatadas para a própolis são atribuídas as substancias encontradas na fração resinosa da própolis (FUNARI 2006).

No teste de sedimentação a 1500 e 3000 rotações por minuto não foi observada sedimentação em nenhuma concentração do extrato (0,1%, 1%, 10%). Demonstrando que o extrato aquoso obtido trata-se de uma solução homogênea.

No estudo da estabilidade dos extratos as propriedades organolépticas (cor, brilho, odor e consistência) foram avaliadas em diferentes temperaturas e ambientes, não havendo alterações destes caracteres, apresentando-se portanto fisicamente estável.

Os testes de pH, densidade, teor de flavonóides e teor de fenóis foram realizados apenas para a concentração de 1%, encontrando-se os valores obtidos para pH e densidade na tabela 1.

Análise	Resultado
Ph	4,45
Densidade	1,006g/l

Tabela 1. Valores para pH e densidade.

Independentemente da sua origem, a própolis sempre apresenta atividade antimicrobiana, uma vez que seu efeito bactericida e fungicida é indispensável para preservar a vida na colméia. Acredita-se que a atividade antimicrobiana da própolis se deve a efeitos sinérgicos complexos entre flavonóides, ácidos aromáticos fenólicos e seus derivados que estão presentes majoritariamente na própolis (MARCUCCI, 1995).

Além disso, a atividade antibacteriana pode também estar associada ao pH ácido encontrado no extrato (4,45) pois a maioria das bactérias patogênicas crescem próximo ao pH neutro, em torno de 6,5- 7,0. Entretanto, existem bactérias que crescem em pH menor que 2 e maior que 10. O *Enterococcus faecalis* é um exemplo desta característica, possuindo a capacidade de crescimento em meios de pH elevado (pH 9,6) (BANDEIRA, 1998).

O método utilizado para a quantificação de flavonóides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonóides, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de suas absorções. Desta forma, é possível determinar a quantidade de flavonóides na amostra, evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente a dos ácidos fenólicos (MARCUCCI, 2001). O valor encontrado (3,11%) de flavonóides totais, expressos como equivalentes de quercetina di-hidratada, está acima das faixas de valores encontrados por Mori (1997) e Woisky e Salatino (1998) para amostras de própolis do Estado de São Paulo (0,77-2,69% e 0,67-1,19%, respectivamente), obtidos por método espectrofotométrico baseado na reação de flavonóides com cloreto de alumínio e está na faixa de valor reportado por Bonvehí e Coll (1994) para amostra de própolis brasileira (3%), Segundo os parâmetros do Ministério da Agricultura, o resultado encontrado no presente estudo classifica a amostra como contendo um “baixo teor de flavonóides”.

Flavonóides são relatados como os mais abundantes e efetivos antioxidantes na própolis. Existindo uma correlação entre o alto conteúdo de flavonóides totais e a atividade anti-radicaís livres em extratos de própolis da Argentina (AHN et al., 2007). Da Silva et al. (2006) sugerem que os flavonóides desempenham importante papel na atividade antioxidante de extratos de própolis brasileira.

O método utilizado para o cálculo do teor de substâncias fenólicas totais baseia-se em uma reação de óxido-redução, na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente para uma solução azul (o cromóforo), que absorve fortemente a 760 nm. O teor de fenóis totais encontrado na amostra investigada, de 7,39% (*Tabela 2*), atende ao requisito mínimo do Ministério da Agricultura, que é de 5%. Bonvehí e Coll (1994) encontraram 18,72% (M/M) de substâncias fenólicas em

amostra de própolis brasileira. Woisky e Salatino (1998) utilizando o método de reação de substâncias fenólicas com o reagente de Folin-Ciocalteu (e tendo o ácido gálico como substância de referência) chegou a valores entre 9,49 e 13,72%, para amostras coletadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo. González *et al* mediram os teores de substâncias fenólicas em própolis de diferentes regiões da Argentina por três métodos colorimétricos distintos, tendo encontrado os maiores valores para as análises em que se empregou o reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como substância de referência (entre 3,25 e 33,49%). Cunha et al (2004), que testaram amostras de própolis de São Paulo e Minas Gerais, encontraram valores que variaram entre 6,41 e 15,24%.

Em Cabral et al (2009) o extrato etanólico da própolis originária do estado de Alagoas apresentou o teor de 257,98 mg de fenóis (o maior valor encontrado para a própolis brasileira) e alta atividade antibacteriana, podendo ser esta maior atividade atribuída ao alto valor de fenóis. Embora estudos com extratos etanólicos de própolis sejam mais comuns, é relatado que o extrato aquoso possui uma boa atividade antioxidante, associada ao alto teor de compostos fenólicos (MANI et al., 2006; VICENTINO & MENEZES, 2007).

Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) compararam os teores de substâncias fenólicas de própolis de diferentes origens geográficas (África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, Bulgária, Chile, China, Estados Unidos, Hungria, Nova Zelândia, Tailândia, Ucrânia, Uruguai, Uzbequistão), por método espectrofotométrico, tendo a própolis brasileira apresentado teor aproximadamente 50% inferior ao das demais amostras.

Na perda por dessecação a 105° obteve-se um resultado satisfatório (3,5%) dentro do limite estabelecido pelo Ministerio da Agricultura, demonstrando que a amostra contém pequena quantidade de substâncias volatilizáveis a 105° além da água.

Os resultados dos ensaios espectrofotométricos realizados com a própolis para determinação de seus teores de flavonóides e fenóis totais, expressados como equivalentes de quercetina e de ácido gálico, respectivamente são apresentados na tabela 2.

Análise	Teor (%)			Média	Requisito do Ministério
Fenóis totais	7,44	7,49	7,26	7,39	Mínimo de 5%
Flavonóides totais	3,09	3,25	3,01	3,11	Mínimo de 0,5%

Tabela 2. Resultado das análises de fenóis e flavonóides e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura.

No processo de fabricação de medicamentos, cosméticos e fitoterápicos, constitui exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a garantia da qualidade de produtos para sua segurança e eficácia e o controle de qualidade de produtos são requeridos para manutenção da integridade do produto e proteção do usuário.

Neste estudo, os testes microbiológicos visaram verificar o crescimento de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) no extrato através da contagem em placa pelo método de superfície (FARMACOPÉIA BRASILEIRA 1988). Nas condições e meios de culturas testados, houve indicação de contaminação por bactérias e fungos em todos os tempos, condições de armazenamento e concentrações dos extratos (Tabelas 3;4;5 e 6; Figura 17), apesar de o crescimento observado na leitura das placas ter sido não uniforme e de as características físicas (cor, odor e consistência) dos extratos terem se mantido inalteradas. Lavinias et al (2006) ao estudar a estabilidade microbiológica do suco de caju in natura armazenado sob diferentes temperaturas pela contagem de superfície observou o crescimento

de fungos e leveduras em todos os ambientes testados, porem esse crescimento diminuía gradativamente conforme a temperatura de armazenamento abaixava.

Concentração	Meios de cultura			
	Baird Parker	Agar saboroud	PCA	Cetrimid
0,1%	A;1;A	A;I;I	A;A;I	A;A;A
1%	I;I;A	1;1;A	A;A;A	I;I;I
10%	A;A;A	3;A;A	1;2;2	1;A;A

Tabela 3- contagem de microorganismos totais T0. A= ausentes; I = incontáveis

Concentração	Local	Meios de cultura			
		Baird Parker	Agar saboroud	PCA	Cetrimid
0,1%	Geladeira	I;A;A	A;A;A	A;3;I	A;A;1
	Estufa	A;A;A	I;3;1	A;A;I	I;I;3
	Ambiente	1;1;A	I;I;1	A;1;2	A;3;I
1%	Geladeira	1;1;A	2;2;I	1;2;A	3;A;A
	Estufa	A;3;A	A;I;A	2;2;I	1;A;A
	Ambiente	A;A;I	A;A;I	4;A;A	A;A;I
10%	Geladeira	I;I;A	1;A;2	I;I;A	1;1;A
	Estufa	2;1;I	1;A;A	3;A;A	A;I;1
	Ambiente	A;1;I	1;A;A	A;I;A	I;I;I

Tabela 4- contagem total de microorganismos T1 A= ausentes;I= incontáveis.

Concentração	Local	Meios de cultura			
		Baird Parker	Agar saboroud	PCA	Cetrimid
0,1%	Geladeira	2;I;A	I;1;2	A;A;I	A;1;1
	Estufa	I;A;A	IA;A	A;1;A	A;1;I
	Ambiente	I;A;A	I;A;1	I;1;1	A;1;I
1%	Geladeira	I;A;I	A;4;2	I;I;I	AA;A
	Estufa	2;A;A	A;I;A	I;1;1	A;A;A
	Ambiente	I;A;A	A;A;A	I;4;3	A;A;1
10%	Geladeira	I;I;1	I;A;A	1;2;2	A;A;A
	Estufa	I;I;I	I;4;2	A;2;1	A;I;I
	Ambiente	I;A;A	I;I;I	A;3;3	A;I;I

Tabela 5- contagem de microorganismos totais T2. A= ausentes; I= incontáveis.

Concentração	Local	Meios de cultura			
		Baird Parker	Agar saboroud	PCA	Cetrimid
0,1%	Geladeira	I;A;A	A;A;A	A;3;I	A;A;1
	Estufa	A;A;A	I;3;1	A;A;I	3;2;A
	Ambiente	1;1;A	I;I;1	A;1;2	A;A;2

1%	Geladeira	1;1;A	2;2;I	1;3;A	1;A;A
	Estufa	A;3;A	A;I;A	2;2;I	A;A;A
	Ambiente	A;A;I	A;A;I	1;A;A	A;A;A
10%	Geladeira	I;I;A	1;A;2	I;I;A	1;1;2
	Estufa	2;1;I	1;A;A	3;A;A	A;I;4
	Ambiente	A;1;I	1;A;A	A;I;A	I;I;I

Tabela 6- contagem de microorganismos totais T3. A= ausentes; I= incontáveis.

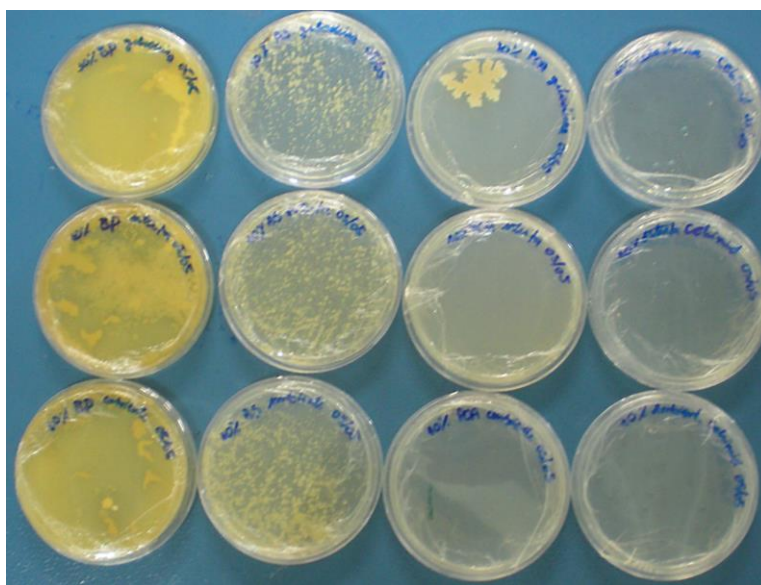


Figura 17– placas com presença e ausência de crescimento de microorganismos.

A qualidade microbiológica de produtos constitui um dos atributos essenciais para o seu desempenho adequado, principalmente em relação à segurança, eficácia e aceitabilidade

destes produtos. Falha nas medidas preventivas e de controle do processo de fabricação pode resultar em produtos inadequados ao consumo (YAMAMOTO 2000).

Matérias-primas, água e manipulação são fontes importantes de contaminação microbiana e devem ser controlados. A contaminação microbiana pode levar ao comprometimento do desempenho do produto devido à quebra da estabilidade da formulação, alteração das características físicas e aparência e levar a inativação dos princípios ativos e excipientes da formulação e ainda, causar a perda de confiança na empresa. Além disso, a administração de produtos contaminados pode agravar quadros clínicos de pacientes já debilitados pela doença (YAMAMOTO, 2000).

7. Conclusão

Baseados nos resultados da metodologia empregada podemos concluir que:

- A própolis estudada apresentou aroma resinoso e balsâmico, cor acastanhada, consistência maleável à temperatura ambiente e pedaços heterogêneos. Devido a sua consistência;
- Os resultados obtidos nas análises espectrofotométrica foram satisfatórios, pois cumpriam o requisito mínimo exigido pelo Ministério da Agricultura;
- O extrato de própolis apresentou condições de estabilidade e qualidade do produto, porem são necessários mais estudos que comprovem a viabilidade de uma formulação de enxaguatório bucal para controle do biofilme dental.

8. Cronograma

Descrição	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
	2009					2010						
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta de dados	X	X	X	X								
Coleta da matéria-prima					X							
Preparação do extrato						X						
Caracterização							X	X	X			
Tabulação dos resultados E análise estatística										X	X	
- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória) - Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												X

9. Referências

- AHN M. *et al.* Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of China. *Food Chem* 101: 1400-1409, 2007.
- ALMEIDA, J.M *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais livres DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 26, 446-452, 2006.
- AWALE, S *et al.* Neoflavonoids and related constituents from nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. *Journal of Natural Products*, v.68, n.6, p.858-864, 2005.
- BANKOVA, V. *et al.* Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatograf*. V.607,N.150, p.79, 1992.
- BANKOVA, V. *et al.* A study on flavonoids of propolis. *Journal of Natural Products*. v.46,n.21, p.471-474,1994.
- BANKOVA, V. *et al.* Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANSKOTA, A.H *et al.*. Recent progress in pharmacological and research of propolis. *Phytotherapy Research*. v. 15, p. 561-571, 2001.
- BANSKOTA, A.H. *et al.* Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.
- BEECHER , G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*, v.133, n.10, p.3248S-3254S, 2003.
- BONVEHÍ, J.S.; COLL, F.V. Phenolic composition of propolis from China and South America. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 49c, p. 712-718, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.
- BURDOCK, GA. Rievew of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chemical Toxicology*. v.36, p. 347-363,1998.
- CASTALDO, S. & CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modem medicine. *Fitoterapia*, v.73, p.S1-S6, 2002.
- CASTILHO, A.R.; MURATA, R.M.; PARDIC,V. Produtos Naturais em Odontologia Natural products in Dentistry *Revista Saúde* . 2006.

CIRASINO, L et al. Contact dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*, v.16, n.2, p.110-111, 1987.

CUNHA, I. B.S. *et al.* Factors that influence the yield and composition for Brazilian propolis extract. *Braz. Chem. Soc.*, v. 15, p 964-970,2004.

DA SILVA, J.F.M. *et al.* Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem* 99: 431-435, 2006.

DEBUYSER, 1983. La propolis. Tese (Doutorado em farmácia) - Faculdade de farmácia, universidade de Nantes, 82 p.

DOS SANTOS, C.R et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista brasileira de Farmacognosia*. v. 13, p. 71-74, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FIERRO, W.M. Evidencia científica del propóleos desde el punto de vista médico. Anais do Congreso Internacional de propóleos, Buenos Aires, Argentina, p. 21-31, 2000.

FUNARI, C.S et al. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.26, n.1 , p. 171-178, jan.-mar. 2006.

GEBARA, E. C. E. et al. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian journal microbiology*, v.33, p.365-369, 2002.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. *Bee World*, v.60, n.2, p.59-83, 1979.

GOJMERAC, W.L.; bees, beekeeping, honey and pollination. *Avi Publishing. Company*. p. 192 , Westport,1980.

GONZÁLEZ, M. *et al.* Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 22, n. 3, p. 45-54,2006.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoid. *Pharmacological Therapeutic*, v.96, n.2-3, p.67-202, 2002.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Research*, 1991, 25, p. 347-351.

ISHIDA, V. F. C. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de Extratos Etanólicos de Própolis frente a culturas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius*.; Dissertação de mestrado em Patologia Tropical – UFAM.

KUMAZAWA, S; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins *Food Chemistry*, v.84, n.3, p.329-339, 2004.

LAVINAS F.C., et al. Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju *in natura* armazenado em diferentes condições de estocagem. *Rev. Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(4): 875-883, out.-dez. 2006.

LINDHE, Jan. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia oral, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LONGHINI, R et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v.17: 388-395, 2007.

LU, Y et al. Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. *Fitoterapia*, v.75, n.3/4, p.267-276, 2004.

MANACH, C et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.79, n.5, p.727- 747, 2004.

MANI F, et al. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol* 105: 95-98, 2006.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v. 26, n. 5, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, n.19, p. 105-112, 2001.

MENEZES ,H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivo do instituto biologico São Paulo*, v.72, n.3, p.405-411, jul./set., 2005.

MONTI, M et al. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis*. v.9, n.2, p.163, 1983.

MORI, A.L.P.M. Própolis - identificação de flavonóides e ácidos aromáticos em tintura. Estimativa de FPS de extrato mole em base cosmética. São Paulo. 1997. 114 f. Dissertação (mestrado em FÁRMACOS e MEDICAMENTOS) - Faculdade de Ciência Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

NIKOLAEV, A.B (1978) defending the bee town. In, remarkable hive product: propolis. Scientific data and suggestion concerning its composition properties and possible use in therapeutic. *Apimondia, Bucarest.*

OTA,C et al. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* v. 44, p. 375-378. 2001.

PARK, Y.K et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v.18, n.3, p. 313-318, 1998.

PEREIRA,A.S et al. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, Vol. 25, N. 2, 321-326, 2002.

RAMOS ,A.F.N ; MIRANDA,J.L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2007, v. 13, n. 4, p. 698.

SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. v.73, n.1-2, p.243–249, 2000.

SICILI,S ; KUTLUCA,S. chemical composition and antibacterial activity of propolis colleted by three different races of honeybees in the some region. *Journal of Ethopharmacology*. v.99,66-67.2005.

TELLES, M. A. S; MOSCA, A., Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação da concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. *Instituto Adolfo Lutz*, v. 59, n.1/2 p. 15-19, 2000.

TOKER et al A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*. v.79: 89-94. 2008.

VARGAS, A.G et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, jan-fev, 2004.

VICENTINO A.R.R, MENEZES F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Rev Bras Farmacogn* 17: 384-387, 2007.

WILLIAMS, R.J et al. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

YAMAMOTO, C.H. et al. Contaminação microbiana em matérias-primas de origem natural empregadas em farmácia de manipulação. *Farmácia e Química*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 42-47, 2000.