

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
DENTIFRÍCIOS À BASE DE PRÓPOLIS SOBRE
PATÓGENOS BUCAIS**

TATIANA CERVEIRA VALOIS DE SÁ

São Luís – MA
2008

TATIANA CERVEIRA VALOIS DE SÁ

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DENTIFRÍCIOS À BASE DE
PRÓPOLIS SOBRE PATÓGENOS BUCAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Coelho Alves
Prof. Dr. Valério Monteiro Neto

**São Luís – MA
2008**

Sá, Tatiana Cerveira Valois de.

Avaliação da atividade antimicrobiana de dentifrícios à base de própolis sobre patógenos bucais / Tatiana Cerveira Valois de Sá. São Luís, 2008.

58 f.

Orientadores: Cláudia Maria Coelho Alves; Valério Monteiro Neto.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Pós Graduação em Ciências da Saúde, 2008.

1. Periodontia 2. Atividade antimicrobiana I. Título

CDU 616.311.2:638.13

TATIANA CERVEIRA VALOIS DE SÁ

Avaliação da atividade antimicrobiana de dentifrícios à base de própolis sobre patógenos bucais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Coelho Alves (Orientadora)

Doutora em Odontologia (Dentística).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria da Silva Figueiredo

Doutora em Microbiologia
Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Prof^a. Dr^a. Adriana de Fátima Vasconcelos Pereira

Doutora em Odontologia (Materiais dentários)
Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Prof^a. Dr^a. Cecília Cláudia Costa Ribeiro

Doutora em Cariologia
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil

*À **Deus**, fonte de vida, por ter colocado em meu caminho pessoas sábias, inteligentes, fraternalmente amigas, que muito me ensinaram e me fizeram saber aproveitar os instantes de aprendizagem, fruto da convivência, e, sobretudo saber vencer e superar as dificuldades e desafios que se apresentaram, a mim, nesta caminhada, não permitindo que eu desviasse de meus objetivos.*

*A **meus pais**, pessoas tão diferentes, mas comuns na essência dos valores, e aos **meus irmãos** pelo apoio, incentivo, carinho, pelas lições de vida e pelo amor eterno, além da confiança que sempre depositaram em mim.*

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, fonte suprema de vida. Obrigada Senhor!

À minha mãe, **Teresa Valois**, pelo seu amor incondicional, capaz de transpor barreiras, pelos seus ensinamentos, sua fé e por sempre me mostrar o verdadeiro sentido das palavras: determinação, dedicação, persistência, amor e honestidade.

Ao meu pai, **João Batista**, que, com amor ímpar, ensinou-me os princípios da verdade, mostrando-me que a pessoa sensata e honesta alcança seus objetivos mais cedo ou mais tarde.

Aos meus irmãos, **João, Rennan e Rennata**, que sempre estiveram comigo, oferecendo-me carinho, companheirismo e amor em todos os momentos da minha vida.

Ao meu avô, **Rui Valois** (*in memoriam*), chamado para junto do Pai antes da concretização deste projeto, por sempre ter acreditado em mim e torcido pelo meu sucesso. Obrigada vovô, por tudo!

À minha avó, **Teresinha Valois**, pelo seu carinho, preocupação e presença constante em minha vida, incentivadora de meus propósitos, sempre me dando forças para buscar meus objetivos.

À professora **Ana Emília**, pessoa ímpar, eterna orientadora, pelo carinho e amizade dispensados a mim, e por sempre incentivar seus alunos na busca de seus objetivos e se tornarem profissionais competentes.

À professora **Cláudia**, por toda a sua disponibilidade para realizar a orientação deste trabalho, pelas suas reflexões sobre nosso objeto de estudo, e, pela leitura da várias versões desta dissertação. Meus sinceros agradecimentos!

Ao professor **Valério**, pela oportunidade de trabalhar juntos no laboratório, pelo exemplo de dedicação e seriedade, pelo carinho, colaboração constante e pelas contribuições fundamentais para a execução deste trabalho.

À professora **Cecília**, que com sua experiência e competência contribui para a realização desse trabalho.

Ao professor **Antônio Luís**, que com sua simplicidade acadêmica e conhecimento científico, muito colaborou com suas intervenções pontuais para a melhoria deste trabalho.

Às professoras **Adriana Vasconcelos** e **Patrícia Figueiredo**, que gentilmente aceitaram participar e colaborar com este trabalho fazendo parte da Banca Examinadora, meus agradecimentos!

Ao professor, **Mário Ávila**, que com muita presteza forneceu material para o desenvolvimento do trabalho.

Às amigas **Suyenne Paredes** e **Mônica Virgínia**, pelo companheirismo diário, pela amizade, compreensão e pela singular disponibilidade que emprestaram, a mim, quando precisei.

As amigas de jornada da graduação, amigas para toda vida: **Juliana Aguiar**, que com seu jeito descontraído sempre esteve presente, acompanhando de perto as etapas desse trabalho, animando-me nos momentos mais monótonos e sempre preocupada em não me deixar desanimar; **Sílvia Lucena** sempre disposta a ouvir minhas inquietações e anseios, além de colaborar em vários momentos na redação desse trabalho; **Renata Campelo** que sempre esteve pronta para colaborar comigo no entendimento de alguns trabalhos em língua estrangeira, revelando-me com suas atitudes muito carinho e colaboração acadêmica; **Elza Bernardes**, que mesmo distante, manteve-se presente, pela amizade, carinho e incentivo conferidos a mim.

A minha prima e amiga, **Érica Valois**, pela sua amizade e compreensão, mesmo distante sempre esteve do meu lado me ajudando nas horas que precisei, sobretudo nos momentos necessários ao exercício da autocrítica acadêmica e pessoal.

Ao meu primo, **Jackson Ronie**, que sempre acreditou nas minhas potencialidades me estimulando a buscar novos projetos e por estar sempre disposto a contribuir com meu crescimento profissional.

À tia **Esther Valois**, que com a simplicidade que lhe é peculiar, sua fortaleza interior, carinho, atenção e entusiasmo acadêmico soube me contagiar positivamente na elaboração do presente trabalho.

À tia **Luiza Ester** (tia Neném), que de forma, singularíssima, revelou todo o seu apoio, acompanhando-me à distância, e assim manifestando todo o seu querer bem por mim.

Ao meu namorado, **Luiz Felipe**, por ter sido compreensivo, amoroso, companheiro e paciente sempre comigo nos momentos de incertezas e dificuldades.

Aos amigos que fiz no laboratório: às minhas ex-professoras, que se tornaram colegas de laboratório, **Silvana** e **Rubenice**, animadoras do ambiente de pesquisa, além de terem contribuído, sobremaneira, com suas experiências para o enriquecimento deste projeto, quero registrar a especial admiração e o meu querer bem por vocês que se tornou ainda maior; à **Estevan** muito prestativo e sempre disposto a discutir sobre artigos relacionados ao trabalho, despertado em mim dúvidas e a necessidade esclarecê-las; ao **Lúcio** e **Marise**, companheiros em muitas horas de laboratório, sempre muito prestativos.

Ao técnico de laboratório, **Marinaldo**, sempre disponível e colaborador.

Aos professores, amigos e familiares que sempre estiveram comigo acreditando e incentivando-me nesse caminho que estou percorrendo.

Aos amigos de curso, que ao longo dessa jornada contribuíram com suas sugestões para o enriquecimento deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, sempre disposta a resolver os problemas surgidos durante esses dois anos de curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo financiamento da pesquisa.

“Saber sacrificar tudo a um dever é a principal e mais difícil ciência que nós temos de aprender na vida.”

Júlio Dinis

RESUMO

A própolis tem suas propriedades amplamente reladas na literatura, dentre elas a sua propriedade antimicrobiana vem sendo estudada com freqüência em odontologia. A sua incorporação aos dentifrícios visam auxiliar de forma mais efetiva o controle e prevenção das patologias orais através da eliminação do biofilme e combatendo de forma seletiva espécies patogênicas. No entanto, poucos estudos avaliaram a eficácia de dentifrícios à base de própolis sobre as bactérias da cavidade bucal. Desta forma, o presente trabalho se propôs a verificar a ação antimicrobiana *in vitro* em *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*. Foi avaliado a ação antimicrobiana de três dentifrícios contendo própolis encontrados no mercado, através do método de difusão e diluição em ágar, em triplicata. O *E. faecalis* apresentou halos de inibição de 9,33 mm, 10,7 mm e 14,3 mm e foram inibidas pelas seguintes diluições 1:1, 1:2 e 1:4 para Noplak, Protta e Forever Bright respectivamente. O *S. mutans* apresentou halos de 9 mm, 28,3 mm e 24,8mm, sendo inibidos nas diluições de 1:1, 1:8 e 1:2 para Noplak, Protta e Forever Bright, respectivamente. O Noplak não inibiu o *L. acidophilus*, mas houve halo para Protta e Forever Bright, respectivamente de 11,5 mm e 12,3 mm. O Noplak não apresentou atividade antimicrobiana para *C. albicans*, mas ocorreram halos de 10,7 mm e 10,2 mm para Protta e Forever Bright, respectivamente, sendo a diluição inibitória mínima de 1:1 para os dois dentifrícios. Os dentifrícios avaliados não formaram halo de inibição para *F. nucleatum* e o *A. actinomycetemcomitans*. Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que os dentifrícios Protta® e Forever Bright® possuem ação inibitória frente a *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. albicans* e que o dentifrício Noplak® possui uma menor atividade antimicrobiana, sendo limitada a *S. mutans* e *E. faecalis*.

Palavras-chaves: Própolis, doenças periodontais, microbiologia, cárie, dentifrício.

ABSTRACT

Propolis has its properties widely reported in the literature, among them its antimicrobial property has been studied frequently in dentistry. Its incorporation to dentifrices aim to help in a more effective control and prevention of oral diseases by removing the biofilm and combating selective pathogenic species. However, few studies evaluated the effectiveness of dentifrices that contain propolis on the bacteria of the oral cavity. Thus, this work proposer to verify the *in vitro* antimicrobial action on *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* sp, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecalis*, and *Candida albicans*. The antimicrobial action of 3 dentifrices containing própolis, found on the market, was evaluated by the agar diffusion and dilution methods in triplicata. *E. faecalis* presented inhibition zones of 9.33 mm, 10.7 mm, and 14.3 mm of diameter. They were inhibited at the following dilutions, respectively: 1:1, 1:2 and 1:4. *S. mutans* presented halos of 9 mm, 28.3 mm, and 24.8 and was inhibited at the dilutions 1:1, 1:8, and 1:2 by Noplak, Protta, and Forever Bright, respectively. Noplak did not inhibit *L. acidophilus*, but Protta and Forever Bright produced inhibition halos of 11.5 mm and 12.3 mm. Noplak did not present antimicrobial activity against *C. albicans*, but Protta and Forever Bright formed halos of 10.7 mm and 10.2 mm. The inhibitory dilution was 1:1 in both cases. *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* were not inhibited by any dentifrices tested. On the basis of the results obtained in this study it was concluded that the dentifrices Protta® and Forever Bright® possess inhibitoiy action against *S. mutans*, *E. faecalis*, and *C. albicans*, whereas Noplak® has a low antimicrobial activity, which is limited to *S. mutans* and *E. faecalis*.

Keywords: Propolis, periodontal diseases, microbiology, caries, dentifrices

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		p.
FIGURA 1	Dentifrícios avaliados	34
FIGURA 2	A) Dentifrícios utilizados como controle negativo e B) soluções empregadas como controles positivos.	36
FIGURA 3	Medição de uma borda a outra do halo formado, passando pelo centro do poço	39
FIGURA 4	Teste antimicrobiano para <i>A. actinomycetemcomitans</i> . A) Halo de Inibição. B) Determinação da diluição inibitória mínima do dentifrício Protta®; (F ⁻) Controle negativo manipulado; (MK ⁻) Controle negativo Mavaltikids; (CL ⁺) Controle positivo Clorexidina; (PV ⁺) Controle positivo Própolis; (N) Noplak Max®; (P) Protta®; (FB) Forever Bright®; PP – Propólis	41
FIGURA 5	Teste antimicrobiano para <i>C. albicans</i> . A) Halo de Inibição. B) Determinação da diluição inibitória mínima do dentifrício Protta®; (F ⁻) Controle negativo manipulado; (MK ⁻) Controle negativo Mavaltikids; (CL ⁺) Controle positivo Clorexidina; (PV ⁺) Controle positivo Própolis; (N) Noplak Max®; (P) Protta®; (FB) Forever Bright®; PP – Propólis	42
FIGURA 6	Teste antimicrobiano para <i>E. faecalis</i> . A) Halo de Inibição. B) Determinação da diluição inibitória mínima do dentifrício Noplak®; (F ⁻) Controle negativo manipulado; (MK ⁻) Controle negativo Mavaltikids; (CL ⁺) Controle positivo Clorexidina; (PV ⁺) Controle positivo Própolis; (N) Noplak Max®; (P) Protta®; (FB) Forever Bright®; PP – Propólis	42
FIGURA 7	Teste antimicrobiano para <i>S. mutans</i> . A) Halo de Inibição. B) Determinação da diluição inibitória mínima do dentifrício Forever Bright®; (F ⁻) Controle negativo manipulado; (MK ⁻) Controle negativo Mavaltikids; (CL ⁺) Controle positivo Clorexidina; (PV ⁺) Controle positivo Própolis; (N) Noplak Max®; (P) Protta®; (FB) Forever Bright®; (PP – Propólis	41

LISTA DE TABELAS

	p.
TABELA 01 Dentifrícios avaliados quanto ao seu potencial antimicrobiano	31
TABELA 02 Dentifrícios utilizados como controle negativo	33
TABELA 03 Meios de cultura de acordo com os microorganismos	36
TABELA 04 Tempo e forma de incubação das placas contendo os inóculos microbianos ocorridos em estufa a 37°C	36
TABELA 05 Halo de Inibição (mm) dos microorganismos avaliados em relação aos dentifrícios	38
TABELA 06 Determinação da diluição inibitória mínima (DIM)	39

LISTA DE SIGLAS

AR	Ágar Rogosa
ATCC	American Type Culture Collection
AUS	Anaeróbios da Universidade de São Paulo
BHIB	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CIM	Concentrações Inibitórias Mínimas
CL ⁺	Controle positivo clorexidina
DIM	Diluição Inibitória Mínima
EEP	Extratos Etanólicos de Própolis
F ⁻	Controle negativo manipulado
FB	Forever Bright®
GTF	Glucosiltransferase
MBC	Concentração bactericida mínima
MK ⁻	Controle negativo Mavaltikids
N	Noplak Max®
NCCLS	National Committee of Clinical Laboratory Standard
P	Protta®
PG	Propileno glicol
PP	Propólis
PV ⁺	Controle positivo Própolis
SAB	Ágar Sabouraud
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	<i>Enterococcus faecalis</i>	21
2.2	<i>Streptococcus mutans</i>	22
2.3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	22
2.4	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	23
2.5	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	23
2.6	<i>Candida albicans</i>	24
2.7	Própolis	25
2.8	Própolis em dentifrícios	30
3	MATERIAL E MÉTODO	33
3.1	Preparo dos dentifrícios	34
3.2	Controles	35
3.3	Microorganismos	36
3.4	Avaliação da atividade antimicrobiana	37
4	RESULTADOS	40
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Do ponto de vista ecológico, a cavidade bucal é semelhante às outras diversas seções que formam o trato intestinal, uma vez que também abriga uma microbiota residente com uma composição definida e característica. As principais patologias que podem afetar o ecossistema bucal – a cárie e a doença periodontal – são condições mórbidas multifatoriais, ubíquas na população, sendo mediadas pela presença de biofilmes (WEYNE; HARARI, 2003).

A presença de determinadas espécies bacterianas no biofilme tem sido considerada fator de risco para a cárie e para a doença periodontal. Algumas espécies, em diferentes proporções, estão relacionadas com a instalação de algumas doenças bucais. Entre as bactérias freqüentemente envolvidas no processo cariogênico, destacam-se: os *Streptococcus* do grupo *mutans* e os *Lactobacillus acidophilus* no que diz respeito à doença cárie e, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Veillonella parvula*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter* são freqüentemente detectados em associação com a doença periodontal (DARVEAU et al., 1997).

Em indivíduos que mantêm uma adequada higiene bucal e fazem uso comedido de sacarose, a microbiota predominante pode ser menos virulenta, podendo o indivíduo possuir placa e, ainda assim, ter saúde. Por outro lado, quando a remoção mecânica da placa é deficiente, ocorre uma seleção para certos organismos patogênicos e a placa se torna mais virulenta, podendo resultar tanto em lesões cariosas, como em doenças periodontais (TORRES et al., 2000).

Além dos métodos tradicionais da remoção de placa: como a escovação diária realizada pelo paciente; a raspagem e alisamento corono-radicular (realizado pelo profissional); o uso de agentes antimicrobianos como antibióticos, colutórios e dentifrícios, são alternativas que favorecem obtenção de um melhor controle dos patógenos bucais. De acordo com Torres (2000), para selecionar um produto antimicrobiano, deve-se levar em conta fatores como: toxicidade, microbiota residente e substantividade. O agente antimicrobiano escolhido deve reunir o maior

número possível das características citadas e sua efetividade deve ser comprovada por estudos *in vitro* e *in vivo*.

Várias categorias de agentes químicos têm sido utilizadas no controle químico da placa, através de estratégias que visam à redução da adesão bacteriana, inibição do crescimento e proliferação dos microrganismos na superfície do dente, inibição da formação da matriz intercelular da placa, modificação da atividade bioquímica da placa e modificação da ecologia da placa para uma microbiota menos patogênica (MARSH, 1992).

Além dos antibióticos convencionais e químicos sintetizados em laboratório, novas alternativas vêm sendo investigadas, incluindo-se produtos provenientes da natureza. Dentre as substâncias naturais estudadas, encontra-se a própolis uma resina produzida pelas abelhas e que têm as mais variadas funções na colméia (preenchimento de frestas, diminuição de aberturas de entrada e saída da colméia, mumificação de cadáveres de insetos, para impedimento de sua decomposição e putrefação). É utilizada, também, para cobrir as paredes internas da colméia e interior das células para defendê-las dos microrganismos, além de reparar os favos estragados e consolidar os favos móveis (GHISALBERTI, 1979).

A própolis é conhecida por suas propriedades biológicas tais como: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (PARK et al., 2002; SONMEZ et al., 2005). A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo destacada sua ação sobre *Staphylococcus aureus* (PINTO et al., 2001; FERNANDES JUNIOR et al., 2001 e 2003); *S. pyogenes* (BOSIO et al., 2000); *S. mutans* (KOO et al., 2002); bactérias da cavidade oral anaeróbias, *P. gingivalis* e *P. intermedia* (SANTOS et al., 2002) e *Candida sp* (SFORCIN et al., 2000; STEPANOVIC et al., 2003).

A comprovação da efetividade da própolis levou a indústria farmacêutica a explorar comercialmente essa substância associando-a a dentifrícios e enxaguatórios bucais. Diversas formas de substâncias têm sido incorporadas aos dentifrícios, tais como: antissépticos, extratos de ervas, enzimas químicas e naturais, íons metálicos, fluoretos, dentre outros, visando à obtenção de efeitos antiplaca (SAXTON et al., 1987).

Após um cuidadoso levantamento de dados, até o momento, poucos cientistas se propuseram estudar os efeitos da incorporação da própolis aos

dentifrícios, demonstrando sua eficácia e a segurança em seu uso. Além disso, não há critérios publicados para a padronização e controle de qualidade dos dentifrícios à base de própolis. Assim o seu uso racional com finalidade terapêutica ainda depende do conhecimento profundo das propriedades farmacológicas da própolis e do desenvolvimento de tecnologia de produção e controle de qualidade dos dentifrícios com própolis.

Dessa forma, o presente trabalho se propõe a verificar a ação antimicrobiana *in vitro*, de dentifrícios à base de própolis, sobre os microorganismos patogênicos: *S. mutans*, *L. acidophilus*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. faecalis* e a *C. albicans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Ecologicamente, a cavidade bucal é um sistema de crescimento aberto colonizada por cerca de 1000 espécies diferentes de microorganismos já detectados (WILSON, 2004). Isto significa que nutrientes e microorganismos são repetidamente introduzidos e removidos desse sistema. Para os microorganismos se instalarem na cavidade bucal é necessário possuírem capacidade de aderência às superfícies, ou de alguma forma reter-se a ela. Alguns microorganismos podem se fixar através da utilização de mecanismos específicos de aderência e outros apenas se refugiam nos sulcos, fissuras ou espaços interproximais. (JORGE, 1998; CASTRO e MOCHIDOME, 2000).

Ao desenvolverem esses mecanismos de adesão às superfícies tem início a formação do biofilme dental que pode ser definido como uma película incolor composta por diferentes espécies bacterianas, sustentadas por uma matriz de proteínas salivares, polissacarídeos, células descamadas, leucócitos e restos alimentares e que conseqüentemente ocupam diferentes nichos, dependendo de suas necessidades nutritivas e metabólicas (LOESCHE, 1993). Várias patologias estão associadas à presença do biofilme dentre elas a doença cárie e a doença periodontal.

A cárie dental está intimamente associada com a microbiota residente no biofilme dental já que os dentes são estruturas sólidas que oferecem sítios de colonização para os microorganismos tanto na região supragengival como na região subgengival (MARSH & MARTIN, 1992).

De acordo com Thylstrup e Fejerskov (2001) a cárie é um processo dinâmico que ocorre nos depósitos microbianos (placa dental nas superfícies do dente) e que resulta em distúrbio do equilíbrio entre a substância do dente e o fluido da placa adjacente. Com o decorrer do tempo o resultado é a perda de mineral na superfície do dente. Weyne e Harari (2003) descrevem a cárie como multifatorial, mas ressaltam que o único evento que exhibe relação direta com o aparecimento de lesões cariosas é a presença e a permanência de uma placa cariogênica, dominada por uma microbiota (acidogênica e ácido-tolerante) cobrindo a região afetada. A partir dessa situação muitos fatores poderiam influenciar no nível da atividade cariogênica da microbiota do biofilme: os carboidratos da dieta, os componentes

salivares e a presença de flúor ativo. Em conjunto, essas variáveis podem induzir o estabelecimento de situações que configuram quadros de “resistência” ou de “susceptibilidade” com relação ao desenvolvimento das lesões.

A cárie também é uma das principais fontes de microorganismos que induzem às patologias pulpares. Grande parte das patologias de origem endodôntica é causada pela presença de microorganismos no sistema de canais radiculares. Na maioria das vezes os agentes causadores são as bactérias, contudo, as leveduras e, ocasionalmente, outros fungos são também relatados (LEONARDO, 2005). As principais fontes de irritantes bacterianos para a indução da patologia pulpar e periradicular, são a lesão cariosa e o tecido pulpar necrosado e infectado, respectivamente. Neste contexto, as vias de acesso para as bactérias alcançarem o tecido pulpar são os túbulos dentinários, a própria exposição pulpar, o periodonto e a anacorese hematogênica (SIQUEIRA JÚNIOR; UZEDA; FONSECA, 1996).

O principal objetivo da terapia endodôntica é limpar e dar forma ao canal radicular por meio de instrumentos e substâncias químicas para irrigação, a fim de eliminar ou reduzir a quantidade de microorganismos presentes no conduto radicular. (PECIULIENE et al., 2000; SIQUEIRA et al., 1999; PAIVA, ANTONIAZZI 1993). O tratamento segue com uma correta obturação do espaço endodôntico e a aprimorada restauração do elemento dental, evitando assim a proliferação e recontaminação bacteriana (SALAZAR-SILVA, 2000).

As periodontopatias por sua vez são infecções oportunistas associadas com a formação da placa ou biofilme bacteriano supra e subgengival. (LÖE *et al.*, 1965; SOCRANSKY, 1970; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994; SOCRANSKY *et al.*, 1998). Fatores como a patogenicidade e a especificidade bacterianas, bem como fatores relacionados à predisposição do indivíduo em manifestar a doença, podem influenciar o estabelecimento, a taxa de progressão e as características clínicas das desordens dos tecidos de suporte associadas ao biofilme bacteriano (LINDHE, 2003).

Lins et al. (2007) relataram que o mecanismo da doença periodontal envolve interações complexas entre produtos bacterianos, células do hospedeiro e fatores biológicos ativos localmente produzidos, incluindo mediadores químicos, a exemplo das prostaglandinas e citocinas, cuja produção irrestrita contribuirá para o início e a progressão da referida doença, principalmente em função da sua atividade ósteo-reabsortiva.

O tratamento periodontal tem como principal objetivo modificar o biofilme subgingival dos sítios comprometidos pela doença periodontal, reduzindo ou eliminando os microorganismos que são associados à doença. A raspagem e alisamento radicular compõem o tratamento efetivo para a doença periodontal (KALDAHL *et al.*, 1988), reduzindo significativamente o nível de microorganismos subgingivais. Entretanto, a terapia mecânica nem sempre mostra resultados satisfatórios (HAFFAJEE *et al.*, 1997). Sendo assim, métodos auxiliares têm sido estudados como terapia coadjuvante à terapia mecânica periodontal, objetivando a obtenção de melhores resultados. Dentre esses métodos, a utilização de agentes antimicrobianos tem sido indicada como coadjuvante ao tratamento mecânico, tanto sistêmica quanto localmente (CIANCIO, 1999).

2.1 *Enterococcus faecalis*

Os enterococos são cocos gram-positivos que geralmente se dispõem aos pares e em curtas cadeias, e são catalase negativos (TEIXEIRA; FACKLAM, 2003). Os enterococos são microorganismos comensais que atuam como patógenos oportunistas, cujo principal reservatório humano é o trato gastrointestinal, porém ele pode ser encontrado, embora com menos freqüência, em cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina (KONEMAN, 2001).

O *E. faecalis*, na cavidade oral geram patologias associadas ao conduto radicular, causam infecções persistentes, geralmente associadas a lesões endodônticas refratárias (PECIULIENE *et al.*, 2000; LEONARDO *et al.*, 2000; STUART *et al.*, 2006; ZOLETTI, SIQUEIRA JR, SANTOS, 2006). O *E. faecalis* é resistente ao tratamento endodôntico principalmente no que diz respeito ao crescimento em pH alcalino, pois tal patógeno é capaz de sobreviver em pH na faixa de 2 a 10 (WALTIMO *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2002). Podem sobreviver em ambientes hipotônicos, hipertônicos, ácidos, alcalinos, em ambientes com falta de nutrientes, além de possuírem mecanismos de aderência nas células do hospedeiro (LOVE, 2001; FIGDOR; DAVIES; SUNDQVIST, 2003).

O sucesso no tratamento da patologia de origem endodôntica depende do controle da infecção microbiana no sistema de canais radiculares. Um entendimento

minucioso da microbiologia destas infecções é crucial para se obter êxito na terapia endodôntica (LEONARDO, 2005).

2.2 *Streptococcus mutans*

Os *S. mutans* são cocos gram-positivos que se agrupam em colônias lineares ou em pares, são anaeróbios facultativos, podendo viver na ausência de oxigênio, mas preferindo a sua presença, e, sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C (GOLD et al., 1973). É considerado um dos principais patógenos relacionados à doença cárie em virtude do fato ter sido isolado em um grande número de indivíduos acometidos por essa patologia. Além disso, está intimamente relacionada à formação de biofilmes bacterianos cariogênicos, sendo que a prevenção da doença cárie baseia-se principalmente na remoção mecânica desses biofilmes (MARSH & MARTIN, 1992).

A virulência desses microorganismos tem recebido muita atenção ao longo de várias décadas. O fator de virulência mais extensivamente estudado é a glicosiltransferase (GTF), a qual desempenha um papel importante na aderência à superfícies. A GTF é uma enzima que degrada a sacarose em seus monossacarídeos, frutose e glucose. Após a degradação da sacarose, a GTF atua sobre a glucose originando os glucanos. Esses glucanos conferem aos microorganismos a capacidade de aderir às superfícies lisas dos dentes e formar a matriz do biofilme dental (WILKINS et al., 2002; THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001).

2.3 *Lactobacillus acidophilus*

O *L. acidophilus* são bacilos gram-positivos, comumente encontrados no intestino e vagina. (TOLEDO; CASTRO, 1998). Estes microorganismos são acidogênicos e acidúricos, sendo designados de homofermentadores, pois o principal produto do metabolismo é o ácido láctico. Esse produto metabólico está envolvido na desmineralização dos dentes, em decorrência de promover uma

diminuição no pH no local da colonização bacteriana. Essas bactérias são dependentes de locais retentivos, sendo encontrados normalmente em locais profundos de uma lesão cariosa. Os lactobacilos são altamente influenciados pelo conteúdo de carboidratos da dieta alimentar e pela frequência de ingestão e, apesar de refletir um ambiente acidogênico pela sua presença, também indicam a presença de substrato para outras bactérias, como por exemplo, o *S. mutans* (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 2001).

2.4 *Fusobacterium nucleatum*

O *F. nucleatum*, é uma anaeróbia gram-negativas que não formam esporos e são encontrados na flora normal da boca desempenhando importante papel na doença periodontal e endodôntica (MARTINEZ; UZEDA, 2004; BOLSTAD et al., 1996).

As células de *F. nucleatum* são fusiformes varas de tamanho variável. Todas as cepas obtêm energia a partir da fermentação dos açúcares ou aminoácidos produzindo ácido butírico como um dos principais metabólicos. Embora *F. nucleatum* não seja considerado um importante agente de doença periodontal por si próprio, ele pode aderir a outros organismos, como *Porphyromonas gingivalis*, e contribuir para o desenvolvimento de periodontite, bem como infecções invasivas humanas da cabeça e pescoço, tórax, pulmão, fígado e abdômen (BOLSTAD et al., 1996).

2.5 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

O *A. actinomycetemcomitans* ou A.A. (como é comumente designada na comunidade odontológica) pertence à família Pasteurellaceae, é de morfologia cocobacilar, gram-negativa e de crescimento lento. Nesta família, três espécies causam infecção nos seres humanos, sendo o A.A. a mais importante. No entanto, o estado geral de saúde do hospedeiro, histórico médico e uma variedade de agressões tóxicas, traumáticas ou iatrogênicas são determinantes importantes da

doença infecciosa (GASPARETTO, ARANA-CHAVEZ, AVILA-CAMPOS, 2000; LIMA et al., 2001). Para Socransky e Hanffajee (2005) uma das associações mais fortes entre um patógeno e a doença periodontal destrutiva está relacionada ao *A. actinomycetemcomitans*.

O *A. actinomycetemcomitans* possui vários fatores de virulência. Alguns destes fatores têm a capacidade de induzir uma resposta imune intensa e/ou dificultar a defesa imune do hospedeiro, podendo explicar a possível patogenicidade desta bactéria. Um dos mecanismos de virulência de *A. actinomycetemcomitans* é a produção potencial de metabólicos prejudiciais, como uma leucotoxina que destrói especificamente leucócitos, permitindo que a bactéria se esquive de parte das defesas do hospedeiro. Além disso, tem sido demonstrado que *A. actinomycetemcomitans* é capaz de invadir células epiteliais humanas *in vitro* (ALBANDAR; RAMS, 2002).

2.6 *Candida albicans*

A *C. albicans* e outras espécies relacionadas são encontradas de forma ubíqua e comensal na microbiota de cavidades (retal, bucal, vaginal, uretral, nasal, aural) e pele humanas (SEGAL; BAUM, 1994). Estas espécies são consideradas patógenos oportunistas capazes de causar infecções variando desde desordens mucocutâneas, não comprometedoras ao indivíduo, até certas doenças invasivas, envolvendo quase todos os órgãos (SAMARANAYAKE, 1990; SAMARANAYAKE et al., 2001).

É um fungo que pode crescer sob diferentes formas, desde leveduriforme à filamentosa, devido à formação de pseudo-hifas (CANNON et al. 1995). São organismos gram-positivos, aeróbios, sendo capazes de crescer em anaerobiose (DAHLE; OLSEN, 1991). Fermentam vários carboidratos, incluindo: glicose, galactose, maltose e sacarose (MEYER et al., 1984).

As estirpes de *C. albicans* aderem às superfícies do epitélio oral (FUKAYAMA; CALDERONE, 1991), às próteses e aos aparelhos ortodônticos (BUDTZ-JÖRGENSEN et al., 1975), às superfícies radiculares (LAMKIM; OPPENHEIM, 1993), em menor intensidade às superfícies dentais limpas. Mas, na

medida em que se forma a película adquirida, essa colonização aumenta podendo ocorrer tanto através da adesão direta aos receptores da película – atuando como colonizador pioneiro – como indiretamente, pela co-agregação a outros microorganismos formadores do biofilme dental (HOLMES et al., 1995; DE REPENTIGNY et al., 2000). Após esse evento, futuras interações que são importantes para a permanência ou remoção dessa levedura na cavidade bucal, podem ocorrer entre hospedeiros e as células fúngicas (STENDERUP, 1990).

Os biofilmes contendo *C. albicans* poderiam estar implicados não apenas na candidose da mucosa oral, mas também associadas ao desenvolvimento de cárie e na patogênese das doenças periodontais (BEIGHTON et al., 1995; NIKAWA et al., 1998). Waltimo et al. (2001) sugeriram que a *C. albicans* obtém acesso aos tecidos periodontais, os quais podem sofrer efeitos citotóxicos de metabólitos fúngicos. Além disso, interações posteriores podem ocorrer entre o hospedeiro e as células que são importantes para a permanência ou remoção dessa levedura na cavidade oral.

2.7 Própolis

O termo própolis deriva da palavra grega “*pró*” que significa antes e “*polis*”, cidade, palavra empregada no sentido de defesa da colméia, cidade das abelhas. É uma substância resinosa escura e adesiva extraída de brotos de plantas, folhas de árvores ou outras partes do tecido vegetal que é eliminada juntamente com a saliva de tais insetos e é misturada com cera. É usada dentro das colméias para proteção contra outros insetos e a ação do tempo (VANHAELEN; VANHAETEN-FASTRÉ, 1979).

Os flavonóides, juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. Outros compostos são óleos voláteis e ácidos aromáticos (5 a 10%), ceras (30- 40%), resinas, bálsamo e pólen que é uma rica fonte de elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco (CASTALDO; CAPASSO, 2002; PIETTA et al., 2002).

A origem geográfica da própolis é importante no controle de qualidade inclusive para sua efetiva aplicação terapêutica (PARK et al., 2002). A proporção das substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma (STEPANOVIC et al., 2003).

Ikeno, Ikeno e Miyazawa (1991) realizaram um dos primeiros estudos com própolis sobre microorganismos cariogênicos. Nesse estudo citaram que a própolis apresenta efeitos sobre o crescimento das bactérias e atividade da glucosiltransferase (GTF) dos *S. sobrinus*, *S. mutans* e *S. cricetus in vitro* e sobre as cáries em ratos infectados com *S. sobrinus*. A própolis apresentou atividade antimicrobiana contra as três espécies testadas e inibiu tanto a síntese de glucano insolúvel em água, quanto à atividade da glucosiltransferase. Nenhum efeito tóxico da própolis sobre os ratos foi observado em condições experimentais neste estudo. Estes resultados sugerem que a própolis foi capaz de controlar a cárie dentária nos ratos do experimento.

Na periodontia, Martinez Silveira et al. (1992) observaram que pacientes jovens portadores de gengivite crônica que utilizaram solução hidroalcoólica de própolis a 1,5%, na forma de colutório, apresentaram uma regressão quase à normalidade em 80% dos casos em comparação aos pacientes de um grupo controle. Além disso, o nível de redução de placa foi mais evidente nos pacientes que empregaram a própolis do que no grupo que empregou o placebo (sem própolis) e não foi detectada nenhuma irritação da mucosa bucal, no tocante ao uso da própolis.

Gebara et al. (1996) avaliaram a ação antibacteriana de várias tinturas, dentre elas tinturas de propólis sobre *S. mutans* e *S. sobrinus in vitro*. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da própolis foram de 0,04 mg/ml e 0,02 mg/ml para *S. mutans* e *S. sobrinus* respectivamente. Com esses resultados os autores concluíram que a própolis apresentou ação antimicrobiana contra os dois microorganismos em questão e foi capaz de inibir a adesão de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Os resultados sugerem a possibilidade de emprego desse agente no controle desses microorganismos na placa bacteriana

Azevedo et al. (1999) avaliaram 50 indivíduos, de ambos os sexos e faixa etária média de 42,5 anos, objetivando isolar e identificar leveduras na cavidade bucal, com e sem candidose bucal, e determinar a DIM (Diluição Inibitória Mínima) dos produtos comerciais Própolis (Apis-Flora) e Periogard (Colgate) frente às cepas

isoladas. A contagem de UFC total/ml de saliva demonstrou um valor médio no grupo com candidose bucal maior do que no grupo controle e portadores de anormalidade. A maioria das cepas testes 95,7% foi sensível aos anti-sépticos. Os resultados indicam a possibilidade de se empregar os anti-sépticos à base de Própolis e Periogard (clorexidina), na prevenção e na terapêutica da candidose bucal.

A produção de glucosiltransferase de microorganismos orais foi estudada por Park et al. (1998) que verificaram que o *S. mutans* produzia a maior atividade da enzima. Extratos etanólicos da própolis (EEP) foram analisados para verificar se inibiam atividade dessa enzima e o crescimento bacteriano. Os microorganismos estudados foram *Streptococcus mutans* Ingbritt, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sp.*, *Actinomyces naeslundii*, *S. sanguis* e *A. naeslundii*. Todos os EEP de várias regiões do Brasil inibiram tanto a atividade da glucosiltransferase como o crescimento de *S. mutans*. O EEP do Rio Grande do Sul (RS2) demonstrou a maior inibição da atividade da enzima e crescimento das bactérias. Os autores verificaram que a própolis (RS2) continha as concentrações mais elevadas de pinocembra e galangina.

Em 2002, Gebara et al. avaliaram a atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontopatogênicas através de testes *in vitro*. As cepas bacterianas testadas foram: *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. gingivalis* e *F. nucleatum*. A CIM foi determinada utilizando o método de diluição do extrato de própolis no meio de cultura em diferentes concentrações. Os resultados demonstraram CIM de 1µg/ml para *A. actinomycetemcomitans* e *C. gingivalis*; e 0,25 µg/ml para *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum*. Alguns microrganismos que desempenham *in vivo* papel de superinfectantes também foram testados. A susceptibilidade de *C. albicans* ao extrato etanólico de própolis foi observada na concentração de 12 µg/ml. A CIM para *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* e *S. aureus* (tipo selvagem) foi de 14 µg/ml. Todos os patógenos periodontais e microrganismos superinfectantes testados foram sensíveis ao extrato de própolis.

Almeida et al. (2006) avaliou a ação de uma solução anti-séptica do extrato de própolis sobre os índices clínicos (Índice de Sangramento Gengival e Índice de Higiene Oral Simplificado) e contagem de *S. mutans*. A atividade antimicrobiana do extrato foi realizada em meio de cultura sólido para determinar a

CIM utilizando cepas de *S. mutans*. A partir da CIM do extrato, foi confeccionada uma solução para bochecho de própolis (6,25%), a qual foi utilizada e comparada com o controle positivo, clorexidina (0,12%). Através de um ensaio clínico cruzado, quinze crianças utilizaram a solução para bochecho com própolis durante 15 dias consecutivos. Após o período de intervalo de 21 dias as crianças utilizaram a solução controle. Os resultados demonstraram significativa redução do número de *S. mutans* nos tempos 24 horas, sete dias e 15 dias após o uso da solução de própolis, não diferindo da solução de clorexidina. Com isso, os autores concluíram que a solução do extrato de própolis apresentou satisfatória atividade antimicrobiana e semelhante ação da clorexidina, além de atuar sobre condições clínicas como a presença de biofilme oral e doença gengival, podendo ser empregada como agente terapêutico.

As propriedades biológicas da própolis da *Apis Mellifera* são amplamente relatadas sendo comuns variações nas mesmas em função da região onde foram produzidas. A ação antimicrobiana de própolis obtidas em três regiões do Brasil (Botucatu-SP, Mossoró-RN e Urubici-SC) foi investigada sobre linhagens isoladas de infecções clínicas humanas (*S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus sp*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*). Foram preparados extratos alcoólicos de própolis (EAP) e determinada a CIM seguida do cálculo da CIM 90%. A própolis de Botucatu foi a mais eficiente sobre *S. aureus* (0,3%v/v), *Enterococcus sp* (1,1%v/v) e *C. albicans* (2,1% v/v). Para *E. coli*, a própolis eficiente foi de Urubici (7,0%v/v) e para *P. aeruginosa* a de Mossoró (5,3%v/v). Os resultados mostram maior sensibilidade das bactérias gram-positivas e levedura em relação às gram-negativas. Os autores concluíram que, para os microrganismos testados e amostras de própolis testadas, há diferenças na atividade antimicrobiana em função do local de produção e que isso se explica pela diferença de composição química da própolis (FERNANDES JÚNIOR et al. 2006).

Panzeri et al. (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana, *in vitro*, do extrato de própolis em solução etanólica contra importantes patógenos orais (*E. faecalis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *C. albicans*, e *L. casei*). A técnica utilizada foi difusão em ágar com posterior determinação da CIM. A própolis testada demonstrou atividade contra todas as cepas analisadas. As cepas de *E. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, e *C. albicans* mostraram uma maior resposta antimicrobiana da própolis.

A atividade antibacteriana das tinturas de jucá, aroeira, gengibre, alfavaca, própolis, romã e hortelã da folha graúda foram avaliadas sobre as linhagens de *S. aureus* (ATCC 25923), *S. mutans* (ATCC 2575), *S. sobrinus* (ATCC 27609), *S. mitis* (ATCC 9811), *S. sanguis* (ATCC 10557) e *L. casei* (ATCC 7469), utilizando-se a clorexidina 0,12% como controle positivo. Determinaram a DIM em meio de cultura ágar Mueller Hinton, das tinturas nas formas pura (1:0) e diluídas de 1:1 até 1:32. Os autores observaram susceptibilidade variada das bactérias, sendo o *S. aureus* o microorganismo mais sensível. Dentre as tinturas, o jucá, a aroeira e a própolis apresentaram uma significativa atividade antibacteriana frente às linhagens bacterianas avaliadas (SOARES et al. 2006).

Koru et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana de amostra de própolis coletadas em cinco regiões diferentes, quatro regiões da Turquia e uma do Brasil, sobre nove linhagens de microorganismos anaeróbios. EEP foram preparados a partir das amostras para determinar a CIM e a CBM, sobre o crescimento dos microorganismos em estudo. O método utilizado foi o de diluição em ágar. As composições químicas orgânicas de EEPs foram determinadas por cromatografia de gás de alta resolução acoplada à espectrometria. Todos os microorganismos foram sensíveis e os valores de CIM variaram de 4 a 512 microg/ml para a atividade da própolis. A amostra da própolis de Kazan - Ancara mostrou CIM mais eficiente para os microorganismos estudados, já o CBM variou de 8 a 512 µg/ml. A morte foi observada em 4 h de incubação de *P. anaerobius*, *L. acidophilus* e *A. naeslundii*; enquanto 8 horas para *P. oralis*, *P. melaninogenica* e *P. gingivalis*; 12 h para *F. nucleatum*; 16 h para *V. parvula*. Foi demonstrado que as amostras de própolis foram mais eficientes contra as bactérias gram-positivas anaeróbias que as gram-negativas.

Cury et al. (2007) testaram a atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de uma própolis brasileira popularmente chamado a própolis vermelha, bem como analisaram sua composição química. A atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. mutans* (UA159) foi avaliada e a fração de clorofórmio foi um dos mais ativos com menor CIM. A fração hexano teve a concentração mais elevada do total de flavonóides. O EEP mostrou atividade citotóxica para as células tumorais. Quando o EEP foi analisado sete novos compostos foram encontrados, entre os quais quatro foram isoflavonoides. Os resultados mostraram que a própolis

vermelha tem compostos biologicamente ativos que nunca tinham sido notificados em outros tipos de própolis brasileiros.

2.8 Própolis em dentifrícios

Os dentifrícios têm a função principal de eliminar manchas dos dentes e fornecer à cavidade bucal uma sensação de frescor e limpeza. Com o reconhecimento do sucesso do uso de dentifrícios como veículo do flúor, outros agentes quimioprolifáticos foram acrescentados a eles. Os ingredientes dos dentifrícios têm as seguintes funções: sistema abrasivo para auxiliar a remoção de manchas, umectante para carregar tanto o abrasivo como o agente quimioprolifático, surfactante para promover espuma e ação detergente, ligador para conceder as propriedades ecológicas, e flavorizantes para dar sabor ao dentifrício (SCHEIE, 2001).

Apesar de freqüente, o controle mecânico (escovação) é realizado de maneira esporádica e ineficiente pela maioria das pessoas, significando que, mesmo após a escovação, ainda permanecem nichos organizados de placa bacteriana sobre a superfície dental que podem induzir resposta inflamatória gengival. Em virtude disto, o uso de agentes antimicrobianos naturais foram introduzidos aos dentifrícios objetivando um efeito adicional no controle da placa e gengivite com resultados favoráveis. (PEREIRA et al., 2001, PEREIRA; SAMPAIO, 2003, COUTO et al., 2002).

Panzeri (1999) realizou um estudo microbiológico da própolis para confirmar sua eficiência contra microrganismos gram-positivos, sendo estabelecida sua máxima diluição inibitória. A partir desse ensaio foi desenvolvido um dentifrício na forma de gel com 2% de própolis. O produto final mostrou as seguintes propriedades: pH levemente ácido, baixa abrasividade, densidade, viscosidade e índice de espuma compatível com os produtos do mercado. O dentifrício contendo própolis como agente terapêutico foi clinicamente testado comparando-o com um dentifrício semelhante, porém sem própolis em um ensaio “duplo-cego” envolvendo 60 adultos de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 15 e 73 anos, distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos designados “A” e “B”. Os resultados

evidenciaram que o dentífrício com própolis foi mais efetivo do que aquele destituído do agente terapêutico no controle do índice gengival, sendo uma alternativa viável como agente preventivo ou terapêutico da doença periodontal.

Em 2004, Viana et al., avaliaram comparativamente os efeitos dos dentífrícios de *juá* e *juá com própolis* na reação inflamatória dos tecidos gengivais, através de um modelo de gengivite experimental modificado. Realizaram estudo cruzado, duplo cego em 25 voluntários, no qual a escovação dental foi suprimida por 21 dias, no quarto quadrante da cavidade bucal. Os resultados demonstraram que para uma mesma quantidade de placa bacteriana, ao final do período experimental ($p > 0,01$), a média de sangramento gengival foi semelhante entre os dois dentífrícios ($p > 0,01$), embora a média do índice gengival tenha sido menor no grupo *juá* com própolis ($p < 0,01$). Portanto, os dois dentífrícios não foram eficientes em impedir a instalação de um processo inflamatório gengival, apesar do aspecto clínico de gengivite ter sido menos visível no grupo *juá* com própolis.

Estudo desenvolvido por Rosell et al. (2004) avaliou a ação antimicrobiana *in vitro* de nove pastas dentais, dentre os quais uma era à base de própolis a 33% o Prodent – Própolis. Foram utilizadas cepas de *S. mutans* de 14 indivíduos com altos níveis dessa bactéria na saliva. Os resultados foram baseados no surgimento de halos de inibição de crescimento de bactérias, como na técnica de difusão de drogas antibacteriana em ágar. Com os resultados, verificaram que ingredientes naturais não repetiram, nos dentífrícios, a mesma propriedade antimicrobiana de quando eles se encontram isolados. Os microorganismos avaliados apresentaram resistência contra o dentífrício da Prodent – Própolis.

Estudo *in vitro* conduzido por Lee et al. (2004) com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana de 14 dentífrícios à base de extratos naturais foi desenvolvido utilizando o método de difusão. Desses dentífrícios, seis tiveram efeito inibitório sobre os microorganismos avaliados. Dentre eles o *Tom's of Malne natural Toothpaste* à base de própolis formou halo de inibição para *S. mutans*, *S. sanguis*, *A. viscosus* e *C. albicans*. Esta última possuiu o menor halo.

Azevedo (2007) avaliou *in vitro* o efeito antimicrobiano de diferentes tipos de própolis coletadas no Maranhão e de um dentífrício à base de própolis, disponível no mercado. O teste de sensibilidade foi baseado na técnica de difusão em ágar com posterior leitura do halo de inibição do crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus*, com a utilização de filtros de papel embebidos nas substâncias testadas. Foram

avaliadas a própolis a 0,5% e 11,8%, geoprópolis a 0,5%, um dentifrício à base de própolis, Periogard® como controle positivo e Álcool a 70% como controle negativo. Houve formação de halos de inibição no Periogard® e no dentifrício, não sendo observada a atividade antimicrobiana da própolis e geoprópolis locais estudadas. As própolis analisadas não apresentaram potencial anticariogênico. Os autores afirmam que por ser o Maranhão um estado com flora bastante diversificada, mais estudos se fazem necessários para avaliar efeito anti-cárie com diferentes amostras das diferentes regiões.

3 MATERIAL E MÉTODO

Foram avaliados três dentifrícios à base de própolis: Noplak Max®, Protta® e Forever Bright®, cujas especificações estão descritas na TABELA 1.

TABELA 1 – Dentifrícios avaliados quanto ao seu potencial antimicrobiano.

Especificação	Dentifrício	Noplak Max® (Clorexidina a 0,2% + Cetilpiridinio + Própolis)	Protta® (Própolis + Flúor)	Forever Bright®
Fabricação		01/07		29/06/07
Lote		0701101	2013	290607 - 2
Data de Validade		01/09	08/09	06/11
Fabricante		Laboratório Daudt Oliveira LTDA.	Greenwood Indústria e Comércio LTDA	Aloe Vera of America LTDA.
Composição		Digluconato de clorexidina a 0,2%; fluoreto de sódio (corresp a 1230 ppm de flúor); aroma fresh; cloreto de cetilpiridino; cocoamido propil betaina; essência de menta AE 52992; Essência Wintergreen; extrato de própolis; extrato de equinácea; extrato de hamamelis; zinco; glicerol; hidróxido de sódio; hidroxietilcelulose; óleo de rícino hidrogenado e etoxilado; propilenoglicol; sacarina sódica; sílica; sorbitol; corantes: C.I. 42090, C.I. 47005, C.I. 17200 e água desmineralizada.	Sorbitol; benzoato de sódio; sacarina; fluoreto de sódio (1.000 ppm), flavorizante lemon mint, C.I. 42090, C.I. 19140, goma xantana, sílica abrasiva e espessante, lauril sulfato de sódio, extrato de própolis; glicerina e água.	Aloe Barbadensis; sorbitol; sílica, glicerina, sódio, lauril sulfato, carrageenam, flavor, própolis, sacarina sódica, benzoato de sódio, CI 75810.



Figura 1 – Dentifrícios avaliados

3.1 Preparo dos dentifrícios

Para o preparo das soluções a utilizou-se água destilada estéril para diluir-se o dentifrício a 30% (DUKE, FORWARD, 1982; SOUZA, 2005). Em seguida, a mistura foi vigorosamente agitada até obter-se a homogeneização. As suspensões resultantes de cada amostra foram esterilizadas por filtração, utilizando-se filtro de acetato de celulose com poro de 0,20 μm de diâmetro (DISMIC 25cs Advantec® – Toyo Roshi Kaisha LTDA – Japan) Logo após, foram retirados 1 ml de cada solução de dentifrícios. Com este volume foi iniciada uma seqüência de diluições seriadas na razão de 1:2 preparadas com 1 ml de água destilada ate a proporção de 1:32.

3.2 Controles

Foram utilizados como controle negativo um creme dental¹ cuja fórmula não continha agentes antimicrobianos e, outro creme dental sem flúor (Malvatrikids®). As especificações desses produtos estão contidas na TABELA 2.

Como controles positivos foram empregados a clorexidina 0,2% (Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda.), diluída adicionalmente a 30% para fazer correspondência à concentração de clorexidina de um dos dentifrícios avaliados, e o extrato de própolis (Apis Flora®) a 11%.

TABELA

Especificação	Dentifrício	
	Manipulado	Malvatrikids®
Data de Fabricação	10/11/07	08/07
Lote	470217	070856
Data de Validade	10/08/08	08/10
Fabricante	Farmácia Facial	Laboratório Daudt Oliveira LTDA.
Composição	Natrosol, glicerina, metilparabeno, lauril sulfato de sódio	Cellulose Gum, Glicerina, Malva Sylvestre (Mallow), Extract, sílica, benzoato de sódio, sodium benzoate sarcosinate, sorbitol, sucralose, xylitol, aroma, cl 45430 e água.

¹ Manipulado na Farmácia de manipulação Facial



Figura 2 – A) Dentifrícios utilizados como controle negativo e B) soluções empregadas como controles positivos.

3.3 Microorganismos

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram adquiridas cepas de *F. nucleatum* (ATCC 10953) e *A. actinomycetemcomitans* (AUS 431) provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e as de *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. mutans* (ATCC 00446), *L. acidophilus* (ATCC 00076) e *C. albicans*, procedentes da Instituto Oswaldo Cruz.

Para o cultivo das amostras bacterianas anaeróbias estritas (*F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans*) foi adicionado Caldo Tioglicolato (Difco™ Fluid Thioglycollate meddium – Becton, Dickinson and Company – USA) nas bactérias liofilizadas, com auxílio de uma pipeta estéril, para se obter uma suspensão de bactérias. Após homogeneização, alíquotas destas suspensões foram transferidas para tubos com Caldo Tioglicolato, adicionados 5µg/ml de Hemina (Sigma Chemical Company® – Sant Louis, USA) e 10 µg/ml de Vitamina K (Vikatron® – Ariston), conforme sugerido por Mangels (1978). As soluções de hemina e vitamina k foram esterilizadas por filtração usando filtro de acetato de celulose com poro de 0,20 µm

de diâmetro (DISMIC 25cs Advantec® – Toyo Roshi Kaisha LTDA – Japan). Os tubos foram colocados no interior de jarras de Gaspak em condições de anaerobiose, com 10% de CO₂, por 48 horas e a 37° C. A anaerobiose foi obtida através do método de passivação pelo cobre conforme descrito por Jurgensen e Jurgensen (1982).

Os cultivos de *E. faecalis*, *S. mutans* e *L. acidophilus* foram realizados em microaerofilia e a de *C. albicans* em aerobiose. Esses microorganismos foram mantidos rotineiramente através e repiques em caldo BHI (Acumedia Manufactures, Inc.Lansing, Michigan), seguido de incubação a 37°C.

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

Avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com base no método de difusão em ágar conforme descrito pelo *National Committee of Clinical Laboratory Standard* com algumas modificações. Após o crescimento dos microorganismos, uma alíquota de cada cultura microbiana foi empregada no preparo de suspensões bacterianas padronizadas em caldo BHI (para os anaeróbios estritos) ou salina (para os anaeróbios facultativos e aeróbios), e em seguida a mistura homogeneizada. Quando a mistura atingiu uma turbidez equivalente a escala de McFarland tubo N° 0.5 a suspensão foi inoculada nas placas de *Petri*, com auxílio de um *swab* estéril.

Os meios de cultura *Brain Heart Infusion Broth* – BHIB (DIALAB Diagnósticos S.A – MG, Brasil) enriquecido com Hemina (0,5mg/ml), ágar Rogosa – AR (Difco™ Rodosa SL Agar – Becton, Dickinson and Company – USA) e ágar Sabouraud – SAB (Himedia Laboratories PVT Limited – Mumbai - India) foram preparados conforme orientação do fabricante (TABELA 3).

TABELA 3 – Meios de cultura de acordo com os microorganismos.

Meios	BHIB	AR	SAB
<i>F. nucleatum</i>	X		
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	X		
<i>E. fecalis</i>	X		
<i>S. mutans</i>	X		
<i>Lactobacillus</i>		X	
<i>C. albicans</i>			X

Após a solidificação do meio nas placas de *Petri*, foram realizadas perfurações de aproximadamente 6 mm, para receber 25 µl das substâncias antimicrobianas e os controles a serem testadas. Em seguida, foi realizada a inoculação dos microorganismos em questão, mergulhando-se um *swab* estéril nos tubos de ensaios previamente preparados, que já haviam atingido uma turbidez equivalente à escala de Mc. Farland 0.5, e espalhadas na superfície do ágar solidificado.

Após essa etapa prosseguiu-se dispensando as soluções em teste sobre as perfurações. Com auxílio de uma micropipeta foram colocados sobre as perfurações, sem extravasamento, 25 µL dos agentes antimicrobianos. As placas contendo os inócuos foram incubadas de acordo com a TABELA 4.

Os testes de atividades antimicrobianas para cada microorganismo foram realizados em triplicata.

TABELA 4 – Tempo e forma de incubação das placas contendo os inóculos microbianos ocorridos

Meios	Tempo de incubação (horas)	Condições atmosféricas no interior da jarra de Gaspark
<i>F. nucleatum</i>	24	Anaerobiose e ± 10% de CO ₂
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	24	Anaerobiose e ± 10% de CO ₂
<i>E. fecalis</i>	24	± 10% de CO ₂
<i>S. mutans</i>	48	± 10% de CO ₂
<i>Lactobacillus</i>	48	± 10% de CO ₂
<i>C. albicans</i>	24	Fora da jarra

As zonas de inibição de crescimento bacteriano (halo) foram medidas com auxílio de uma régua milimetrada, sendo

e negativo. A leitura foi feita medindo-se de uma borda a outra do halo formado, passando pelo centro do poço (Figura 3).

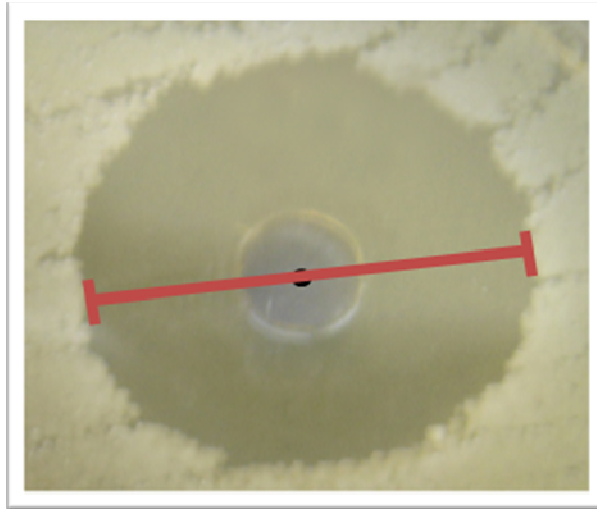


Figura 3 – Medição de uma borda a outra do halo formado, passando pelo centro do poço.

4 RESULTADOS

Os resultados da atividade antimicrobiana foram observados nas placas e mostraram resultados variados em relação aos três dentifrícios testados. Os controles positivos produziram halo de inibição demonstrando sua atividade antimicrobiana para os seis microorganismos, enquanto os controles negativos não formaram halo.

Os resultados referentes aos testes de atividade antimicrobiana dos dentifrícios sobre patógenos orais estão mostrados nas tabelas 5 e 6, a seguir.

TABELA 5 – Halo de Inibição (mm) dos microorganismos avaliados em relação aos dentifrícios.

MICROORGANISMOS	DENTIFRÍCIOS						CONTROLES*			
	N		P		FB		CL		PP	
	MA	DP	MA	DP	MA	DP	MA	DP	MA	DP
<i>F. nucleatum</i>	0	0	0	0	0	0	13	1	0	0
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0	0	0	0	0	0	13,3	2,52	0	0
<i>E. faecalis</i>	9,33	0,58	10,7	0,58	14,3	0,58	16,7	0,58	13,8	0,29
<i>S. mutans</i>	9	1	28,3	0,58	24,8	4,01	19,3	2,08	14	1
<i>L. acidophilus</i>	0	0	11,5	1,32	12,3	1,53	12,3	2,52	11	1
<i>C. albicans</i>	0	0	10,7	0,58	10,2	0,58	11,7	0,76	11,7	1,15

N - Noplak Max®

P - Protta®

FB - Forever Bright®

CL – Clorexidina

PP - Propólis

MA – Média aritmética

DP – Desvio padrão

TABELA 6 – Determinação da diluição inibitória mínima (DIM).

MICROORGANISMOS	DIM				
	N	P	FB	CL	PP
<i>F. nucleatum</i>	-	-	-	1:2	-
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	-	-	1:4	-
<i>E. faecalis</i>	1:1	1:2	1:4	1:4	1:1
<i>S. mutans</i>	1:1	1:8	1:8	1:2	1:1
<i>L. acidophilus</i> *	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	1:1	1:1	1:4	1:1

N - Noplak Max®

P - Protta®

FB - Forever Bright®

CL – Clorexidina

PP – Propólis

* Não avaliados

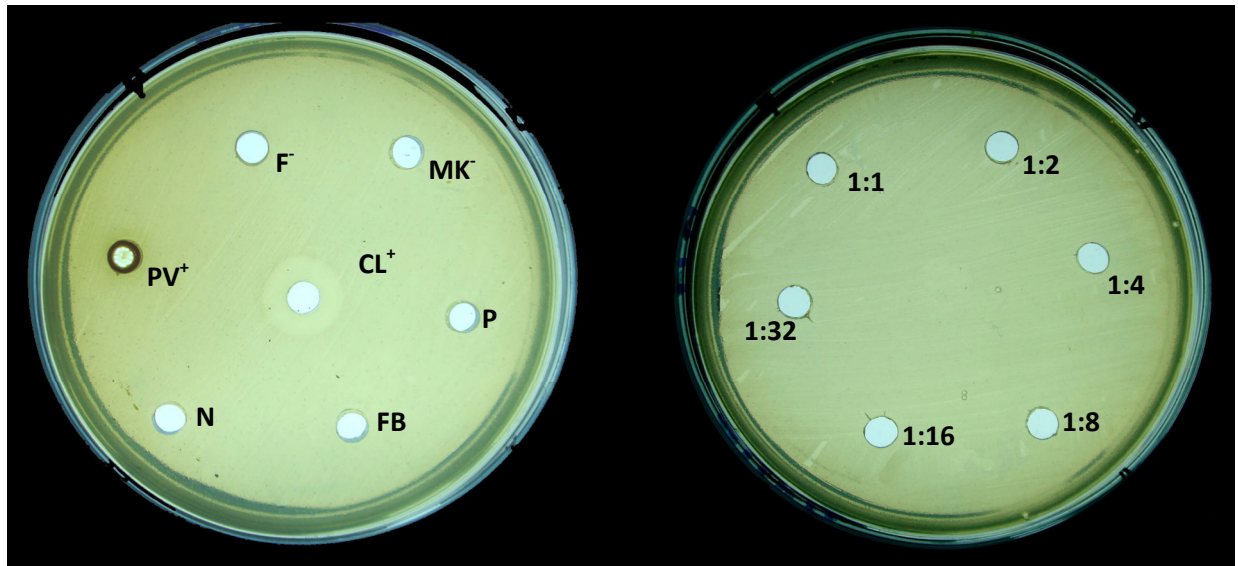


FIGURA 4 – Teste antimicrobiano *A.actinomycetemcomitans*. A) Halo de Inibição. B) Determinação da diluição inibitória mínima do dentifrício Protta®; (F⁻) Controle negativo manipulado; (MK⁻) Controle negativo Mavaltikids; (CL⁺) Controle positivo Clorexidina; (PV⁺) Controle positivo Propólis; (N) Noplak Max®; (P) Protta®; (FB) Forever Bright®; PP – Propólis.

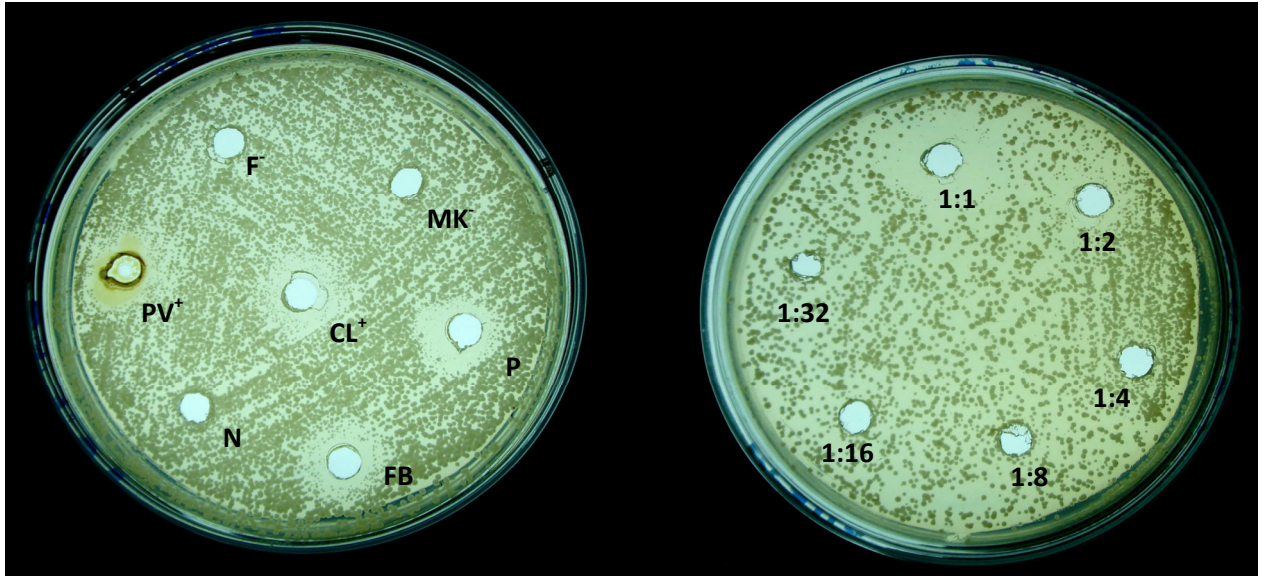


FIGURA 5 – Teste antimicrobiano para *C. albicans*. A) Halo de Inibição. B) Determinação da diluição inibitória mínima do dentifrício Protta®; (F⁻) Controle negativo manipulado; (MK⁻) Controle negativo Mavaltikids; (CL⁺) Controle positivo Clorexidina; (PV⁺) Controle positivo Própolis; (N) Noplak Max®; (P) Protta®; (FB) Forever Bright®; PP – Propólis.

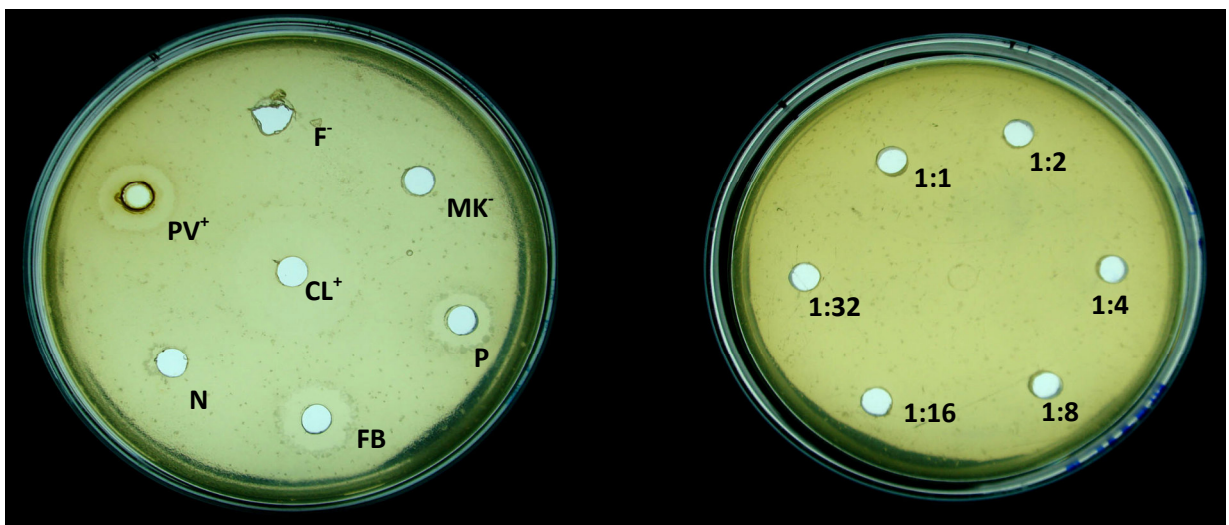


FIGURA 6 – Teste antimicrobiano para *E. faecalis*. A) Halo de Inibição. B) Determinação da diluição inibitória mínima do dentifrício Noplak®; (F⁻) Controle negativo manipulado; (MK⁻) Controle negativo Mavaltikids; (CL⁺) Controle positivo Clorexidina; (PV⁺) Controle positivo Própolis; (N) Noplak Max®; (P) Protta®; (FB) Forever Bright®; PP – Propólis.

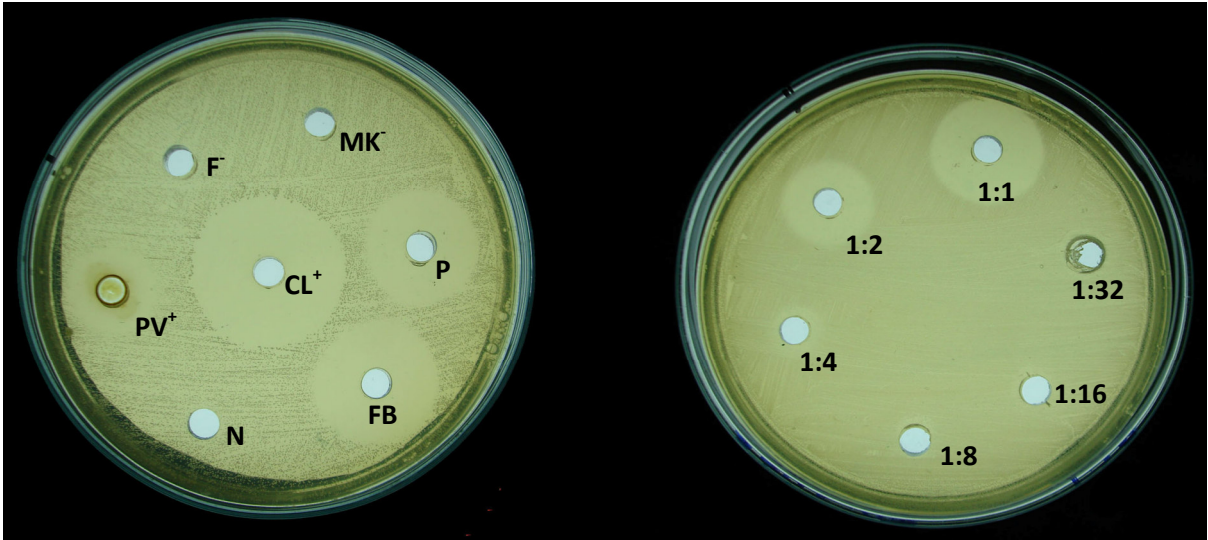


FIGURA 7 – Teste antimicrobiano para *S. mutans*. A) Halo de Inibição. B) Determinação da diluição inibitória mínima do dentifrício Forever Bright®; (F) Controle negativo manipulado; (MK⁻) Controle negativo Mavaltikids; (CL⁺) Controle positivo Clorexidina; (PV⁺) Controle positivo Própolis; (N) Noplak Max®; (P) Protta®; (FB) Forever Bright®; PP – Propólis.

5 DISCUSSÃO

A utilização de antimicrobianos através de indicações e intervenções farmacológicas mais efetivas e precisas tem sido permitida pela maior compreensão da etiopatogenia das doenças bucais. O emprego de antimicrobianos locais tem sido uma estratégia amplamente, aplicada na rotina clínica, com a finalidade de combater os efeitos indesejáveis dos agentes sistêmicos, pois agem diretamente nas bactérias presentes na microbiota oral. Nesse contexto, a própolis surge como uma proposta promissora como agente antimicrobiano por ser uma substância natural, além dos indícios de ser uma substância não citotóxica (SONMEZ et al., 2005; CURY et al., 2007). A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo destacada sua ação sobre inúmeros microrganismos orais (KOO et al., 2000; BANSKOTA et al., 2001; SWERTS et al., 2002).

O *S. mutans* de acordo com os resultados deste trabalho mostraram ser sensíveis aos três dentifrícios utilizados na pesquisa: Noplak®, o Forever Bright® e o Protta®, cujos halos de inibição formados foram de 9 mm, 28,3 mm e 24,8 mm, respectivamente. A sensibilidade do *S. mutans* aos dentifrícios com própolis foram relatadas por Panzeri et al., (1999) e Azevedo (2007). Vale ressaltar que esse último obteve resultados com um dos dentifrícios utilizados no presente trabalho, o Protta®.

Azevedo (2007) observou em seu trabalho que não se pode atribuir esse resultado exclusivamente à própolis, pois o dentifrício continha outras substâncias na sua formulação, como por exemplo, o flúor que poderia ser responsável pela atividade anticariogênica demonstrada. Entretanto, no presente estudo, obteve-se resultados positivos tanto com os dentifrícios da Protta®, à base de própolis e flúor, e também com o Forever Bright® cuja fórmula não apresenta flúor. Por outro lado, o Forever Bright® apresenta *Aloe barbadensis* em sua fórmula. A esta planta são reconhecidas propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e cicatrizante (SOEDA et al., 1966). Outro dentifrício a base de própolis e flúor, o Prodent – Própolis, foi avaliado por Rosell et al. (2004) cujos resultados demonstram resistência ao *S. mutans*. Os autores correlacionam esse resultado à concentração e a origem da própolis utilizada no dentifrício. Assim, não podemos afirmar que a própolis é a única substância responsável pelo efeito inibitório no

crescimento do *S. mutans*, pois outras substâncias presentes na composição do dentífrico poderiam estar inibindo seu crescimento.

De acordo com Koo (1999) e Park et al. (1998) o controle do crescimento do *S. mutans* ocasiona uma significativa redução na formação do biofilme sobre os dentes. Dessa forma, após a realização deste trabalho há indícios da capacidade de controle de crescimento do *S. mutans* através do uso dos dentífricos da Noplak®, Protta® e Forever Bright®. Esses dois últimos demonstraram ser mais eficazes, uma vez que apresentaram DIM de 1:8 nos dois dentífricos, tendo um possível efeito anticariogênico.

O *Enterococcus faecalis* mostrou-se sensível aos três dentífricos em teste, no entanto, o Noplak® apresentou halos de inibição 9,33 mm e DIM de 1:1, mostrando menor atividade antimicrobiana que os demais, cujos resultados demonstraram halos de 10,7 mm e 14,3 com DIM de 1:2 e 1:4 para Protta® e Forever Bright®, respectivamente. Em estudo realizado por Panzeri et al. (1999) foi observada a eficiência de um dentífrico experimental à base de própolis que se mostrou eficaz diante de cocos gram-positivos, sendo o *E. faecalis* o mais resistente dos cocos .

O *E. faecalis* são microorganismos entéricos comensais que atuam como patógenos oportunistas. São normalmente isolados em canais radiculares, no entanto, não é improvável que esteja presente no biofilme dental uma vez que têm a capacidade de expressar proteínas que dão à capacidade de adaptação e sobrevivência em diferentes condições ambientais, tais como as proteínas de superfície, fatores de aderência e substância de agregação que facilitam adesão deste microrganismo na dentina humana (SUNDQVIST, 1985; EVANS et al., 2002; SEDGLEY et al., 2005).

Os testes antimicrobianos com a *C. albicans* demonstraram sensibilidade dessas leveduras aos cremes dentais Protta® e Forever Bright® cujos halos de inibição formados foram 10,7 mm e 10,2 mm, respectivamente e DIM de 1:1 em ambos dentífricos. Furletti (2006) em seu estudo concluiu que pacientes com doença periodontal apresentaram níveis de colonização por *Candida* sp relevantes, principalmente na mucosa bucal e bolsa periodontal. Dessa forma, o uso dos dentífricos poderá ser um importante coadjuvante não somente à terapia periodontal, mas também a outras doenças da cavidade oral em que há colonização da *Candida*.

O *L. acidophilus* apresentou sensibilidade ao Protta® e Forever Bright® com halos de inibição de 11,5 mm e 12,3mm. Esse microorganismo está intimamente relacionado à doença cárie, pois seus produtos metabólicos promovem uma diminuição do pH na região colonizada ocasionando a desmineralização da superfície dental. O DIM dos *L. acidophilus* não foi avaliado, pois as cepas de *L. acidophilus* foram perdidas antes da realização desta etapa da pesquisa.

Os microorganismos periodontopatogênicos, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* avaliados não foram inibidos por nenhum dos dentifrícios empregados, sendo as únicas bactérias gram-negativas utilizadas na pesquisa. Pinto et al. (2001) observou que bactérias gram-positivas se mostram mais sensíveis que as gram-negativas aos extratos de própolis.

Alguns autores como Silveira et al. (1992), Koo et al. (2000), Swerts et al. (2002) são unânimes em relatar que a própolis tem atividade antimicrobiana sobre as bactérias da placa supragengival, em que os flavonóides atuam tanto no rompimento da membrana plasmática, como na motilidade bacteriana (MIRZOEVA et al., 1997; SWERTS et al., 2002). Porém, este efeito inibitório da própolis não pôde ser constatado após o teste com o Noplak® para a maioria dos microorganismos testados.

A origem geográfica da própolis é importante para sua efetiva aplicação terapêutica (PARK et al., 2002). Além disso, a proporção das substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma (STEPANOVIC et al., 2003). Isso poderia explicar a não formação de halo de inibição no teste com o Noplak®, em algumas situações. Outro fator que poderia justificar a não atividade deste dentifrício é a concentração da própolis presente, visto que esta tem seu efeito antimicrobiano conhecido. Vários contatos foram realizados com o fabricante, visando a obtenção de informações sobre a origem e a concentração da própolis empregadas no Noplak, sem a obtenção de um esclarecimento. Além disso, o efeito antagonista entre as substâncias presentes na fórmula, poderia ser outro fator que estaria interferindo na atividade antimicrobiana.

Gebara et al. (2002) apontaram em seu trabalho que a composição da própolis é complexa, pois possui uma composição muito variada, o que dificulta a total compreensão dos mecanismos de ação antimicrobiana dos compostos presentes. Diante desta dificuldade Park et al. (1998) destacaram a importância do isolamento e a identificação dos princípios ativos da própolis.

O presente trabalho abre um leque de opções que poderão complementar os dados obtidos, como o emprego da mesma técnica para avaliar as mesmas drogas frente a outros microorganismos orais, principalmente àqueles relacionados às doenças que têm a placa bacteriana como um dos fatores etiológicos, como a cárie e a doença periodontal.

É importante lembrar que os microorganismos foram testados isoladamente, isto é, fora das condições bucais em que há presença da saliva, pH variável e flora bacteriana variável, em termos qualitativos e quantitativos, de indivíduo para indivíduo. Tais situações são totalmente diferentes das encontradas nos testes *in vitro*, o que enfatiza a necessidade de estudos posteriores para comprovar a efetividade destes dentifrícios. Por isso, são necessárias novas pesquisas *in vivo* para que se possa confirmar a efetividade do uso de cremes dentais à base de própolis como alternativas auxiliares aos tratamentos das doenças bucais.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

1. Os resultados da atividade antimicrobiana para os dentifrícios Protta® e Forever Bright® frente aos microorganismos *S. mutans*, *E. faecalis* e *C. albicans*, demonstraram ação inibitória.
2. O dentifrício Noplak® possui uma menor atividade antimicrobiana, sendo limitada a *S. mutans* e *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

ALBANDAR, J.M.; RAMS, T.E. Risk factors for periodontitis in children and young persons. **Periodontol.** **2000**, v.29, n.1, p 207-22, Abr. 2002.

ALMEIDA, R.V.D et al. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.** João Pessoa, v.6, n.1, p 87-92, jan/abr. 2006.

AZEVEDO, Izabelle Maria Cabral de. **Avaliação do efeito anticariogênico de uma geoprópolis e de uma própolis coletadas no Maranhão.** São Luís, 2007. 13p. Monografia – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Maranhão.

AZEVEDO, Rosa Vitória Palamin et al. *Candida* sp na cavidade bucal com e sem lesão: diluição inibitória máxima de Própolis e Periogard. **Rev. Microbiol.**, vol. 30, n. 4, p.335-341, out./dez.1999.

BANSKOTA, A.H. et al. Review article – Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother Res**, v.15, n.7, p.561-571, 2001.

BEIGHTON, D. et al. Use of CHRO Magar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. **J Clin Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 3095-3027, 1995.

BOLSTAD, A. I.; H. B. JENSEN; V. BAKKEN. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 1, p. 55-71, 1996.

BOSIO, K. et al. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Lett Appl Microbiol**, v.31, n.3, p.174- 177, 2000.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; STENDERUP, A.; GRABOWSKI, M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Community. **Dent Oral Epidemiol.**, v. 3, n. 3, p. 115-119, 1975.

CANNON R.D., HOLMES A.R, MASON A.B., et al. oral *Candida*: Clearance, Colonization, or Candidiasis? **J. Dent Res.**, v.74, n. 5, p. 1152-1161, 1995.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p.S1 – S6, 2002.

CASTRO, A. M.; MOCHIDOME, F. I. et al. *Streptococcus mutans* na cavidade bucal de bebês e sua relação com a cárie dentária. **Revista do CRO-MG**, v.6, n.1,p.24-27, 2000.

CIANCIO, S.G. Local delivery of chlorhexidine. **Compend Contin Educ Dent.**, v. 20, n. 5, p. 427-432, 1999.

COUTO, G.B.L. et al. Utilização de cremes dentais contendo juá na inativação de lesões de manchas brancas. **J. Bras. Odontopediatr.**, v. 5, p. 28-34, 2002.

CURY, J. A. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **J Ethnopharmacol.**, v.113, n. 2, p. 278-83, set 2007.

DAHLE, U.R.; OLSEN I. Anaerobiosi and serum promote mycelium formation by *Candida albicans* in clones on TSBV agar. **Acta Odontol Scand.**, v. 49, p. 41-5, 1991.

DARVEAU RICHARD. P.; TANNER ANNE, PAGE ROY C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 12-32, Jun, 1997.

DE REPENTIGNY, L.; AUMONT, F.; BERNARD, K.; BELHUMEUR, P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3172-3179, 2000.

DUKE, S.A.; FORWARD, G.C. The conditions occurring *in vivo* when brushing with toothpaste. **Br Dent J.**, v. 152, p. 52-4, 1982.

ESTRELA, C.; RIBEIRO, RG; ESTRELA, C.R.A.; PÉCOR, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Braz. Dent. J.** – Ribeirão Preto, v.14, n.1, Jun 2003.

EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int Endod J**, v. 35, p. 221-228, 2002.

EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int Endod J**, v. 35, p. 221-228, 2002.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade anti *Staphylococcus aureus* de extratos de própolis (EP) de *Apis mellifera* preparados com diferentes concentrações de etanol como extrator. **Rev Ciênc Farm**, v.24, n.2, p.147–152, 2003.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, jan-fev, 2006.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **J Venom Anim Toxins**, v.7, n.2, p.173-182, 2001.

FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol**, v. 18, p. 234-239, 2003.

FUKAYAMA, M; CALDERONE, RA. Adherence of cell surface mutants of *Candida albicans* to buccal epithelial cells and analyses of the cell surface proteins of mutants. **Infect Immun Washington.**, v. 59, n. 4, p. 1341-1345, 1991.

FURLETTI, Vivian Fernandes. Suscetibilidade de isolados orais de *Candida* spp provenientes de pacientes com doença periodontal aos antifúngicos azólicos e a Anfotericina B. Piracicaba, SP, 2006. 99p. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

GASPARETTO, A.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; AVILA-CAMPOS, M. J. Aderência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* às células epiteliais bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, n. 4, p. 311-318, out./dez. 2000.

GEBARA, E. C.E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P.A. Atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontopatogênicas. **Braz. J. Microbiol.**, vol.33, n.4, p.365-369, out./dez. 2002.

GEBARA, E.C.E., ZARDETTO, C.G.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**, v.10, n.4, p.251- 6, 1996.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, n.2, p.59-84, 1979.

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

HAFFAJEE, A.D. et al. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. **J Clin Periodontol.**, v. 24, n. 5, p. 324-34, 1997.

HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 5, p. 78-111, 1994.

HOLMES, A.R. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J Gen Microbiol.**, v. 15, n. 3, p. 208-213, 1995.

IKENO K., IKENO T., MIYAZAWA C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res.**,v. 25, n. 5, p. 347-51, 1991.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia bucal**. 2 ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1998.

JURGENSEN, C.A; JURGENSEN, L.D. Passivação do cobre, alternativa para obtenção da condição de anaerobiose. **Rev. Bras. Pat. Clín**, v. 18, n.3, 1982.

KALDAHL, W.B. et al. Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. **J periodontol.**, v. 59, n. 12, p. 783-93, Dez, 1988.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**. Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 589-659.

KOO, H. **Avaliação do potencial anti-cárie e antiplaca de propólis de Apis mellifera selecionadas de duas regiões do Brasil**. Piracicaba: FOP, 1999. 117p. Tese (Doutorado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 1999.

KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens . **Archives of Oral Biology.**, v. 45, p. 141-148, 2000.

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**, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, Mai, 2002.

KORU, O. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe.**, v. 13, n. 3-4, p. 140-5, jun-ago 2007.

LAMKIM, M.S.; OPPENHEIM, F.G. Structural features of salivary function. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 4, n. 3, p. 251-259, 1993.

LEE, S.S; ZHANG, W; LI, Y. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices: Results of an in vitro diffusion method study. **JADA**, v. 135, August 2004.

LEONARDO, M. R. **Endodontia Tratamento de Canais Radiculares**. São Paulo: Artmed: 2005.

LEONARDO, M.R. et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in Endodontics. **J Endod**, v.26, n.7, p.391-394, 2000.

LIMA, F.L.; FARIAS, F.F.; CAMPOS, P.C. Leukotoxic activity of *A. actinomycetencomitans* isolated from human and non-human primates. **Braz J Microbiol**, v. 32, n. 3, p. 250-56, 2001.

LIN, S. et al. In vitro antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow-release device. **Quintessence Int.**, v. 37, n. 5, p. 391-4, mai 2006.

LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LINS, R. D.A.U. et al. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.**, Camaragibe, v.7, n.2, p. 29 - 36, abr./jun. 2007.

LÖE, H; THEILADE, E; JENSEN, B. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol**, v. 36, p. 177-87, 1965.

LOESCHE, W.J. **Cárie Dental - Uma infecção tratável**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J**, v. 34, p. 399-405, 2001.

MANGELS, J.I. et al. Quantitative Evaluation of Three Commercial Blood Culture Media for Growth of Anaerobic Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 59-62, Jan 1978.

MARSH, P. D. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J Dent Res**, v. 71, n. 7, p. 1431-1438, 1992.

MARSH, P.; MARTIN, M. **Oral microbiology** 3rd ed. London, United Kingdom: Chapman & Hall, 1992.

MARTINEZ SILVEIRA, G. et al. Efectos curativos de uma solución hidroalcohólica del propoleos cubano al 1.5% em la terapeutica periodontale. **Rev. Cubana Estomat.**, v.29, p. 14-19, 1992.

MARTINEZ SILVEIRA, G. et al. Efectos curativos de uma solución hidroalcohólica del propoleos cubano al 1.5% em la terapeutica periodontale. **Rev. Cubana Estomat.**, v.29, p. 14-19, 1992.

MARTINEZ, M. B. ; UZEDA, M. Outros Bacilos Anaeróbios. In: Luiz Rachid Trabulsi ; Flavio Althertum. (Org.). Microbiologia. 4a. ed. São Paulo: Atheneu, 2004, v. 1, p. 395-398.

MEYER S.A., AHEARN D.G., YARROW D. Genus 4. *Candida* berkholt. In: KREGER-van RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**, 3. Ed., Amrterdam: Elsevier Science Publisers, 1984: 585-844.

MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.M.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its componentes : Deffects on growth, membrane potential and motility of bacteria . **Microbiological Research**, v. 152, p. 239-246, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fourteenth Informational Supplement - M100-S14. *NCCLS*, v. 24, n. 1, 2004.

NIKAWA, H.; HAMADA, T.; YAMAMOTO, T. Denture plaque past and recent concerns. **J Dentistry.**, v. 26, p. 299-304, 1998.

PAIVA, J.G.; ANTONIAZZI, J.H. **Endodontia: Bases para a prática Clínica**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas. 1993.

PANZERI, H. et al. Preparation and antimicrobial activity of gelatin microparticles containing propolis against oral pathogens. **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 32, n. 2, p. 229-38, Fev 2006.

PANZERI, H. et al. Um dentifrício experimental contendo própolis: avaliações físicas, microscópicas e clínicas. **Rev. ABO Nac**, v.7, n.1, p. 26-30, fev-mar 1999.

PARK Y.K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr Microbiol.**, v. 36, n.1, p. 24-8, Jan 1998.

PARK Y.K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciênc Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y.K. et al. Effects of própolis on *S. mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Rev Microbiol.**, v. 29, n. 2, p. 143-148, 1998.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciênc Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PECIULIENNE, V., BALCIUNIENE, I., ERIKSEN, H.M., HAAPASALO, M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J. Endod.**, v.26, p.593-5, 2000.

PEREIRA, J.V.; SAMPAIO, F.C. Estudos com o extrato da *punica granatum linn* (roma): Efeito antimicrobiano *in vitro* e avaliação clínica de um dentifrício sobre microorganismos do biofilme dental. **Jornal da Aboprev.**, v. 8, Fev-Abr 2003.

PEREIRA, J.V.; SILVA, S.C.; FILHO, L.S.; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcolico da *punica granatum linn* sobre microorganismos formadores de placa bacteriana. **Revista Periodontia.**, v. 12, p. 56-64, 2001.

PIETTA P.G. et al. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p.S7-S20, 2002.

PINTO M.S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.38, n.6, p.278-283, 2001.

PINTO, M.S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.38, n.6, p.278-283, 2001.

ROSELL, F.L. et al. Atividade antimicrobiana de substâncias naturais em dentifrícios. **Saúde rev.** Piracicaba, v. 6, n. 14, p. 39-44, 2004.

SALAZAR-SILVA, J. R. **Avaliação da adesividade do cimento ketac-cem na superfície de dentina radicular tratada com diferentes substâncias**. 65f. Tese Doutorado. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. 2000.

SAMARANAYAKE, L.P. Oral candidosis: an old disease in new guises. **Dent. Update**, v. 17, p. 36-38, 1990.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; POW, E.H.; BEENA, V.T.; YEUNG, K.W. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 3296-3302, 2001.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.; RODRIGUES, P.H.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.; FARIAS, L. M., MOREIRA, E.S. Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromona gingivalis*) to Propolis (Bee Glue) and other Antimicrobial Agents. **Anaerobe**, v. 8, n. 1, p. 9-15, 2002.

SAXTON, C.A.; LANE, R.M.; VAN DER OUDERAA, F. The effects of a dentifrice containing a zinc salt and a non-cationic antimicrobial agent on plaque and gingivitis. **J. Clin. Periodontol. Copenhagen**, v.13, p. 144-8,1987.

SCHEIE, A. Quimioprofilaxia da cárie dentária. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 3 ed. São Paulo: Santos. 2001.

SEDGLEY, C. M.; MOLANDER, A.; FLANNAGAN, S. E.; NAGEL, A. C.; APPELBE, O. K.; CLEWELL, D. B.; DAHLÉN, G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus spp.* **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, p. 10-19, 2005.

SEGAL, E.; BAUM, G.L. **Pathogenic yeasts and yeast infections**. CRC, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994. 297p.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, A. Jr.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v.73, n.1-2, p. 43- 249, 2000.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; DE UZEDA M.; FONSECA M. E. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. **J. Endod.**, v. 22, n. 6, p. 308-310, 1996.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; LIMA, K.C.; MAGALHÃES, F.A.C.; LOPES, H.P.; UZEDA, M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. **J Endod.** 1999;25:332-5

SOARES, D.G.S. et al. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. **Revista Odonto Ciência** – Fac. Odonto/PUCRS, v. 21, n. 53, jul./set. 2006.

SOCRANSKY S.S.; HANFFAJEE, A.D. Microbiologia da Doença Periodontal. In: LINDHE J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4.ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 111p

SOCRANSKY, S.S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, p. 134-44, 1998.

SOCRANSKY, S.S. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. **J Dent Res**, v. 49, p. 2003-22, 1970.

SOEDA M, OTOMO M, OME M, KAWASHIMA K. Studies on anti-bacterial and anti-fungal activities of Cape aloe. **Nippon Saihingaku Zasshi.**, v. 21, p 609-614, 1966.

SONMEZ S; KIRILMAZ L; YUCESYOY M; YÜCEL B; YILMAZ B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **J Ethnopharmacol**, v. 102, n.3, p. 371-6, Dez, 2005.

SOUZA, Juliana Garcia Mugnai Vieira. **Avaliação da ação antimicrobiana de dentífrifos fluoretados comparado com hidróxido de cálcio através da cultura de microorganismos presentes na lesão de cárie dentária**. Marília, 2005. 83p. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Ciências Odontológicas – Universidade de Marília.

STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol Scand.**, v.48, n. 1, p. 3-10, 1990.

STEPANOVIC, S. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiol Res**, v.158, n.4, p.353-357, 2003.

STEPANOVIC, S. et al. In vitro antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. **Microbiol Res**, v.158, n.4, p.353-357, 2003.

STEPANOVIC, S.; ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC-VLAHOVIC, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. **Microbiol**

Res, v.158, n.4, p.353-357, 2003.

STUART, C.H. et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod**, v.32, n.2, p.93-8, 2006.

SUNDQVIST, G; BYSTRÖM, A. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scan J Dent Res**, v.89, n.5, p.321-328, 1985.

SWERTS M.S.O. et al. Atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias bucais . JBE - **Jornal Brasileiro de Endo/Perio.**, v. 3, n. 10, p. 256-261, 2002.

TEIXEIRA. L.M.; FACKLAM, R.R. Enterococcus. In: MURRAY, P.R. *et al.* (eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003. p. 422-33.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 3 ed. São Paulo: Santos. 2001

TOLEDO, M. R. F.; CASTRO, A. F. P. Outras Bactérias Aeróbias e anaeróbias facultativas . In: TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu. 1998.

TORRES C.R.G.; KUBO, C.H.; ANIDO, ANDRÉA A.; RODRIGUES, J. R. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v.3, n.2, jul./dez, 2000.

VANHAELEN M; VANHEELEN-FASTRE R. Própolis: Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. **J. Pharm. Belg.**, v.34, n. 5, p. 253-259, 1979.

VIANA E.M. et al. Estudo clinico comparativo entre dentifricios a base de jua e jua com propolis em gengivite experimental em humanos. **Revista Periodontia.**, v. 14, n. 4, dez 2004.

WALTIMO, T. M.; DASSANAYAKE, R.S; ORSTAVIK, D. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 16, p. 106-112, 2001.

WALTIMO, T.M.T., SIRÉN, E.K., ORSTAVIK, D., HAAPASSALO, M.P.P. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. **Int Endod J**, v.32, n.2, p.94-98, 1999.

WEYNE, Sergio de Carvalho; HARARI, Sônia G. Cariologia: Implicações e aplicações clínicas. In: BARATIERI, Luiz Narciso et al. **Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades**. São Paulo: Quintessence, 2003.

WILKINS, J.C.; HOMER, K. A.; BEIGHTON, D. Analysis of *Streptococcus mutans* Proteins Modulated by Culture under Acidic Conditions. **Applied and environmental microbiology**. London, United Kingdom, Vol. 68, No. 5, May 2002, p. 2382–2390.

WILSON, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem. Photobiol**, v. 3, p. 412-8, 2004.

ZOLETTI, G.O; SIQUEIRA JR, J.F.; SANTOS, K.R. Identification of *Enterococcus faecalis* in Root-filled Teeth with or Without Periradicular lesions by culture-dependent and independent approaches. **J Endod**, v. 32, n.8, p. 722-6, 2006.