Encontro Internacional de Produção Científica
X EPCC
24 a 26 de outubro de 2017
ISBN 978-85-459-0773-2

ANÁLISE QUÍMICA POR HEADSPACE DE PRÓPOLIS COM CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

bianca cristina moggio[1]; *José Eduardo Gonçalves*[2]

[1]Acadêmica do curso de Engenharia Química, UNICESUMAR, Maringá-PR. Bolsista do PROBIC-Unicesumar. bianca_moggio@hotmail.com
[2] Orientador, Doutor, Docente dos Programas de Mestrado em Tecnologias Limpas e Mestrado em Promoção da Saúde, UNICESUMAR. Pesquisador do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. jose.goncalves@unicesumar.edu.br

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* através da coleta de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto. Relatos mostram a atuação antimicrobiana expressiva do extrato de própolis contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e especificamente contra bactérias colonizadoras do biofilme. Várias substâncias químicas têm sido isoladas da própolis, sendo os flavonoides e os fenóis considerados os compostos biologicamente ativos. Neste trabalho a própolis é padronizada quimicamente para garantir sua qualidade, eficácia e segurança. O que não é fácil, pois, vários fatores podem interferir na sua composição química. Também foram necessários estudos que relacionassem a composição química com uma ou várias substâncias químicas que atuem como marcador da própolis em função da região ao qual foi coletada, pois assim é possível correlacionar o tipo de própolis com as substâncias químicas presentes. O problema delimitado consistiu estudar as amostras de própolis por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas por análise em Headspace, fazendo sua relação com as possíveis sustâncias químicas presentes na própolis, uma vez que a padronização de produtos naturais é uma importante ferramenta para qualificar o material e associar as suas propriedades terapêuticas. Foram encontradas nas seis amostras de própolis 109 substânciasvoláteis, das quais 53 compostos foram identificados. Podemos destacar como constituintes majoritários α-pineno e β-pineno e como compostos de interesse presentes *trans*-anetol, α-copaeno e o metil *cis*-isoeugenol. Os compostos identificados, tais como 3-carene, β-pineno, limoneno, α-pineno, γ-terpineno, mirceno, β-cariofileno, α-bisabolol, α-fellandrene, α e β-ocimeno, aromadendreno são conhecidos por possuir elevadas atividades antimicrobianas, assim, a própolis apresenta em sua composição substâncias com atividade antimicrobiana e anti-inflamatória.

PALAVRAS-CHAVE: Própolis; Análise por GC/MS; Análise por Headspace.

1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas da espécie Apis mellifera através da coleta de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (KOO et al., 2002b;). É encontrada nas colmeias, onde é responsável pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento antisséptico (SANTOS,1999). A composição química da própolis é muito variada, complexa e diretamente ligada com a característica das plantas visitadas pelas abelhas em cada região (FERNANDES et al., 2007; BOYANOVA et al., 2006; COUTO; COUTO, 2002; COSTA; OLIVEIRA, 2005; MARCUCCI, 2000; BANKOVA, 2005b). Nela podemos destacar a presença de flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kanferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (HU et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005; OZKUL et al., 2004; MATSUDA et al., 2002; ROCHA et al., 2003). Há também na sua constituição elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (MARCUCCI, 1996).

De todos esses grupos de compostos, certamente o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos flavonoides (LIMA, 2006). A eles, bem como aos ácidos fenólicos, são atribuídas às propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (VOLPI; BERGONZINI, 2006, KOO et al 200). As atividades antibacterianas e antifúngicas da própolis são atribuídas principalmente à

ISBN 978-85-459-0773-2

flavonona pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletil do ácido caféico, com um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição do RNA-polimerase bacteriano (UZEL et al., 2005). Outros componentes como os flavonoides, o ácido caféico, ácido benzoico e ácido cinâmico, provavelmente agem na membrana ou parede celular do microrganismo, causando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO et al., 2005).

A literatura descreveu uma atuação antimicrobiana expressiva do extrato de própolis contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FERREIRA; VALENTE; BARBOSA, 1996; WOISKY; GIESBRECHT; SALATINO, 1994), e especificamente contra bactérias colonizadoras do biofilme, (GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996), além do efeito inibitório sobre a síntese de glucano (KOO et al, 2000) somado ao fato de sua capacidade de inibir o desenvolvimento da lesão cariosa em animais (IKENO; MIYAZAWA, 1991; KOO et al., 1999).

A utilização de extratos etanólicos de própolis (EEPs) no campo da Cariologia tornou-se realidade quando estudos relataram sua atividade sobre a inibição de agentes, microrganismos relacionados à cárie dentária (KOO et al., 2005; ALMEIDA et al. 2006) e sobre o processo de formação do biofilme cariogênico / fatores de virulência bacteriana que influenciam na cariogenicidade deste (KOO et al., 2002ab; ALMEIDA et al., 2006).

Neste contexto o presente estudo visa comparar o perfil químico dos própolis obtidos de diferentes regiões do estado do Paraná através da identificação das substâncias químicas presentes no mesmo, e também análise das substâncias voláteis das própolis extraídas de diferentes regiões do Paraná.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de seis (6) própolis, foram colhidas na primavera (outubro de 2014), verão (Fevereiro de 2015) e outono (maio de 2015) no estado do Paraná. As própolis analisadas foram coletadas de colmeias de abelhas Apis mellifera do tipo Langstroth, sendo que as amostras adquiridas são de apiários das regiões de Paranavaí, Iguatemi, Ilha Grande (2 amostras), Porto Camargo e São Jorge do Patrocínio.

2.1 CONDIÇÕES DO HEADSPACE ESTÁTICO

Cada uma das amostras de própolis (5 g) foi submetida à técnica de headspace estático por uma hora, utilizando-se um frasco de vidro de 20 mL em seguida, fechado com septo de silicone e tampa de rosca de alumínio. Colocado no auto-amostrador Combi-Pal para aquecimento a 150 ° C por 1 h para garantir o equilíbrio de voláteis entre as fases gasosas e sólidas no frasco. A Alíquota da fase gasosa acima da amostra foi injetado no injetor do cromatógrafo de gás. O As seguintes condições do auto-amostrador do espaço de cabeça foram definidas: temperatura do forno de incubação 150 ºC; tempo de incubação 1 h; temperatura da seringa do corpo de cabeça 120 ºC; velocidade do agitador 450 rpm; volume de injeção 1500 µL; velocidade de preenchimento 100 µL s^{-1}; pullup delay da seringa 1000 ms; velocidade de injeção 500 µL s^{-1}; tempo de pré-injeção 500 ms; postar tempo de injeção 500 ms; tempo de limpeza da seringa de 300 s com nitrogênio.

2.2 CONDIÇÕES DO CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CG/EM

As análises no CG/EM foram realizadas em um cromatógrafo a gás (modelo Agilent 7890B) com injetor automático (CTC PAL Control), acoplado a um espectrômetro de massa (modelo Agilent

ISBN 978-85-459-0773-2

5977A MSD), equipado com coluna HP-5MS UI Agilent com fase estacionária de 5% de fenil metil siloxano (30,0 m x 250 µm x 0,25 µm de espessura do filme). Para a separação adequada dos analitos no sistema CG/EM, foi utilizada a seguinte programação otimizada de temperatura do forno: temperatura inicial de 50 °C, em seguida rampa de 3°C min^{-1} até 200°C, rampa de 5°C min^{-1} até 280 °C, e finalizando com aumento de 20 °C min^{-1} até 300 °C permanecendo por 1 min. As demais condições do método de análise foram: volume de injeção de 1500 µl, fluxo do gás de arraste (He, pureza 99,99999%) igual a 1,0 mL min^{-1} no modo Split 1:20, ionização por impacto eletrônico de 70 eV, temperatura da fonte de ionização de 230°C, do quadrupolo de 150°C, da linha de transferência de 250°C e do injetor de 240°C. O método do padrão interno foi utilizado para a quantificação em modo monitoramento de íon selecionado no sistema de detecção EM no modo “scan” (SIM), na faixa de razão massa/carga (*m/z*) de 40 - 550, sendo o íon principal utilizado para a quantificação e os íons secundários para a identificação. Para confirmação da identidade das substâncias detectadas, foi considerado um máximo de 20% de diferença entre a abundância relativa esperada dos íons secundários em relação ao principal. A aquisição dos dados foi realizada pelo software MassHunter e análise qualitativa para identificação dos compostos foram realizadas através da comparação dos espectros de massas dos padrões com os espectros de massas da biblioteca NIST 11.

Os flavonoides e ácidos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa obtidos do CG/EM de padrões autênticos analisados nas mesmas condições. Os padrões utilizados são: quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, canferide, isosacuranetina, sacuranetina, ácido ρ-cúmarico, ácido gálico, ácido cinâmico, ácido ferúlico, artepilin C e ácidos graxos de 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22 e 24 átomos de carbono, saturados e insaturados (Sigma Co., USA).

As identificações dos constituintes foram realizadas por inspeção visual dos seus espectros de massas comparando com os espectros da literatura (ADAMS, 2011), observando principalmente os parâmetros pico do íon molecular e pico base, além de comparação com espectros da biblioteca computacional (NIST 11) através da comparação dos índices de Kovats calculados em co-injeção de uma série homóloga de n-alcanos de C7 – C30, com os índices de Kovats encontrados na literatura (ADAMS, 2011).

3 RESULTADOS

Para a composição das substâncias voláteis nas amostras de própolis, deveriamos mencionar a diferença de cores encontradas para todas as seis (6) amostras própolis. Nas amostras foram evidentes estas diferenças onde as mesmas variou de verde opaca até amarelo, conforme descritos na Tabela 1. A cor da própolis depende da sua fonte botânica (ALBUQUERQUE et al, 2008; CHENG et al. 2013). No artigo de revisão de Bankova et al. (2000) o autor afirma, que a principal fonte botânica da própolis brasileiro é Baccaris dracunculifolia (Asteraceae), uma planta nativa brasileira, chamada "alecrim" (ALBUQUERQUE et al, 2008; MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008). Outras fontes populares de plantas da própolis brasileira são Araucaria angustifolia e Eucalyptus citriodora (SFORCIN, 2007).

Tabela 1: Características de estudo das amostras de própolis do Paraná

Cidade	Código	Cor e textura
Iguatemi (UEM)	UEM	Castanho esverdeado, rígido e cera
Ilha Grande	IG-V	Castanho esverdeado, rígido e cera
Ilha Grande	IG-A	Amarelo escuro e cera
Paranavaí	PA	Verde escuro, rígido e cera

ISBN 978-85-459-0773-2

Porto Camargo	PC	Castanho amarelado, rígido e cera
São Jorge do Patrocínio	SJP	Verde opaco e cera

A técnica de Headspace permitiu a extração de compostos com pesos moleculares menores e que são mais voláteis que a matriz da amostra. Neste trabalho, utilizou-se a injeção direta de Headspace, onde toda a fase de vapor foi injetada no cromatógrafo por uma seringa de Headspace.

Nos cromatogramas das amostras de própolis foi possível identificar vários compostos orgânicos voláteis extraídos via Headspace. As Figuras 1 e 2 mostram os cromatogramas típicos das amostras de própolis e o Quadro 1 exibe os compostos identificados que pertencem a várias classes, como alcenos, álcoois, ésteres, terpenos, aldeídos e cetonas. Esses compostos foram observados em praticamente todas as amostras de própolis; no entanto, eles apresentaram diferentes intensidades em cada uma das amostras analisadas. Alguns desses compostos já foram relatados na literatura como sendo identificados em amostras de própolis de diferentes regiões (XU et al., 2009).

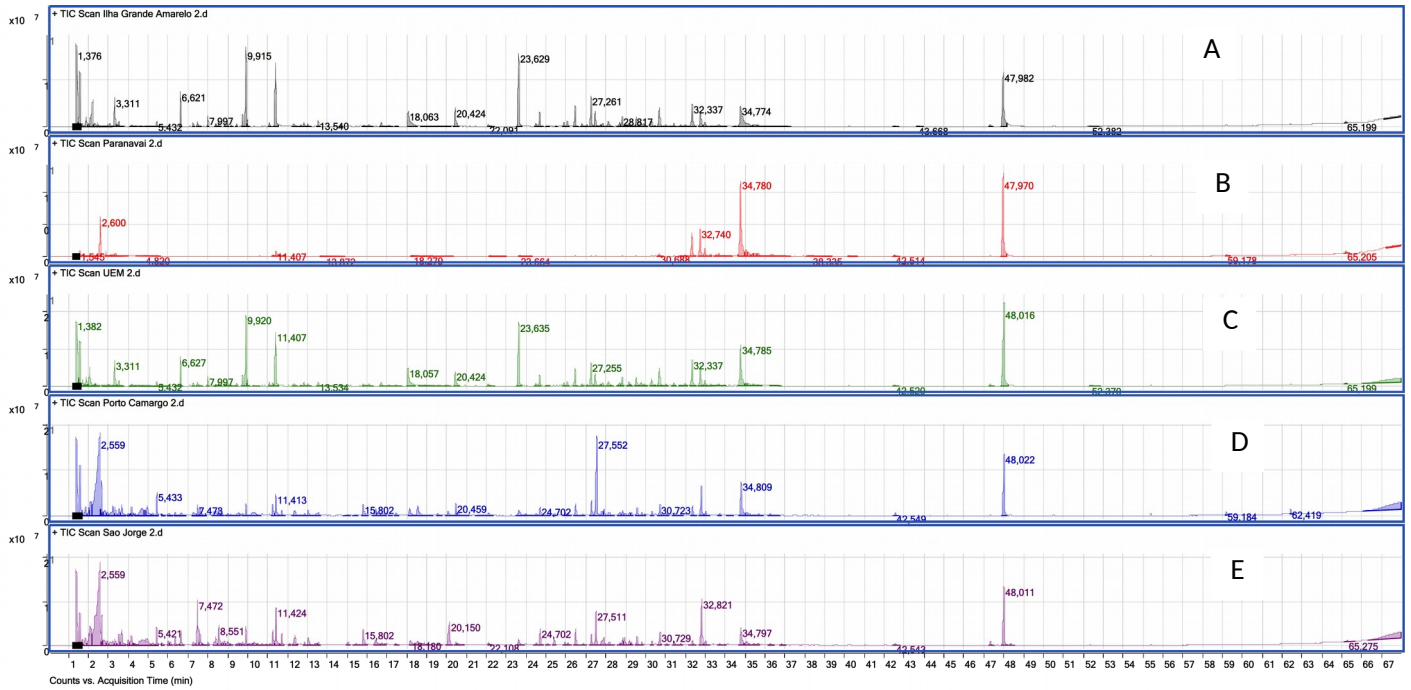

Figura 1: Cromatograma típico de cada amostra de própolis verde por CG/EM-HS: (A) Própolis de Ilha Grande; (B) Própolis de Paranavai; (C) Própolis de Iguatemi – UEM; (D) Própolis de Porto Carmago; (E) Própolis de São Jorge do Patrocínio.

Na análise de CG/EM por Headspace, foram encontrados 109 compostos voláteis, considerando as seis amostras da própolis verde, dos quais foram identificadas 53 substâncias voláteis presentes nas diferentes própolis do Paraná. Os constituintes voláteis identificados de acordo com a classe química (Quadro 1), evidencia-se uma composição química em voláteis bastante variada, destacando-se como constituintes *trans*-anetol, α-copaeno e metil *cis*-isoeugenol.

X EPCC
Encontro Internacional de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017
ISBN 978-85-459-0773-2

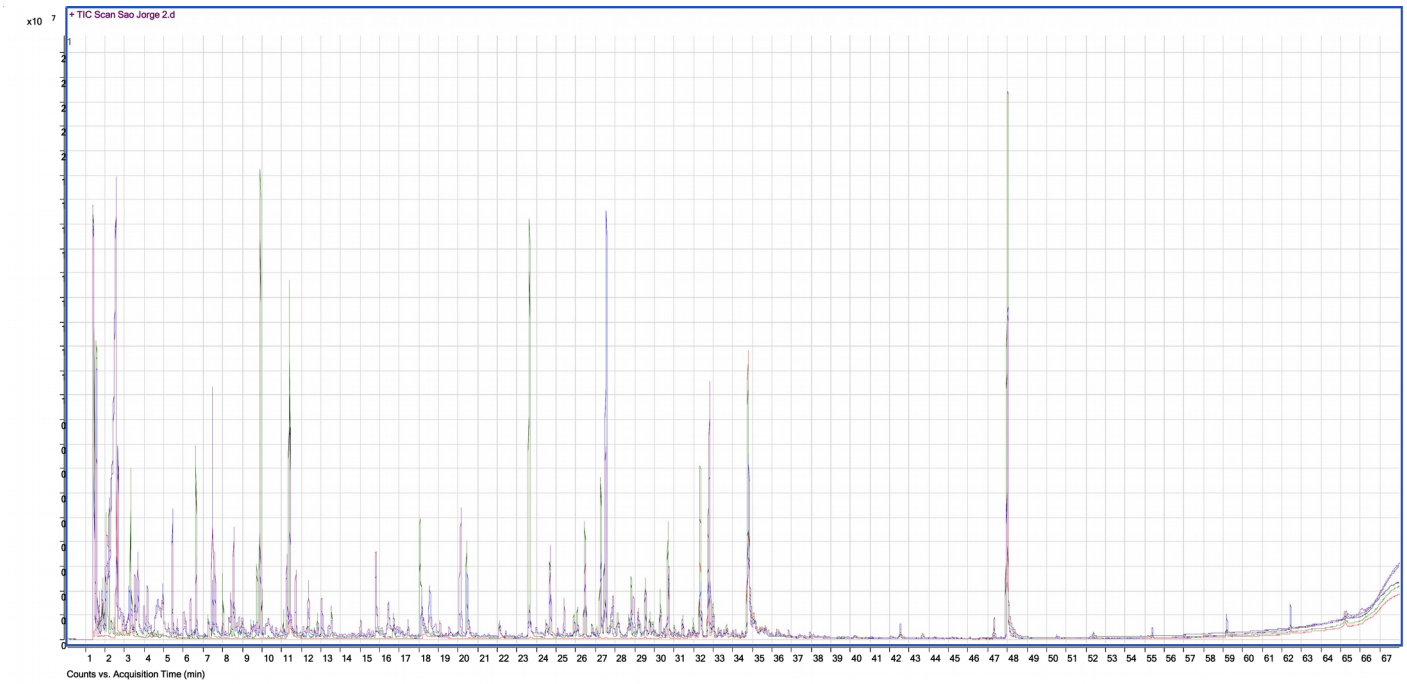

Figura 2: Sobreposição dos cromatogramas das amostras de própolis verde por CG/EM-HS.

A variação na composição química dos voláteis, entre as seis amostras coletadas, em diferentes épocas do ano, foi pequena, havendo vinte e um constituintes comuns dentre os compostos identificados. Contudo, apenas na amostra coletada em outubro foi evidenciado o sesquiterpenóide δ-cardinol e os sesquiterpenos ß-gurjuneno, isocariofileno e δ-cadineno. Os *n*-alcanos foram identificados na amostra do mês de junho, assim como o monoterpenóide 1,8 cineol e o sesquiterpeno α-selineno. No entanto, vale ressaltar que o constituinte majoritário foi o mesmo nas seis amostras, o *trans*-anetol, e que o percentual deste composto foi relativamente alto.

Quadro 1: Compostos voláteis identificados nas amostras de própolis

	Compostos	IG-A	IG-V	PA	PC	SJP	UEM
1	*p*-cimeno	x	x	x	x	x	X
2	Limoneno	x	x	x	x	x	x
3	*α*-Pineno	x	x	x	x	x	X
4	*β*-Pineno	x	x	x	x	x	X
5	Myrceno	x	x		x		X
6	Careno	x			x	x	X
7	1,8-cineol	x	x	x	x	x	X
8	Linalool	x	x	x	x	x	X
9	Eucalyptol		x		x	x	X
10	*α*-cubebeno	x	x	x	x	x	X
11	*α*-copaeno	x	x	x	x	x	X
12	*β*-gurjuneno	x	x	x	X	x	
13	*β*-cariofileno	x		x	x	x	X
14	*α*-bergamoteno		X	x	x		x
15	farneseno	x	x	x	x	x	X
16	trans-*β*-farneseno			X			

ISBN 978-85-459-0773-2

17	D-germacreno	x	x	x		x	X
18	*α*-selineno	X	x	x	x	x	X
19	isocarofileno		x	X	x	x	
20	*β*-bisaboleno	X	X	X	x	x	x
21	*δ*-cadineno	X	X				
22	cadineno	X	X		x	x	
23	*α*-Ocimeno	X			x	x	
24	*β*-Ocimeno		X		x	x	
25	δ-cadinol	x					
26	Acetofenona	x	x		x	x	X
27	Linalool	x	x	x	x		x
28	naftaleno		x	x		x	x
29	*α*-Cubebeno	x	x	x	x	x	x
30	4-hidroxi-4-metil -heptan-2-ona			x			x
31	6-metil-5-hepten-2-ona			x			x
32	octanal	x		x		x	x
33	nonanal		x	x	x		x
34	*n*-decanal	x	x	x	x	x	x
35	anisaldeido		x		x		
36	*n*-dodecanal	x	x	x	x	x	
37	*α*-Copaeno	x	x		x	x	x
38	*γ* -Cariofileno	x	x		x	x	
39	tetradecano	x	x		x	x	
40	pentadecano	x	x	x	x	x	x
41	hexadecano	x	x	x	x	x	x
42	Aromadendreno	x	x	x	x	x	x
43	*γ* -Muuroleno	x		x	x	x	
44	estragol	x		x	x	x	
45	*trans*-anetol		x				x
46	metil-*cis* isoeugenol		x	x			x
47	*trans*-metil isoeugenol		x	x			x
48	elemicin		x	x			x
49	Viridifloreno	x	x		x	x	
50	Germacreno D	x	x	x	x	x	x
51	*δ*-Cadineno	x	x	x	x	x	x
52	*β*-Farnesol	x	x	x	x	x	x
53	Spatulenol	x	x	x	x	x	x

Os compostos identificados pertenciam principalmente ao classe de álcoois, aldeídos, monoterpenos e sesquiterpenos. Monoterpenos, como α e β-pinenes foram predominantes em todas as amostras. Nunes e Guerreiro realizaram análise por Headspace e atribuiu maiores quantidades de α-pineno, β-pineno, sulcatona, carene, limoneno, eucaliptol, α-ocimene, β-ocimene, acetofenona na pró-propolis brasileira, sendo que o α-Pinene compôs mais de metade de todos os voláteis presentes nas amostras de própolis do Paraná.

A avaliação da atividade biológica da própolis não estava no âmbito do presente estudo, no entanto, os compostos identificados, tais como 3-carene, β-pineno, limoneno, α-pineno, γ-

ISBN 978-85-459-0773-2

terpineno, mirceno, β-cariofileno, α-bisabolol, α-fellandrene, α e β-ocimeno, aromadendreno são conhecidos por possuir elevadas atividades antimicrobianas. Melliou et al., analisado a atividade antibacteriana de cinco amostras de própolis da Grécia, determinou que as amostras de própolis que apresentam maior teor de α-pineno, possuem maior atividade antibacteriana, quando comparadas com as amostras de própolis com menor porcentagem.

4 CONCLUSÃO

A composição química dos compostos voláteis presentes nas amostras de própolis do Estado do Paraná mostrou-se variada, destacando-se como constituintes majoritários α-pineno, β-pineno e como compostos presentes *trans*-anetol, α-copaeno e o metil *cis*-isoeugenol. A própolis apresenta como constituintes majoritários os compostos fenólicos, do tipo flavónoides, antraquinonas e fenóis. Estas substâncias na própolis são representadas pelas agliconas de flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, os quais são responsáveis pela grande variedade das propriedades biológicas (BANSKOTA et al., 1998; BURDOCK, 1998; KOO; PARK, 1997; BANSKOTA et al., 2000).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; DORNELES, C. A.; MORAIS, M. O. **Journal Essent. Oil Res,** v. 20, n. 414, 2008.

ALMEIDA, R.V.D.; CASTRO, R.D.; PEREIRA, M.S.V.; PAULO, M. Q.; SANTOS, J. P.; PADILHA, W. W. N. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr**, v. 1, p. 87-92, 2006.

BAAKILINI, M. F.; LARA, E. H. G; PANZERI, H. Adición de própolis em formulaciones de dentifrícios. Evaluación de SUS propriedade y estabilidad. **Rev. Fola Oral**, São Paulo, v.2, n.6, p.130-133, dez.1996.

Bankova V, Castro S, Marcucci MC 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie** 31: 3-15.

BERKOV, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Development and validation of a GC–MS method for rapid determination of galanthamine in Leucojum aestivum and Narcissus ssp.: A metabolomic approach. **Talanta**, v. 83, p. 1455–1465, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Anexo VI – Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 2002.Acessado em 12 abril de 2014. Online. Disponível na Internet http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/instnorm03_propolis6.htm..

BUISCHI, Y. P. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas, 2000.
Chang, R., Piló-Veloso, D., Morais, S.A.L., Nascimento, E.A. Analysis of a Brazilian green propolis from Baccharis dracunculifolia by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 549-556, 2008.

ISBN 978-85-459-0773-2

CHENG, H; QIN, Z. H.; GUO, X. F; HU, X. S; WU, J. H, Geographical origin identification of própolis using GC-MS and electronic nose combined with principal componente analysis. **Food Research International**, v. 51, p. 813 – 822, 2013.

Cunha, I. B. S; Sawaya, A. C. H. F; Caetano, F. M.; Shimizu, M. T; Marcucci, M. C.; Drezza, F. T; Povia, G. S;. Carvalho, P. de O. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **J. Braz. Chem. Soc**., v. 15, p. 964-970, 2004.

CURY, J. A.; ROCHA, E. P.; KOO, H.; FRANCISCO, S. B.; CURY, A. A. D. B. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. **Braz Dent J,** Ribeirão Preto, v. 11, n.1, p.29-34, jan./junh. 2000.

DE CARLI, A. D. **Capacidade antibacteriana da própolis de Apis mellifera associada ao fluoreto de sódio no controle do biofilme dental**. [Dissertação]. Campo Grande: Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2007.

DUARTE, C. A.; KFOURI, L. S. Ação da própolis sob a forma de bochechos na formação da placa bacteriana e gengivite. RGO, Porto Alegre, v.47, n.2,p.82-84, abr./jun. 1999.

FERREIRA, R. C. V.; VALENTE, P. H. M.; BARBOSA, A. D. Atividade antibacteriana da própolis. LECTA USF, **Bragança Paulista**, v.14, n.2, p. 65-93, jul./dez. 1996.

GARCIA, J.; et al. **Produção de própolis em colônias de Apis mellifera africanizadas pelas técnicas convencional de raspagem e coletor de própolis inteligente.** Maringá, PR. Anuário 1999/2000. Acessado em 12 de abril de 2014. Online. Disponível na Internet http://www.cca.uem.gov/anu4600. htm.

GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C. G. D. C.; MAYER, M. P. A. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre S. mutans e S. sobrinus. **Rev Odontol Univ São Paulo**, SP, v. 10, n. 4, p.251-256, out/dez. 1996.

GOLD, O. G; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for Streptococcus mutans. **Arch Oral Biol, Oxford,** v. 18, n. 11, p. 1357-1364, nov. 1973.

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.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A. Effect de Apis mellifera propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res, Basel,** v. 33, n. 5, p. 393-400, Sep./Oct. 1999.

KOO, H.; GOMES, B. P.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. **Arch Oral Biol,** Oxford, v. 45, n. 2, p. 141-148, Feb.2000.

ISBN 978-85-459-0773-2

KOO, H.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation**. Caries Res, Basel**, v. 36, n. 6, p. 445-448, Nov./Dec. 2002.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on Streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, May. 2002.

MALTZ, M. Cárie dental: Fatores relacionados. In: PINTO, V. G. **Saúde bucal coletiva**. São Paulo: Santos, 2000. P. 319-339.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-536, 1996.

MORAES, E.; OTA, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T. Influência da própolis na contagem de estreptococcus do grupo mutans. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPqO, 13, 1996, São Paulo: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 1996. p. 111.

MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.L.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K. **Ciênc. Tecnol. de Aliment**. 2008, 28, 178.

MOTA, H. C. N. **Avaliação clínica da própolis sobre a placa bacteriana e gengivite**. 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia Preventiva). Natal: Faculdade de Odontologia da UFRN; 2000.

MOŢ, A. C., SILAGHI-DUMITRESCU, R., & SÂRBU, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV–vis spectroscopic data. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 516–522, 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Diagnosis and management of dental caries throughout life. **NIH Consensus Statement**, 2001; 18: 1-30.

PANZERI, H.; PEDRAZZI, V.; OGASAWARA, M. S.; ITO, I. Y.; LARA, E. H. G.; GABARRA, F. R. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliações físicas, microbiológicas e clínicas. **Rev ABO Nac**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 26-30, fev./mar. 1999.

PEREIRA, J. V. **Estudos com o extrato da Punica granatum Linn. (Romã):** efeitos antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental. 88f. Tese (Doutorado em Estomatologia), João Pessoa: UFPB/UFBA, 2002.

PETERLINI, C.; ELMADJAN NETO, M.; VALLE, P. D.; ROMERO, S. S. Efeitos adversos da colexidina. **Rev Odontol Univ** Santo Amaro, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 32-34, jan./jun. 1998.

SALATINO, A.; FERNANDES-SILVA, C. C.; RIGHI, A. A.; SALATINO, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, 28, 925-936.

ISBN 978-85-459-0773-2

SANTOS, V. R. Própolis: antibiótico natural alternativo em Odontologia (revisão de literatura). **Rev CROMG**, Belo Horizonte, v. 5, n. 3, p. 192-195, set./dez. 1999.

SFORCIN, J.M. **Journal Ethnopharmacol**. 2007, 113, 1.

STEINBERG, D.; KAINE, G.; GEDALLA, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. **Am J Dentistiry**, San Antonio, v. 9, n.6, p. 236-239, Dec. 1996.

STOOKEY, G. K. Caries prevention. **J Dent Educ**, Washington, v. 62, n.10, p. 803-811, 1998.

TWETMAN, S.; GRINDEFJORD, M. Mutans streptococci suppression by chlorhexidine gel in toddlers. **Am J Dentistry**, San Antonio, v. 12, n. 2, p. 89-91, Apr. 1999.

VINHOLIS, A. H. C. et al. Mecanismo de ação da clorexidina. **Rev Periodontia**, São Paulo, v.5, n.3, p.281-283, jan./jun. 1996.

XU, Y.; LUO, L.; CHEN, B.; FU, Y. Recent development of chemical components in propolis. **Front Biol China**. 2009, **4**:385–391.

WOISKY, R. G.; GIESBRECHT. M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de Apis mellifera. **Rev Farm Bioquím Univ** São Paulo, SP, v.30, n.1, p. 19-21, jan./jun. 1994.

YANG, C., LUO, L., ZHANG, H., YANG, X., LV, Y., & SONG, H. Common aroma-active components of propolis from 23 regions of China. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 1268–1282, 2010.

ZANELA, N. L. M. et al. Influência de bochechos com soluções de digluconato de clorexidina a 0,2%, fluoreto de sódio a 0,05% pH 3,4 e esteviosídeo a 0,1% na inibição da placa dentária “in vivo”, em crianças. **Rev Fac Odontol Bauru**, Bauru, v.5, n. ½, p. 71-78, jan./jun. 1997.

ZANELA, N. L. M.; BIJELLA, M. F. T. B; ROSA, O. P. S. The influence of muothrinses with antimicrobial solutions on the inhibition of dental plaque ando n the levels of mutans streptococci in children. **Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.16, n.2, p. 101-106, abr./jun. 2002.

ZÁRATE-PEREIRA, P. **Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%; fluoreto de sódio 0,2% e própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% sobre níveis salivares de estreptococcus do grupo mutans em pacientes cárie-ativos**. 74f. Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

ZÁRATE-PEREIRA, P. **Avaliação in situ da ação de própolis de Apis mellifera no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental**. 116f. Tese de Doutorado. São Paulo: Faculdade de Odontologia