

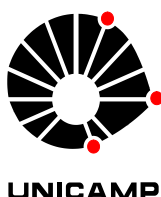
Laila Facin de Paula Eduardo

Isolamento e identificação de compostos
bioativos da geoprópolis (*Melipona scutellaris*)
bioguiado pelo efeito antimicrobiano

Isolation and identification of the bioactive
compounds of geopropolis (*Melipona scutellaris*)
bioguided by the antimicrobial effect

PIRACICABA - SP

2014



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Laila Facin de Paula Eduardo

Isolamento e identificação de compostos bioativos da
geoprópolis (*Melipona scutellaris*) bioguiado pelo efeito
antimicrobiano

Isolation and identification of the bioactive compounds of
geopropolis (*Melipona scutellaris*) bioguided by the
antimicrobial effect

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Odontologia, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Dissertation presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for degree of Master in Dentistry, in the area of Pharmacology, Anesthesiology and Therapeutics.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Coorientador: Prof. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação
defendida pela aluna Laila Facin de Paula Eduardo,
e orientada pelo Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

PIRACICABA – SP

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

P281i Paula-Eduardo, Laila Facin de, 1984-
Isolamento e identificação de compostos bioativos da geoprópolis (*Melipona scutellaris*) bioguiado pelo efeito antimicrobiano / Laila Facin de Paula Eduardo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Pedro Luiz Rosalen.

Coorientador: Cíntia Pereira Machado Tabchoury.

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

1. *Streptococcus mutans*. 2. Própolis. 3. Agentes antibacterianos. I. Rosalen, Pedro Luiz, 1960-. II. Tabchoury, Cíntia Pereira Machado, 1969-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Isolation and identification of bioactive compounds of geopropolis (*Melipona scutellaris*) bioguided by the antimicrobial effect

Palavras-chave em inglês:

Streptococcus mutans

Propolis

Antibacterial agents

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Pedro Luiz Rosalen [Orientador]

Masaharu Ikegaki

Bruno Bueno Silva

Data de defesa: 15-12-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 15 de Dezembro de 2014, considerou a candidata LAILA FACIN DE PAULA EDUARDO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pedro Luiz Rosalen".

Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Masaharu Ikegaki".

Prof. Dr. MASA HARU IKEGAKI

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Bruno Bueno Silva".

Prof. Dr. BRUNO BUENO SILVA

Resumo

Os produtos naturais, comprovadamente, têm sido uma fonte promissora para descoberta de novos compostos bioativos. Dentre eles, a própolis coletada por abelhas *Apis mellifera* possui atividades biológicas descritas na literatura como anticárie, antibacteriana, anti-inflamatória, entre outras. Entretanto, a maioria dos estudos sobre própolis se refere àquelas coletadas por *A. mellifera* e pouco se tem conhecimento de outras, como a geoprópolis, produzida por abelhas sem ferrão do gênero *Melipona*. Em estudos recentes, a geoprópolis apresentou promissoras atividades antimicrobiana e anti-inflamatória, porém estas pesquisas ainda não evidenciaram quais as substâncias responsáveis por tais ações biológicas, especialmente contra o biofilme oral cariogênico. Portanto, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar o composto ativo da geoprópolis de *Melipona scutellaris* com atividade contra biofilme formado por *Streptococcus mutans*. Este objetivo foi alcançado por meio das seguintes metodologias: 1- fracionamento bioguiado do extrato etanólico da geoprópolis (EEGP); 2- isolamento e identificação do composto ativo; 3- avaliação do potencial anticárie do composto ativo utilizando modelo *in vitro* de inibição de biofilme oral monoespécie. Como resultado do fracionamento bioguiado foi isolado e identificado o composto nemorosona ($C_{33}H_{42}O_4$, MM= 502 g/mol), uma benzofenona prenilada. A concentração inibitória mínima da nemorosona foi de 6,25 – 12,5 µg/mL e na concentração de 100 µg/mL foi capaz de inibir em 95% a aderência do *S. mutans* em biofilme formado em microplacas de fundo côncavo. Em biofilme formado em discos de hidroxiapatita, a nemorosona na concentração 250 µg/mL (0,50 mM) reduziu 65 % do peso seco, mais de 70% dos polissacarídeos e 48% da quantidade proteica além de diminuir a viabilidade bacteriana, quando comparada com o controle negativo (veículo, $p < 0,05$). Estes resultados não diferiram estatisticamente da clorexidina a 0,12% (1,33 mM) ($p > 0,05$). Portanto, concluímos que a nemorosona é um composto ativo isolado e identificado da geoprópolis com atividade antibiofilme de *S. mutans* com capacidade de alterar a composição bioquímica da matriz do biofilme de *S. mutans*, o que torna este composto promissor agente químico para o controle do biofilme oral.

Palavras chave: Geoprópolis. Biofilme oral. *Streptococcus mutans*. Nemorosona.

Abstract

Natural products have been demonstrated a promising source to discover new bioactive compounds. Among them, the propolis collected by *Apis mellifera* bees has biological activity described in the literature as anticarcinogenic, antimicrobial, anti-inflammatory, besides other activities. However, most of the studies on propolis refer to those collected by *A. mellifera* and little is known about others as geopropolis, which is collected by stingless bees of the genus *Melipona*. In recent studies, geopropolis presented promising antimicrobial and anti-inflammatory activities, but these studies have not revealed which is (are) the substance(s) responsible(s) for such biological activities, especially against the cariogenic oral biofilms. Therefore, the objective of this study was to isolate and identify the active compound from *Melipona scutellaris* geopropolis, which has activity against the biofilm formation by *Streptococcus mutans*. This goal was achieved by the following methodologies: 1- bioassay-guided fractionation of the geopropolis ethanolic extract (EEGP); 2- isolation and identification of the active compound; 3- anticarcinogenic potential assessment of the active compound using an *in vitro* model of inhibition of the oral monospecies biofilm. As result of the bioassay-guided fractionation, the poliprenil benzophenone compound named nemorosone ($C_{33}H_{42}O_4$, MW=502 g/mol) was isolated and identified. The nemorosone's minimum inhibitory concentration (MIC) was 6.25 – 12.5 $\mu\text{g/mL}$ and the concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ was capable to inhibit by 95% the adherence of *S. mutans*'s biofilm formed in U-bottom microtiter plates. In biofilm formed in hydroxyapatite disks, the nemorosone concentration of 250 $\mu\text{g/mL}$ (0.5 mM) reduced 65% of the dry weight, more than 70% of the polysaccharides and 48% of the protein content. In addition, it reduced the bacterial viability when compared to negative control (vehicle, $p < 0.05$). These results did not differ statistically from chlorhexidine 0.12% (1.33 mM) ($p > 0.05$). Therefore, the conclusion is that nemorosone is the active compound isolated and identified from geopropolis with antibiofilm activity that is able to alter the biochemical composition of the *S. mutans* biofilm matrix, it makes this chemical compound promising to oral biofilm control.

Keywords: Geopropolis. Oral biofilm. *Streptococcus mutans*. Nemorosone.

Sumário

Dedicatória	xiii
Agradecimentos	xv
Agradecimentos especiais	xvii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: Isolation of nemorosone from Brazilian geopropolis bioguided by the antimicrobial activity of <i>Streptococcus mutans</i>	6
CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade e Odontologia de Piracicaba/UNICAMP	32
ANEXO 2: Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético	33
ANEXO 3: E-mail de confirmação da submissão do artigo referente ao Capítulo 1	36

Dedicatória

À minha mãe, exemplo de dedicação e amor ao próximo;
Ao meu pai, sempre presente nos meus pensamentos e memória;
Ao meu esposo pelo entusiasmo, coragem e ajuda verdadeira;
À amada filha, amor na forma de criança, minha mestra desde o primeiro dia de vida.

“Gratidão é dívida que não prescreve”

Autor Desconhecido

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), na pessoa do diretor **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henrique**.

À coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, **Profª. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**.

À **Profª. Dra. Juliana T. Clemente Napimoga**, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo**, chefe do departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade**, coordenador da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudo (2011/16501-3), concedidos para a realização deste trabalho.

À **Sra. Érica Alessandra Sinhoreti** e à **Sra. Roberta Clares Morales**, membros da Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pela solicitude e presteza de seus serviços.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, por ter me dado a vida e por tê-la mantido sempre com tantas alegrias e repleta de pessoas especiais.

Ao meu orientador e amigo, **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, por ter me aceito e recebido como orientada, pelos seus valiosos ensinamentos profissionais, que foram a base da minha formação científica e também pelos exemplos de conduta como pessoa.

A minha co-orientadora, **Prof^a. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, por ter sempre uma palavra de ajuda e conforto, exemplo de que sucesso e humanidade andam lado a lado.

Ao **Prof. Dr. Severino Matias de Alencar** pela fundamental colaboração desde o início deste trabalho.

Aos membros da minha banca de qualificação, **Prof. Dr. Severino Mathias de Alencar**, **Prof^a. Dr^a Vivian Fernandes Furletti Góes**, **Prof^a. Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte** e **Prof^a. Dr^a. Carina Denny** por todas as valorosas contribuições a esse trabalho.

Aos professores da área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da FOP/UNICAMP, especialmente aos queridos mestres que tanto admiro: **Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Volpato**, **Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade** e **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo**. Agradeço por todo o aprendizado, apoio e pela convivência tão harmoniosa.

Ao **Sr. José Emídio Borges de Souza**, pela receptividade e gentil fornecimento do material necessário para que este estudo fosse realizado.

A todos os técnicos e integrantes do laboratório do Prof. Severino, em especial à **Adna e Ivani**, pelo grande auxílio e paciência.

À **Prof^a Dra. Isabel Alves dos Santos**, curadora da Coleção Entomológica Paulo Nogueira Neto do Instituto de biociências da USP (CEPANN- IBUSP) pelo depósito das abelhas.

À **Eliane**, sempre presente nas horas mais difíceis no laboratório. À **Elisa**, pela sua simpatia, amizade e por todas as ajudas oferecidas.

Aos colegas que estão ou já passaram pela área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica e com quem tive o prazer de conviver: **Marcos, Ana Paula, Lívia, Marcelo, Luiz, Bruno, Carina Denny, Luciano, Cleiton, Camila, Luciana Berto, Karina Cogo, Carol, Jozy, Bruno Nani, Fernando, Sérgio, Felipe, Verônica, Larissa e Giovana**. Agradeço pela união, pelos momentos de descontração, pela ajuda nos trabalhos.

Aos colegas de bancada, em especial a **Livia e Marcos**, que todas as dúvidas que tive foram atendidas com muita paciência e entusiasmo, muito obrigada.

Aos amigos de todas as horas: **Aline, Paula, Talita, Bruna, Irlan, Jonny e Bruno (Bigode)**. Obrigado pela companhia e pela amizade. O apoio de vocês foi fundamental!

A **Creche CECI – FOP**, coordenadora, professoras, estagiárias e funcionárias que na minha ausência fizeram as horas da minha filha mais divertida, vocês cuidaram da Luísa com muito carinho e respeito. Muito obrigada!

A **minha mãe**, Maria Helena por tudo que sempre me proporcionou em termos de educação, carinho, cuidado, apoio, de valores éticos e morais. Nesse período foi minha “super mãe”, ajudou em todas as horas que mais precisei, e com o dobro de amor cuidou do meu bem maior, minha Luísa, que em suas mãos foi e será uma criança feliz. Minha gratidão eterna.

Ao **Sérgio**, marido, amigo, companheiro e pai amoroso. Por estar sempre ao meu lado, com sua paciência, compreensão e apoio, que me fizeram seguir nas horas mais difíceis e alcançar este objetivo.

A **Luísa**, que veio com toda a energia que faltava para impulsionar minha vida, turbilhão de sensações me fazendo uma pessoa melhor. Tu és dádiva e dívida em minha vida. Por você, meu amor, meu tudo.

A “família do arrepio”, pela compreensão, ajuda e carinho em todos os momentos. Obrigada, **Rogério, Ana e Isa!**

Aos meus sogros, cunhados e cunhadas, incluindo as avós que ganhei ao entrar para essa família tão maravilhosa que sempre me apoiaram nesse jornada.

A toda minha família, tios(as), primos(as), avó, que durante este tempo me apoiou mesmo a distância e compreendeu minha ausência.

Quero também agradecer a todos que direta ou indiretamente estiveram presentes na minha caminhada para a realização desse sonho.

Por fim, agradeço a você leitor, que é a razão máxima a que se destina esse exemplar de dissertação.

“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha juntos é realidade” - Raul Seixas

INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais para o tratamento de algumas doenças prevalentes como é o caso da cárie dental, existe há muito tempo, seja de forma empírica ou com base em evidências científicas. Das 1.184 novas substâncias químicas introduzidas no mundo entre 1981 e 2010, mais da metade (74%) são oriundas de produtos naturais, semissintéticos análogos a produtos naturais, ou compostos sintéticos baseados em produtos naturais (Newman & Cragg, 2012). Mesmo assim, os produtos naturais continuam sendo uma fonte pouco explorada de substâncias bioativas considerando a biodiversidade da flora mundial, particularmente com atividade antimicrobiana, e suas descobertas poderiam ser usadas como alternativas ou adjuvantes na prevenção e controle da cárie dental e outras doenças da cavidade oral (Jeon et al., 2011).

A cárie dental, uma doença infecciosa, multifatorial, biofilme dependente, que embora tenha sua prevalência reduzida nos últimos anos graças à ação dos fluoretos, ainda tem uma ocorrência elevada no mundo, acometendo diversas faixas de idade (Rugg-Gunn, 2013). De acordo com a última avaliação das condições de saúde bucal da população brasileira, a prevalência de cárie dentária em crianças entre 18 e 36 meses de idade alcança 27% e, aos 5 anos, 59% apresentam a doença. Na dentição permanente a situação agrava-se, pois quase 70% das crianças de 12 anos possuem pelo menos um dente com experiência de cárie (Brasil, 2011).

Estudos da área de cariologia relatam que, dentre as várias bactérias presentes no biofilme bacteriano dental, microrganismos do gênero *Streptococos* especialmente da espécie *S. mutans*, tem íntima relação com o processo de iniciação da lesão cariiosa (Höfling et al., 1999; Mattos-Graner et al., 2000; Alam et al., 2000; Koo et al., 2002; Stamford et al., 2005). A formação do biofilme inicia-se por meio da película adquirida, que recobre a superfície do esmalte dental com uma camada amorfa acelular constituída por glicoproteínas salivares, proteínas, lipídeos e componentes do fluido gengival (Marsh & Martin, 2002). Assim, durante o desenvolvimento do biofilme oral (Figura 1), são reconhecidas diferentes etapas:

1. *Adsorção de bactérias na superfície do dente.* Nessa fase, as bactérias colonizadoras se adsorvem a superfície do dente e começam a sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis, iniciando a formação de uma matriz, que garante a adesão do biofilme no dente. Essa matriz de polissacarídeos extracelulares tem importante função em

armazenar nutrientes e água, além de proteger bactérias de resposta imune, “predadores” e agentes antimicrobianos que poderiam estar presentes na boca (Marsh, 2004; Vacca-Smith et al., 1996);

2. *Interação físico-química das bactérias com o biofilme.* As bactérias orais possuem mais de um tipo de proteína de adesão na sua superfície celular (adesinas) e participam de várias interações com moléculas presentes na boca e também com receptores de outras bactérias (Marsh, 2004);

3. *Adesão entre outros microrganismos.* Microrganismos colonizadores interagem com receptores de adesão específicos de outros microrganismos e dessa forma aumentam a densidade do biofilme. A eficiência das interações metabólicas entre as bactérias na cadeia alimentar pode ser aumentada se elas estiverem em estreito contato com o biofilme. O aumento da densidade do biofilme, com o tempo, implica em importantes mudanças no metabolismo bacteriano (Marsh, 2004);

4. *Multiplificação dos microrganismos, levando ao crescimento e formando uma superfície tridimensional e funcionalmente organizada.* A produção de polímeros resulta na formação complexa de matriz extracelular, composta por polissacarídeos solúveis e insolúveis com atividade biológica e capacidade de reter nutrientes e água. O *S. mutans* tem a capacidade de produção de glucanos na presença de sacarose, o que contribui para a formação de um biofilme rico em polissacarídeos e altamente acidogênico, causando a desmineralização do esmalte dental (Bowen & Koo, 2011);

5. *Desprendimento de bactérias do biofilme.* As bactérias podem responder a sinais do meio ambiente com o passar do tempo, atingindo o estágio de maturidade, e parte deste biofilme se destaca da superfície do dente e dessa forma pode colonizar outros locais. (Marsh, 2004; Vacca-Smith et al., 1996; Li et al., 2003).

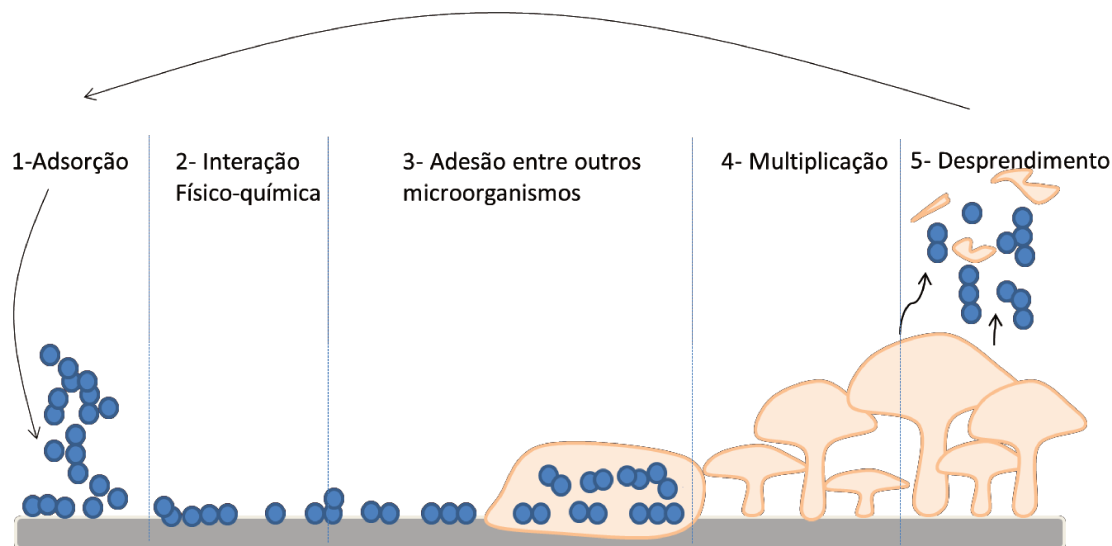


Figura 1: Etapas de formação do biofilme oral.

Adaptado e disponível em: <http://cmapspublic2.ihmc.us/rid=1GNFYDC61-QGRZKFFN/Etapas%20de%20forma%C3%A7%C3%A3o%20do%20Biofilme.bmp>

O processo de formação da lesão de cárie é dinâmico, complexo e multifatorial, resulta do desequilíbrio entre a perda de minerais (desmineralização) e o ganho de minerais (remineralização) do dente. O pH se mantendo acima de 5,5 (pH crítico para a hidroxiapatita) é considerado em um estado saudável e equilibrado. A desmineralização ocorre quando bactérias cariogênicas da cavidade oral metabolizam carboidratos fermentáveis e que tem como produto final a geração de íons H^+ (ácido) deixando o pH do biofilme abaixo de 5,5. Essa condição química leva a dissolução de hidroxiapatita, preferencialmente da superfície do esmalte do dente, favorecendo a desmineralização do esmalte e o desenvolvimento e progressão da lesão de mancha branca, primeiro sinal clínico da doença (Thylstrup & Fejerskov, 2001).

Dessa forma, estratégias para prevenção ou controle da cárie dental ainda devem ser estudadas. Uma destas estratégias seria a atenuação nos fatores de virulência dos microorganismos envolvidos nesta doença por agentes químicos, que podem inibir ou reduzir os polissacarídeos do biofilme dental, responsáveis pela aderência do microorganismo na superfície dental, ou interferir na redução da produção de ácidos pelos microorganismos, causando a desmineralização dental resultando finalmente numa menor atividade/ausência da cárie (Koo et al., 1999; Duarte et al., 2003).

Entre os agentes químicos com propriedade antibiofilme dental, destaca-se a própolis, uma substância natural resinosa, não tóxica, coletada por abelhas *Apis mellifera*

de diversas plantas (Silva et al., 2008), que é descrita na literatura como responsável por várias propriedades terapêuticas, tais como: antimicrobiana, anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer e outras (Kujumgiev et al., 1999; Silici et al., 2005; Scazzocchio et al., 2006; Kumazawa et al., 2007; Awale et al., 2008). A complexidade química da própolis é notável, sendo que vários compostos podem ser encontrados na diversidade da flora visitada pela abelha, tais como flavonoides, ácidos cinâmico, ácidos graxos, ésteres, aldeídos, terpenos, esteróides, aminoácidos, cetonas, benzofenonas, entre outros (Koo et al., 1999; Koo et al., 2005; Silva, et al., 2008; Farnesi et al., 2009; Buriol et al., 2009; Castro et al., 2009, Sforcin & Bankova, 2011, Koo et al., 2000). Além disso, outros fatores como ambientais, sazonais e ecológicos podem influenciar quali e quantitativamente na composição química (Sforcin et al., 2000; Castro, et al., 2007). Tal variação química observada é descrita como responsável pela diferença de atividade biológica e eficácia (anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer e outras) entre os diferentes tipos de própolis (Koo et al., 2002; Castro et al., 2007).

Entre outras atividades, a ação antimicrobiana vem sendo relatada em diversos tipos de própolis (Duarte et al., 2003; Orsi et al., 2007; Silva et al., 2008; Castro et al., 2009), inclusive contra estreptococos do grupo mutans (Koo et al., 2005; Duarte et al., 2006; Dualibe et al., 2007; Simões et al., 2008), atuando de várias formas, como na inibição das enzimas glucosiltransferases (Gtf), um dos principais fatores de virulência do biofilme cariogênico relacionado à aderência do microrganismo ao biofilme (Koo et al., 2002).

Até o momento, estas atividades biológicas são relatadas com frequência na literatura considerando a própolis proveniente da ação de coleta das abelhas da espécie *A. mellifera* (Kujumgiev et al., 1999; Silici et al., 2005; Scazzocchio et al., 2006; Kumazawa et al., 2007; Awale et al., 2008). Entretanto, existem outros tipos de própolis a serem estudadas. Como a geoprópolis, proveniente das abelhas meliponíneas - *Melipona scutellaris* (abelhas sem ferrão). Estas abelhas habitam principalmente regiões tropicais e subtropicais, têm a capacidade de realizar vôos curtos (aproximadamente raio de 500 metros) e têm importância crucial na polinização de diversas espécies de plantas (Ramalho, 2004). A própolis dessa abelha é diferenciada, de baixo valor econômico agregado devido ao pouco conhecimento que se tem ainda sobre a mesma. Constitui uma mistura de resinas, cera e terra; este último componente inclusive é o responsável pelo prefixo desta própolis, ou seja, geoprópolis (Nates-Parra, 2001; Barth, 2006). Dentre os poucos estudos com a geoprópolis, Velikova et al. (2000) analisaram amostras de

geoprópolis de doze diferentes espécies de meliponínea e observaram a presença de compostos como di e triterpenos além de ácido gálico. As mesmas amostras foram analisadas quanto as suas atividades biológicas e apresentaram significativa atividade contra *Staphylococcus aureus*, além de baixa atividade citotóxica. Dualibe et al. (2007) relataram que bochechos com extratos de geoprópolis podem diminuir a contagem de estreptococos orais. Recentemente, Libério et al. (2011) mostraram que amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith do estado do Maranhão, Nordeste brasileiro, apresentam atividade sobre *S. mutans* ATCC 25175 e não se mostraram tóxicas em modelos anti-inflamatórios *in vivo* e ainda exibe efeito antiinflamatório.

Em estudo conduzido em nossos laboratórios, Franchin et al. (2012) demonstraram que a fração aquosa da geoprópolis *M. scutellaris*, coletada na cidade de Entre Rios no estado da Bahia, apresenta atividade anti-inflamatória e esse efeito está relacionado à via do óxido nítrico. Outro trabalho do nosso grupo de pesquisa com a mesma geoprópolis foi relatado por Cunha et al. (2013), que identificaram a fração ativa contra vários microrganismos Gram positivos, incluindo *S. mutans* organizado em biofilme monoespécie. Esta fração ativa (hexânica) se mostrou tão promissora para o isolamento e identificação de novas substâncias ativas contra *S. mutans*, quanto aquelas já estudadas na própolis de *A. mellifera*, atuando em baixas concentrações (6,25 - 12,5 µg/mL). Entretanto, com evidências de composição química distinta de qualquer estudo anterior. Portanto, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar composto bioativo da geoprópolis, o qual apresenta propriedade anti *S. mutans* organizado em biofilme oral *in vitro*, a fim de agregar valor à geoprópolis e também na descoberta de um composto ativo contra este biofilme da cavidade oral.

CAPÍTULO 1

Nemorosone from Brazilian geopropolis possesses antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*

Laila Facin de Paula-Eduardo^a, Marcos Guilherme da Cunha^{a,b}, John A. Beutler^b, Cinthia Pereira Machado Tabchoury^a and Pedro Luiz Rosalen^{a*}

^a Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), SP, Brazil,;

^b Molecular Targets Laboratory, National Cancer Institute (NCI), National Institute of Health (NIH), Frederick, MD, E.U.A.;

*** Corresponding author:**

Tel.: +551921065314 / Fax: +551921065308

E-mail address: rosalen@fop.unicamp.br

Abbreviations: EEGP, ethanolic extract of geopropolis; MIC, minimum inhibitory concentration; MBC, minimum bactericidal concentration; TLC, thin-layer chromatography; HPLC, High-performance liquid chromatography; IPS, intracellular polysaccharide, WIP, water-insoluble polysaccharide, WSP, water-soluble polysaccharide.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: Brazilian geopropolis is a type of propolis used in folk medicine with antimicrobial, anti-inflammatory and other properties, without recognized economic value. However, it comes from a primitive stingless bee important to crop pollination and sustainability of the environment, and thus should be preserved from extinction. Recent studies have confirmed the antimicrobial and anti-inflammatory activities of the Brazilian geopropolis; however, these research studies have not indicated which substances are responsible for such biological actions, especially against the oral biofilm of *Streptococcus mutans*.

Aim of the study: To isolate and identify active compound of the Brazilian geopropolis from *Melipona scutellaris* with activity against the oral biofilm of *S. mutans*.

Material and methods: Fractionation and purification were made by dry silica gel column chromatography, Sephadex LH20 separation and HPLC. The bioguided study assessed the minimum inhibitory and bactericidal concentration of the fractions and subfractions of the extract against *S. mutans* UA159. The elucidation of the chemical structure of the isolated compound was done by HRESIMS and 1D and 2D NMR. The isolated compound was tested for the inhibition of adhesion against mono-species biofilm of *S. mutans* UA159 on hydroxyapatite discs.

Results: A known prenylated benzophenone was isolated and identified as nemorosone ($C_{33}H_{42}O_4$, MW 502). This compound reduced bacterial viability, biomass, intra- and extracellular polysaccharides, proteins of the matrix and adherence of the biofilm of the *S. mutans* grown on hydroxyapatite discs.

Conclusion: Nemorosone is the active compound isolated from geopropolis with inhibitory activity against *S. mutans* biofilm. It was able to interfere with the biochemical composition of the matrix and the virulence of the organism, turning it a promising natural compound for oral biofilm control.

1. Introduction

Propolis, a nontoxic resinous substance collected by *Apis mellifera* bees from several parts of plants (Silva et al., 2008), has been described as having several biological activities, such as antimicrobial, anticaries, antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and others (Kujumgiev et al., 1999; Silici et al., 2005; Scazzocchio et al., 2006; Kumazawa et al., 2007; Awale et al., 2008). Studies of the propolis of *A. mellifera* bees increased in the past ten years, including the filing of patents for use of its isolates, such as Artepillin C (Park, 2004), apigenin and *tt*-farnesol (Koo et al., 2002; Koo et al., 2005), depending on the anticaries and other activities. To date, these biological activities have been observed in propolis collected by *A. mellifera* bees ; however, there are other types of propolis, such as geopropolis, obtained from the stingless bee *Melipona scutellaris* .

Bees of the Meliponini tribe primarily inhabit tropical and subtropical regions, have the ability to perform relatively short flights and are crucially important in the pollination of various species of plants (Ramalho, 2004). The economic value of geopropolis is negligible because of its obscurity. However, this bee is at risk of extinction due to pressure on its environment (Allen-Wardell et al., 1998; Klein et al., 2007; Marletto et al., 2003; Osborne, 2012; Chauzat et al., 2013). Thus, the generation of knowledge about its

propolis may contribute to its survival and recognition of the necessity for conservation of its habitat.

The geopropolis produced by *M. scutellaris* is a mixture of resins, wax and soil; this last component is responsible for the prefix, *geo-* (Nates-Parra, 2001; Barth, 2006). It is popularly used for the treatment of gastritis and as an antibacterial agent (Quezada-Euan et al., 2001). Velikova et al (2000) analyzed samples of geopropolis of twelve different meliponine species regarding their biological activities and showed significant activity against *Staphylococcus aureus*, in addition to low cytotoxic activity. Dualibe et al. (2007) reported that mouthwash with geopropolis extracts may reduce the count of oral streptococci. Recently, Libério et al. (2011) showed that geopropolis samples from the state of Maranhão, Brazil (Palmeirândia and São Bento, 2°37' 30" S 44° 52' 30" W) had activity on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and were not toxic in *in vivo* anti-inflammatory models. In another study in our laboratories, Franchin et al. (2012, 2013) showed that the aqueous fraction of geopropolis has anti-inflammatory and antinociceptive activity. Also, da Cunha et al. (2013) identified active fractions against several Gram-positive microorganisms, including *S. mutans* organized in oral monospecies biofilm. This active fraction (hexane) proved to be promising for the isolation and identification of new active substances against *S. mutans* as those already studied for propolis of *A. mellifera*, acting at low concentrations (MIC 6.25 - 12.5 µg/mL). However, there is no study that has isolated and identified the bioactive substances in geopropolis so far, especially against oral biofilms.

Dental caries, a multifactorial, biofilm and sugar-dependent disease, whose prevalence has been reduced in recent years because of the use of fluoride treatments, still has a high incidence in the world and affects several age ranges (Rugg-Gunn, 2013). Among the various bacteria present in bacterial biofilms, streptococci, especially the *mutans* group, are correlated with the initiation and development of the carious lesion (Höfling et al., 1999; Mattos-Graner et al., 2000; Alam et al., 2000; Koo et al., 2002; Stamford et al., 2005). Thus, one prevention strategy is to attenuate the virulence factors of the microorganisms involved in this disease by chemical agents, thereby inhibiting or reducing the synthesis of dental biofilm polysaccharides or interfering in the production of acid by the microorganism, thus resulting in lower incidence or absence of caries (Koo et al., 1999; Duarte et al., 2003). Therefore, the aim of this study was to isolate and identify bioactive compounds from geopropolis active against *S. mutans* *in vitro* assays.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

After obtaining the geopropolis and preparing an ethanolic extract (EEGP), it was fractionated by dry column chromatography and the fraction with the best MIC was further fractionated by Sephadex LH-20 permeation. The subfraction from the LH-20 column that showed the best MIC was separated by HPLC to identify the compounds present in this subfraction. Only one compound was isolated in this subfraction which was bioactive. The purified compound was submitted to chemical analyses for the identification and elucidation of the molecular structure by HRESIMS and 1D and 2D NMR. The isolated compound was also subjected to antimicrobial testing in a biofilm of *S. mutans* structured on the surface of hydroxyapatite to assess effects on bacterial integrity, biomass, adhesion and the constitution of polysaccharides, and proteins of the matrix.

2.2. Geopropolis

Samples were collected in June and July, 2010, from hive boxes of *M. scutellaris* bees, located in the coastal region of the city of Entre Rios, Bahia state, 12° 22' S and 37° 54' W, in northeastern coast of Brazil. Samples of *M. scutellaris* bees are deposited in the Paulo Nogueira Neto Entomological Collection of the Biosciences Institute at the State University of São Paulo (CEPANN – IBUSP), identified with the voucher number CEPANN 42.863. This research had access authorization and remittance of genetic heritage components granted by the National Council of Technological and Scientific Development - CNPq # 010666/2014-1.

2.3. Extract preparation and fractionation of the geopropolis

Crude geopropolis was crushed and the ethanolic extract of geopropolis (EEGP) was prepared according to Franchin et al. (2012). Separation was performed by dry column chromatography according to the method described by Bueno-Silva et al. (2013). The EEGP was added at the top of the column and the mobile phase used was hexane, ethyl acetate and ethanol (75:20:5); the criteria for fractions were the different colors throughout the column, and then the six fractions obtained were monitored by thin layer chromatography (TLC) (Silva et al., 2008). For the separation using SephadexTMLH20, we used the methodology described by Cabral (2008) using methanol as eluent. The

subfractions obtained were monitored by thin layer chromatography (TLC) (Silva et al., 2008) using hot sulphuric anisaldehyde as developer.

2.4. Microbiological test

For the biological assays in this study, we used the microorganism *Streptococcus mutans* UA 159, stored in glycerol at -80 ° C.

2.4.1. Antimicrobial activity

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the EEGP, the fractions (dry column) and the subfractions (Sephadex) were assessed in order to determine their antimicrobial activity based on previously published methodology in accordance with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). The MIC was performed in 96-well microplates, inoculated with 5×10^6 CFU/mL, using brain heart infusion medium (BHI), and the EEGP concentrations, fractions and subfractions ranged from 3.125 to 1600 µg/mL. As negative control (vehicle), we used ethanol (final concentration of 12.5%, v/v). The plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 hours, and the MIC was defined as the lowest concentration range in which there was no visible bacterial growth, confirmed by 0.01% resazurin dye. To determine MBC, aliquots of all wells incubated at concentrations higher than MIC were grown in BHI agar. The MBC was considered the lowest concentration at which there was no cellular growth on the surface of the inoculated agar, *i.e.* 99.9% bacterial death. All these analyses were conducted in triplicate from three independent experiments.

2.4.2. Biofilm

The biofilms were formed on hydroxyapatite (HA) disks (12.3 mm in diameter, 1.43 mm in thickness). The HA disks were treated with human saliva clarified prior to adhesion of the microorganism. The use of human saliva in this study was approved by the Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School, University of Campinas, UNICAMP, Approval # 052/2014. The biofilms were initially grown for 24 hours, and then the culture medium was replaced daily for the five experimental days (total of 115 h), according to Koo et al. (2002). The concentrations tested were 10 and 20 times the minimum inhibitory concentration, which is equivalent to 0.25 mM and 0.5 mM of the compound isolated and identified, respectively, were treated twice daily (10 a.m. and 4 p.m., total of eight treatments, 1 min exposure each). The negative control (vehicle) used was alcohol at

12.5% and the positive control was chlorhexidine at the concentration of 0.12% (equivalent to 1.33 mM).

2.4.3. Biochemical analysis of the biofilm

To evaluate the effect of the compound isolated and identified from the geopropolis on the biofilm of *S. mutans* in formation, HA discs were treated according to Bueno-Silva et al. (2013). Water-soluble polysaccharides (WSP) and water-insoluble polysaccharides (WIP) were extracted and measured by colorimetric tests, as detailed by Koo et al. (2003) and Duarte et al. (2008), who use glucose as standard (Dubois, 1956). To quantify intracellular polysaccharides (IPS), we used glycogen as standard, as described by DiPersio et al. (1974). The quantification of protein content was determined by colorimetric tests using albumin as standard as detailed by Smith et al. (1985), using the Micro BCA TM Protein Assay Kit.

2.4.4. Inhibition of Adhesion

In order to assess the antimicrobial activity of the compound isolated against the formation and adhesion of the biofilm of *S. mutans*, the sample was placed at different concentrations (100-3.125 µg/mL) using the methodology described by Galvão et al. (2012).

2.5. Chemical Analysis

2.5.1. HPLC Analysis: was done for the EEGP, the fractions and subfractions described earlier, and it was performed in accordance with the method of Alencar et al. (2007) in order to trace the qualitative chemical profile of the samples. Twenty microliters of each sample were injected into a liquid chromatograph Shimadzu Ltd., Kyoto, Japan coupled to a photodiode array detector at 254 nm and/or fluorescence detector with a C18 reverse phase column Shimadzu ODS-A column (RP-18, 4.6 mm × 250 mm; 5 µm particle size). The mobile phase was water/acetic acid (19:1, v/v) (solvent A) and methanol (solvent B) with constant rate of 1 mL/min. The gradient started with 30% of solvent B up to 40% of B in 15 minutes, 50% of B in 30 minutes, 60% of B in 45 minutes, 75% of B in 65 minutes, 7% of B in 85 minutes, 90% of B in 95 minutes, and 30% of B in 105 minutes. The column

was kept at a constant temperature of 35 °C and the chromatograms were processed using Shimadzu Class-VP software.

2.5.2. Identification of the active compound: The isolated compound was purified by HPLC using a cyano column (250 x 10 mm) with a gradient of hexane and isopropanol (95 to 80% of hexane from 0 to 20 min and 80 to 95% of hexane from 20 to 30 min, 4 mL/min flow, wavelength of 254 nm). Next, this sample was analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) using a Bruker Avance 600 MHz instrument in which the ^1H and ^{13}C spectra were referenced with TMS (tetramethylsilyl) and deuterated solvents. Based on the results obtained by one-dimensional NMR (^1H and ^{13}C) and two-dimensional experiments (COSY - “Correlation spectroscopy”, HSQC - “Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy” and HMBC - “Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy”), we could propose the structure of the compound. The confirmation of the molecular mass of the compound isolated was obtained using High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS - Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF) and then compared to data from the literature (Cuesta-Rubio, 2001).

2.6. Statistical Analysis: To determine the statistical difference in the monospecies biofilm tests, we used the ANOVA - Tukey-Kramer test, and the results were considered statistically significant when $p < 0.05$. All analyses were performed using BioEstat 5.3 software.

3. Results and Discussion

The antimicrobial activity of the EEGP was confirmed with the literature (da Cunha et al., 2013) demonstrating a MIC of 25-50 $\mu\text{g/mL}$ and MBC > 1600 . The separation on a dry column generated 6 fractions, Fraction 1 (yield: 5.6%, with reference to the dry mass of the extract), Fraction 2 (21.2%), Fraction 3 (9.6%), Fraction 4 (5.6%), Fraction 5 (9.4%) and Fraction 6 (4.4%). Fraction 3 was selected to be continued as it had an MIC of 12.5 – 25 $\mu\text{g/mL}$, lower than the other fractions. We selected fraction 3 as the chemical complexity observed in the TLC was lower in fraction 3 than the fraction 2. This fraction was subjected to Sephadex LH20, yielding four new subfractions, subfraction 3.I (yield: 10%, with reference to dry mass), subfraction 3.II (37.5%), subfraction 3.III (33.7%) and subfraction 3.IV (7.5%). Subfraction 3.II gave the best values of MIC between 6.25 – 12.5

µg/mL and an MBC of 50 – 100 µg/mL, and therefore it was selected for the subsequent phase.

According to Duarte et al. (2007), extracts that have inhibitory potency below 500 µg/mL are considered strong microbial inhibitors. Thus, all fractions and subfractions were considered satisfactory (Table 1). Through the bioguided method, the fractionation significantly decreased the values of MIC and MBC, which shows that the selected compound was increasingly potent and active against *S. mutans* as it was purified and isolated.

Table 1: Results of antimicrobial activity with minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal (MBC) for EEGP, fractions and subfractions against *S. mutans* UA159.

	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
EEGP	25 – 50	> 1600
Fraction 1	25 – 50	100 – 200
Fraction 2	12.5 – 25	100 – 200
Fraction 3	12.5 – 25	100 – 200
Fraction 4	25 – 50	100 – 200
Fraction 5	25 – 50	100 – 200
Fraction 6	25 – 50	100 – 200
Subfraction 3.I	100 – 200	100 – 200
Subfraction 3.II	6.25 – 12.5	50 – 100
Subfraction 3.III	25 – 50	50 – 100
Subfraction 3.IV	50 – 100	100 – 200

By bioguided fractionation, we could verify by HPLC that fraction 3 (Figure 1-B) presented a reduced number of compounds in relation to EEGP (Figure 1-A). Also, we could observe in subfraction 3.II (Figure 1-C) the existence of only one peak, at the retention time of 27.74 min, which indicates the efficiency of the separation and purification methods used.

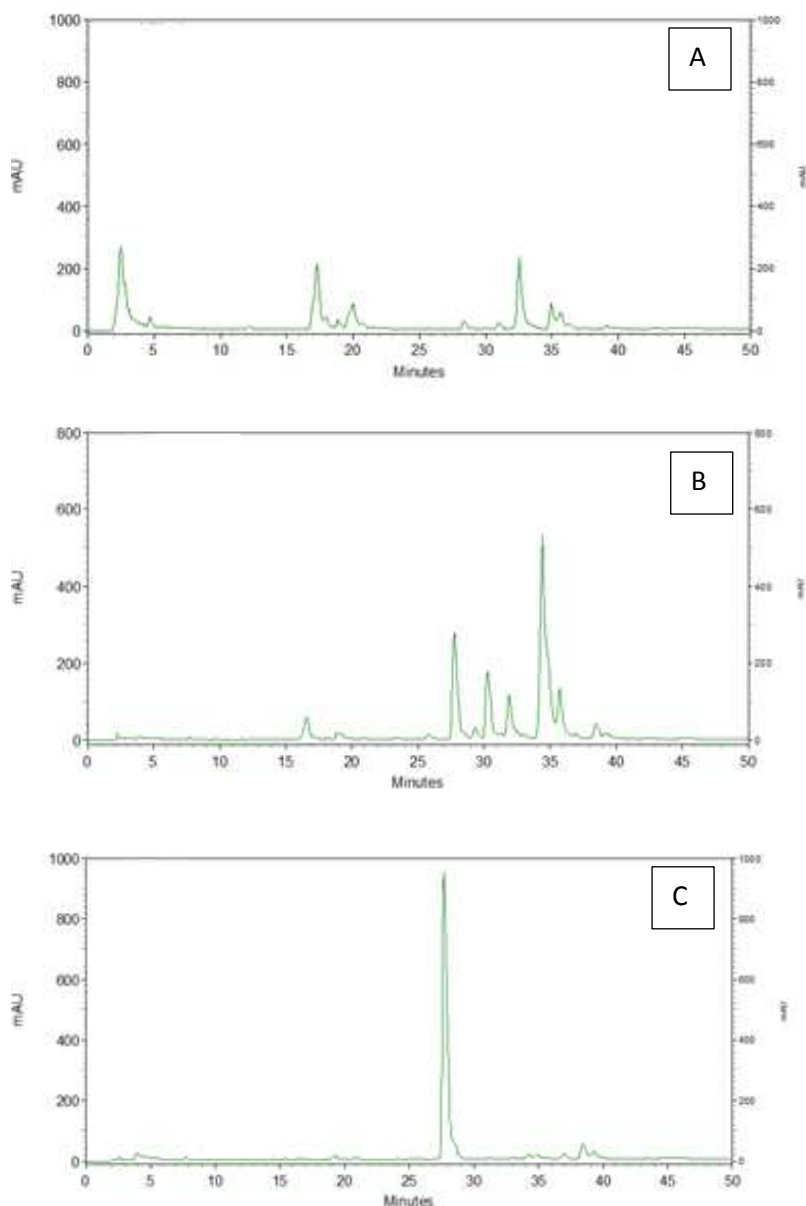


Figure 1: HPLC chromatograms of geopropolis: (A) Ethanollic Extract of Geopropolis (EEGP), (B) Fraction 3 of the EEGP, (C) Subfraction 3.II from fraction 3 of the EEGP.

Based on the spectra obtained by 1D and 2D NMR, we could confirm the structure of the compound as being nemorosone by comparing it to literature data (Cuesta-Rubio et al., 2001).

The confirmation of the molecular mass of the isolated compound was made using high-resolution mass spectrometry, in which we observed the molecular ion mass $[M-H]^-$ of m/z 501.3058, compatible with the molecular formula $C_{33}H_{42}O_4$ (m/z calculated for 501.3010).

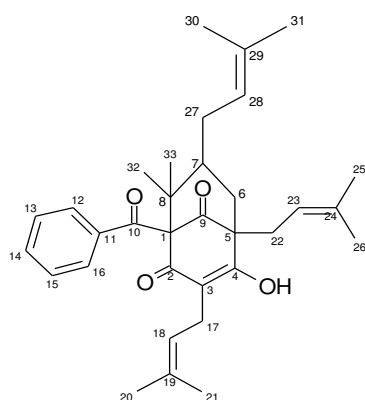


Figure 2: Chemical structure of Nemorosone.

In the biofilms of *S. mutans* treated with nemorosone (Table 2), the concentration of 0.50 mM was more effective and reduced 65 % of the biomass, 77% of the WIP, 69% of the IPS, 38% of the WSP and 48% of the protein content when compared to the vehicle control ($p < 0.05$). On the other hand, there was no significant difference in relation to the group treated with the gold standard, chlorhexidine at 1.33 mM (0.12%).

Table 2 – Biochemical composition and bacterial viability of the biofilm of *S. mutans* UA 159 grown on hydroxyapatite disc, after five days of treatments [mean ($\pm$ SD)].

Treatment	Dry Weight (mg)	WIP (μ g)	IPS (μ g)	WSP (μ g)	Protein Total (mg)	Count (log UCF/mL)
Nemorosone 0.25 mM	8.8 (± 0.8) ^b	340.5 (± 65.9) ^a	1190.9 (± 110.9) ^b	149.5 (± 25.2) ^b	0.89 (± 0.34) ^b	8.5 (± 0.1) ^a
Nemorosone 0.50 mM	4.7 (± 1.7) ^a	353.6 (± 126.5) ^a	789.7 (± 117.2) ^a	88.9 (± 24.7) ^a	0.48 (± 0.16) ^a	8.5 (± 0.1) ^a
Vehicle (ethanol 12.5%)	13.5 (± 2.7) ^c	1545.6 (± 238.2) ^b	2578.3 (± 349.1) ^c	142.9 (± 55.2) ^b	0.92 (± 0.24) ^b	8.8 (± 0.3) ^b
Chlorhexidine 1.33 mM	2.9 (± 0.8) ^a	392.7 (± 223.1) ^a	500.1 (± 139.8) ^a	54.2 (± 12.9) ^a	0.38 (± 0.10) ^a	0 ^c

Different letters in the same column indicate statistically significant difference, $p < 0.05$ (ANOVA, Tukey-Kramer). IPS - intracellular polysaccharide, WIP - water-insoluble polysaccharide, WSP - water-soluble polysaccharide. Positive Control: 0.12% digluconate chlorhexidine – Sigma®.

In the biofilm test, there was a reduction in the amount of IPS in biofilms treated with nemorosone. This polysaccharide is a storage polymer of the glycogen type, which can be fermented by bacteria when exogenous carbohydrates are absent (Koo et al., 2006). The use of this polysaccharide by *S. mutans* leads to the production of acid, which contributes to the pathogenicity of the biofilm and tooth demineralization (Paes Leme et al., 2006). Therefore, nemorosone probably decreases the amount of acid generated in the biofilm matrix, thus making it less cariogenic. In addition, the extracellular polysaccharides play an important role in the pathogenesis of tooth decay through the promotion of biochemical and physiological changes in the biofilm matrix, as they improve the adhesion and accumulation of microorganisms, provide large amounts of biofilm and increase acidogenicity of the biofilm matrix (Koo et al., 2006). By inhibiting the formation of extracellular polysaccharides, the microorganism becomes vulnerable to the host defenses, hindering the formation of the pathogenic biofilm.

We therefore suggest that the action of the nemorosone on the dental biofilm is due to the inhibition of the formation of the polysaccharides, primarily extracellular, and also due to reduced protein content. As we observed a decrease on the insoluble extracellular polysaccharide and decreased protein content, it is possible that this substance affects the adhesion of the biofilm of *S. mutans*. Thus, in the test of inhibition of adhesion of the biofilm treated with nemorosone, identical concentrations were tested by the MIC test and, when compared with the vehicle, they inhibited the adhesion of *S. mutans* UA 159 in 95% (Figure 3). We conclude that the activity of the compound is linked to extracellular polysaccharides, which are responsible for the buildup of bacteria on the surface of the tooth (one of the virulence factors of *S. mutans*).

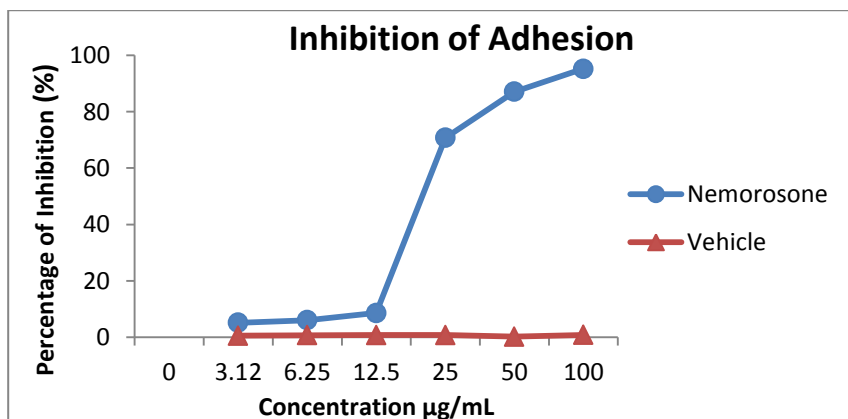


Figure 3: Inhibition of adhesion (%) of *S. mutans* by nemorosone

Cytotoxic and anti-oxidant activities of nemorosone were reported by Cuesta-Rubio et al. (2002). This substance showed *in vitro* cytotoxic activity against several strains of tumor cells including breast, lung, colon, ovary and liver carcinoma (Diaz-Carballo et al., 2003; Popolo et al., 2011). Nemorosone shows no genotoxic properties and may have therapeutic application in the prevention and treatment of breast cancer (Camargo et al., 2013). There is no studies so far have reported oral antibiofilm activity for nemorosone.

Castro et al. (2009) identified in *A. mellifera* propolis type 6 hyperibone A as the active compound against *S. mutans* with MIC results ranging from 3.3 to 6.6 µg/mL. Branco-de-Almeida et al. (2011) isolated 7-epiclusianone from *Rheedia brasiliensis* (Guttiferae), which showed antibacterial and anti-adhesion effect in biofilm testing on *S. mutans*. Both compounds belong to the same family of polyprenyl benzophenones, which confirms the activity of this group of compounds on *S. mutans*.

Bees collect resin from specific plants in each bioma to prepare propolis (Salatino et al., 2005). Nemorosone has been reported from *Clusia rosea* (Cuesto-Rubio et al., 2001), a well-known plant in the state of Bahia (Ribeiro et al., 2011). Thus, this species or a related plant in the Clusiaceae family may be the source of nemorosone in geopropolis found in “Entre Rios” city, northeastern coast of Brazil.

Substances that act on the virulence of *S. mutans* can be used to control dental caries in synergy with other agents with anticaries effect in order to reduce the effective concentration and possible toxicity (Koo et al., 2005 and Koo et al., 2008). Nemorosone presents such effect, but more studies are needed to also investigate its toxicological effects.

4. Conclusion

The methods of bioguided separation (dry columns and Sephadex LH 20) were efficient and sufficient to isolate one of single active compound responsible for the antibiofilm activity of *S. mutans*. The fractions and subfractions of the ethanolic extract of geopropolis have strong antimicrobial activity against *S. mutans*, with low MIC and MBC values, confirming its popular use as an antimicrobial agent. One of bioactive substance against *S. mutans* from geopropolis is nemorosone, which has the ability to reduce polysaccharides and proteins from the matrix and affects cell viability, which makes it a

promising chemical agent for the control of pathogenic oral biofilms although pre-clinical and clinical studies should be developed in order to confirm its activity.

Acknowledgements The authors would like to thank Mr. José Emídio Borges de Souza for providing the geopropolis samples. This research was supported by FAPESP (No. 2011/16501-3, 2011/ 23635-6, and 2012/22378-2) and by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, Center for Cancer Research. M.G. da Cunha was the recipient of a FAPESP fellowship #2012/22002-2. We thank Sergey Tarasov and Marzena Dyba (Biophysics Resource Core, Structural Biophysics Laboratory, CCR) for assistance with mass spectrometry.

References:

Alam, S, Brailsford, SR, Adams, S, Allison, C, Sheehy, E, Zoitopoulus, L, et al. Genotypic heterogeneity of *Streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(8): 3330-6. doi: 10.1128/AEM.66.8.3330-3336.2000.

Alencar, SM, Oldoni, TLC, Castro, ML, Cabral, ISR., Costa-Neto, CM, Cury, JA, Rosalen, PL, Ikegaki, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. Journal of Ethnopharmacology. 2007; 13, 278–83. doi: 10.1016/j.jep.2007.06.005.

Allen-Wardell, G, Bernhardt, P, Bitner, R, Burquez, A, Buchmann, S, et al. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. Conservation Biology. 1998; 12: 8–17.

Awale, S, Li, F, Onozuka, H, Esumi, H, Tezuka, Y, Kadota, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. Bioorg Med Chem. 2008; 16(10): 181-89. doi: 10.1016/j.bmc.2008.04.016

Barth, OM. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. *Apiacta*. 2006; 41, 71–85.

Branco-de-Almeida, LS, Murata, RM, Franco, EM, Santos, MH, Alencar, SM, Koo, H, Rosalen, PL. Effects of 7-epiclusianone on *Streptococcus* and Caries development in rats. *Planta Med*. 2011; 77(1): 40–45. doi: 10.1055/s-0030-1250121.

Bueno-Silva, B, Alencar, SM, Koo, H, Ikegaki, M, Silva, GV, Napimoga, MH, Rosalen, PL. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem*. 2013; 15; 61(19): 4546-50. doi: 10.1021/jf305468f.

Cabral, ISR. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira [dissertação]. Piracicaba: USP/ESALQ. 2008; 94p.

Camargo MS, Prieto AM, Resende FA, Boldrin PK, Cardoso CR, Fernández MF, et al. Evaluation of estrogenic, antiestrogenic and genotoxic activity of nemorosone, the major compound found in brown Cuban propolis. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13: 201. doi: 10.1186/1472-6882-13-201

Castro, ML, do Nascimento, AM, Ikegaki, M, Costa-Neto, CM, Alencar, SM, Rosalen, PL. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian própolis type 6. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17(14): 5332-5. doi: 10.1016/j.bmc.2009.04.066

Chauzat, MP, Cauquil, L, Roy, L, Franco, S, Hendrikx, P, et al. Demographics of the European Apicultural Industry. *PLoS ONE*. 2013; 8(11): doi: 10.1371/journal.pone.0079018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 7th edition. Wayne, PA, USA: CLSI. 2006; document M07-A7.

Cuesta-Rubio, O, Velez-Castro, H, Frontana-Uribe, BA, Cardenas, J. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Phytochemistry*. 2001; v. 57, p. 270- 83. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00510-0

Cuesta-Rubio, O, Frontana-Uribe, BA, Ramirez-Apan, T, Cardenas. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; Biological activity of nemorosone. *Z. Naturforsch.* 2002; 57c, 372D378

Cunha, MG, Franchin, M, Galvão, LC, de Ruiz, AL, de Carvalho, JE, Ikegaki, M, et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* Geopropolis. *BMC Complement Altern Med.* 2013; 13: 23. doi: 10.1186/1472-6882-13-23

Diaz-Carballo, D, Seeber, S, Strumberg, D, Hilger, RA. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003; v.41, p. 622-32.

Di Persio, JR, Mattingly, SJ, Higgins, ML, Shockman, GD. Measurement of intracellular iodophilic polysaccharide in two cariogenic strains of *Streptococcus mutans* by cytochemical and chemical methods. *Infection and Immunity*. 1977; vol. 10, no. 3, pp. 597–604.

Dualibe, SAC, Gonçalves, AG, Ahid, FJM. Effect of a própolis extract on *Streptococcus mutans in vivo*. *J Appl Oral Sci.* 2007; 15(5): 420-3.

Duarte, S, Koo, H, Bowen, WH, Hayacibara, MF, Cury, JA, Ikegaki, M, et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003; 26, 527–31.

Duarte, MCT, Leme, EE, Delarmelina, C, Soares, AA, Figueira, GM, Sartoratto, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; vol. 111, no. 2, pp. 197–201. doi: 10.1016/j.jep.2006.11.034

Duarte, S, Klein, MI, Aires, CP, Cury, JA, Bowen, WH, Koo, H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. Oral Microbiology and Immunology. 2008; vol. 23, no. 3, pp. 206–12. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00412.x

Dubois, M, Gilles, KA, Hamilton, JK, Rebers, PA, Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 7 related substances. Analytical Chemistry. 1956; vol. 28, no. 3, pp. 350– 56.

Franchin, M, Cunha, MG, Denny, C, Napimoga, MH, Cunha, TM, Koo, H, et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . J Ethnopharmacol. 2012; 143(2): 709-15. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.040

Franchin, M, Cunha, MG, Denny, C, Napimoga, MH, Cunha, TM, Bueno-Silva, B, et al. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2013, Article ID 907041, 9 pages, 2013. doi:10.1155/2013/907041

Galvão, LCC, Furletti, VF, Bersan, SMF, Cunha, MG, Ruiz, ALTG, Sartoratto, A, et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012; vol. 2012, Article ID 751435, 12 pages, 2012. doi:10.1155/2012/751435.

Höfling, JF, Spolodório, DMP, Pereira, CV, Rosa, EAR, Moreira, D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. Rev Odontol Univ. 1999; São Paulo; 13(2): 173-80.

Klein, AM, Vaissile, BE, Cane, JH, Steffan-Dewenter, I, Cunningham, SA, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2007; Feb 7; 274 (1608): 303–13. doi: 10.1098/rspb.2006.3721.

Koo, H, Rosalen, PL, Cury, JA, Park, YK, Ikegaki, M, Sattler, A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. Caries Research. 1999; 33, 393–40. doi:10.1159/000016539.

Koo, H, Rosalen, PL, Cury, JA, Ambrosano, GMB, Murata, RM, Yatsuda, R, et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants streptococci. Current Microbiology; 2000; 41, 192–196

Koo, H, Pearson, SK, Scott-Anne, K, Abranches, J, Cury, JA, Rosalen, PL, et al. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17(6): 337-43. doi: 10.1034/j.1399-302X.2002.170602.x

Koo, H, Hayacibara, MF, Schobel, BD, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003; vol. 52, no. 5, pp. 782–89. doi: 10.1093/jac/dkg449.

Koo, H, Schobel, B, Scott-Anne, K, Watson, G, Bowen, WH, Cury, JA, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. J Dent Res. 2005; 84(11): 1016-20. doi: 10.1177/154405910508401109.

Koo, H, Seils, J, Abranches, J, Burne, RA, Bowen, WH, Quivey, RG Jr. Influence of apigenin on gtf gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 542–46. doi: 10.1128/AAC.50.2.542-546.2006.

Koo, H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. Adv Dent Res. 2008; 20: 17–21. doi: 10.1177/154407370802000105.

Kujumgiev, A, Tsvetkova, I, Serkedjieva, Y, Bankova, V, Christov, R, Popov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 64, 235–24. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00131-7.

Kumazawa, S, Ueda, R, Hamasaka, T, Fukumoto, S, Fujimoto, T, Nakayama, T. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, *Japan*. J Agric Food Chem. 2007; 55(19): 7722-5. **doi:** 10.1021/jf071187h.

Libério, SA, Pereira, AL, Dutra, RP, Reis, AS, Araújo, MJ, Mattar, NS, et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immune modulatory effects and toxicity of Geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. BMC Complement Altern Med. 2011; Nov 4; 11: 108. doi: 10.1186/1472-6882-11-108.

Marletto, F, Patetta, A, Manino, A. Laboratory assessment of pesticide toxicity to bumble bees. Bulletin of Insectology. 2003; 56: 155–158.

Mattos-Graner, RO, Smith, DJ, King, WF, Mayer, MPA. Water-insoluble glucan synthesis by *mutans streptococcal* strains correlates with caries Incidence in 12- to 30-month-old children. J Dent Res. 2000; 79(6): 1371-7. doi: 10.1177/002203450007 90060401

Nates-Parra, G. Las Abejas sinaguijón (*Hymenoptera: Apidae: Meliponini*) de Colômbia. Biota Colomb. 2001; 2(3): 233-48.

Osborne, JL. Ecology: Bumblebees and pesticides. Nature. 2012, Nov 1; 491(7422): 43-5. doi: 10.1038/nature11637

Paes-Leme, AF, Koo, H, Bellato, CM, Bedi, G, Cury, JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - new insight. Journal of Dental Research. 2006; vol. 85, no. 10, pp. 878 – 887. doi: 10.1177/154405910608501002.

Park, YK, Paredes-Guzman, JF, Aguiar, CL, Alencar, SM, Fujiwara, FY. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004; 52, 1100–11. **doi:** 10.1021/jf021060m

Popolo, A, Piccinelli, AL, Morello, S, Sorrentino, R, Osmany, CR, Rastrelli, L, Aldo, P. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. Can J Physiol Pharmacol. 2011; v.89, p. 50-7. doi: 10.1139/y10-100.

Quezada-Euan, JJG, de Jesus-May-Itza, W, Gonzalez-Acereto, JA. Meliponiculture in Mexico: problems and perspectives for development. *Bee World*. 2001; 82 (4): 160-7.

Ribeiro PR, Ferraz CG, Guedes ML, Martins D, Cruz FG. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burlemarxii*. *Fitoterapia*. 2011; 82(8): 1237-40. doi: 10.1016/j.fitote.2011.08.012

Rugg-Gunn, A. Dental caries: Strategies to control this preventable disease. *Acta Medica Academica*. 2013; 42(2): 117-130. doi: 10.5644/ama2006-124.80.

Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2005; 2(1):33-38. doi:10.1093/ecam/neh060

Scazzocchio, F, D'auria, FD, Alessandrini, D, Pantanella, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res*. 2006; 161(4): 327-33. doi: 10.1016/j.micres.2005.12.003

Silici, S, Koc, NA, Ayangil, D, Cankaya, S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *J Pharmacol Sci*. 2005; 99(1): 39-44. doi.org/10.1254/jphs.FPE05002X.

Silva, BB, Rosalen, PL, Cury, JA, Ikegaki, M, Souza, VC, Esteves, A, et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilianprópolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008; 5(3): 313-6. doi: 10.1093/ecam/nem059.

Smit, PK, Krohn, RI, Hermanson, GT. Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*. 1985; vol. 150, no. 1, pp. 76–85.

Stamford, TCM, Pereira, DMS, Alcântara, LC, Couto, GBL. Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie em adolescentes sadios. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2005; 5(1): 71-6.

Velikova, M, Bankova, V, Tsvetkova, I, Kujumgiev, A, Marcucci, MC. Antibacterial *ent*-kaurene from brazilian propolis of native stingless bees. Fitoterapia. 2000; 71(6): 693-6. DOI: 10.1016/S0367-326X(00)00213-6.

CONCLUSÃO

No presente estudo, conclui-se que:

Os métodos utilizados neste estudo bioguiado foram eficientes para isolar e identificar o composto bioativo da geoprópolis com atividade quatro vezes superior ao extrato bruto e este composto isolado na última subfração foi identificado como uma benzofenona prenilada denominada de nemorosona.

A nemorosona (0,50 mM) não diferiu dos efeitos da clorexidina (0,12% ou 1,33 mM) contra biofilme *in vitro* de *S. mutans*, alterando significativamente a viabilidade e a composição da sua matriz.

Além disso, um possível mecanismo de ação antibiofilme de *S. mutans* desta benzofenona está relacionado a redução da produção de polissacarídeos na matriz do biofilme e por considerar a adesão um fator de virulência importante deste microrganismo, a ação da nemorosona deve ser alvo de futuros estudos pré-clínicos, com vistas a ação terapêutica sobre este fator de virulência do biofilme oral.

REFERÊNCIAS*

Alam S, Brailsford SR, Adams S, Allison C, Sheehy E, Zoitopoulos L. et al. Genotypic heterogeneity of *Streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(8): 3330-6. doi: 10.1128/AEM.66.8.3330-3336.2000.

Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. Bioorg Med Chem. 2008; 16(10): 181-189.

Barth OM. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. Apiacta. 2006; 41, 71–85.

Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* - derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res. 2011; 45: 69-86.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2010: pesquisa nacional de saúde bucal - resultados principais. 2011; Brasília: Ministério da Saúde.

Buriol L, Finger D, Schmidt EM, Santos JMT, Rosa MR, Quináia SP, et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. Quim Nova. 2009; 32(2): 296-302.

Castro ML, Cury JA, Rosalen PL, Alencar SM, Ikegaki M, Duarte S, et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. Quim Nova. 2007; 30(7): 1512-6.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Castro ML, do Nascimento AM, Ikegaki M, Costa-Neto CM, Alencar SM, Rosalen PL. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17(14): 5332-5.

Cunha MG, Franchin M, Galvão LC, de Ruiz AL, de Carvalho JE, Ikegaki M, Alencar SM, Koo H, Rosalen PL. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 23. doi: 10.1186/1472-6882-13-23.

Dualibe SAC, Gonçalves AG, Ahid FJM. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* *in vivo*. *J Appl Oral Sci*. 2007 ; 15(5): 420-3.

Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Park YK, Rosalen PL. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *mutans streptococci*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003; 26, 527– 531

Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, et al. The influence of a novel propolis on *mutans streptococci* biofilmes and caries development in rats. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(1): 15 - 22.

Farnesi AP, Aquino-Ferreira R, De Jong D, Bastos JK, Soares AEE. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genet Mol Res*. 2009; 8(2): 635 - 40.

Thylstrut, A.; Fejerskov, O. *Cariologia Clínica*. 2001; 3^a. ed. Santos, São Paulo.

Franchin M, Cunha MG, Denny C, Napimoga MH, Cunha TM, Koo H, de Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . *J Ethnopharmacol*. 2012; 143(2): 709 – 15.

Höfling JF, Spolodório DMP, Pereira CV, Rosa EAR, Moreira D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em

escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. Rev Odontol Univ São Paulo. 1999; 13(2): 173 - 80.

Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. Caries Res. 2011; 45(3): 243-63.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. Caries Research. 1999; 33, 393 – 40.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R, et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *mutants streptococci*. Current Microbiology. 2000; 41, 192 – 196.

Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, et al. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17(6): 337 - 43.

Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. J Dent Res. 2005; 84(11): 1016 - 20.

Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 64, 235 – 24

Kumazawa S, Ueda R, Hamasaka T, Fukumoto S, Fujimoto T, Nakayama T. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, *Japan*. J Agric Food Chem. 2007; 55(19): 7722 - 5.

Li J, Helmerhorst EJ, Corley RB, Luus LE, Troxler LE, Oppenheim FG. Characterization of the immunologic responses to human *in vivo* acquired enamel pellicle as a novel means to investigate its composition. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18: 183 – 191.

Libério SA, Pereira AL, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJ, Mattar NS, et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immune modulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. BMC Complement Altern Med. 2011; 11:108.

Marsh P, Martin MV. Oral Microbiology. Fourth Edition, 2002, 192 p.

Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res. 2004; 38: 204 – 211. doi: 10.1159/000077756.

Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MPA. Water-insoluble glucan synthesis by *mutans streptococcal* strains correlates with caries Incidence in 12- to 30-month-old children. J Dent Res. 2000; 79(6): 1371 - 7.

Nates-Parra G. Las Abejas sinaguijón (*Hymenoptera: Apidae: Meliponini*) de Colômbia. Biota Colomb. 2001; 2(3): 233 - 48.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod. 2012; 75: 311 – 335.

Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Fernandes Jr A, Rodrigues P, Bankova V. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2007; 13(4): 748 - 57.

Ramalho M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. Acta Bot Bras. 2004; 18 (1): 37 - 47.

Rugg-Gunn A. Dental caries: Strategies to control this preventable disease. Acta Medica Academica. 2013; 42(2): 117 - 130.

Scazzocchio F, D'auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. Microbiol Res. 2006; 161(4): 327 - 33.

Sforcin JM, Fernandes A, Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J Ethnopharmacol. 2000; 73(1/2): 243 - 9.

Sforcin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? J. Ethnopharmacol. 2011; 133(2): 253 - 60.

Silici S, Koc NA, Ayangil D, Cankaya S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. J Pharmacol Sci. 2005; 99(1): 39 - 44.

Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. Evid Based Complement Alternat Med. 2008; 5(3): 313 - 6.

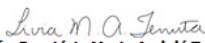
Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(1): 84 - 9.

Stamford TCM, Pereira DMS, Alcântara LC, Couto GBL. Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie em adolescentes saudáveis. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2005; 5(1): 71 - 6.

Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Schilling KM, Bowen WH. Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. Caries Res. 1996; 30: 354 – 360.

Velikova M, Bankova V, Tsvetkova I, Kujumgiev A, Marcucci MC. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. Fitoterapia. 2000; 71(6): 693-6.

ANEXO 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO		
O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Isolamento e identificação de compostos bioativos da geoprópolis (<i>Melipona scutellaris</i>) bioguiado pelo efeito antimicrobiano em biofilme dental", protocolo nº 052/2014, dos pesquisadores Laila Facin de Paula Eduardo e Pedro Luiz Rosalen, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 17/07/2014.		
The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "Isolation and identification of bioactive compounds from geopropolis (<i>Melipona scutellaris</i>) bioguided by antimicrobial activity in dental biofilms", register number 052/2014, of Laila Facin de Paula Eduardo and Pedro Luiz Rosalen, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Jul 17, 2014.		
		
Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado Secretário CEP/FOP/UNICAMP	Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta Coordenadora CEP/FOP/UNICAMP	
Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.		

ANEXO 2: Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético



9592596509164187

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010666/2014-1

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

CNPJ: 460.684.250/0001-33

Representante Legal: GLAUCIA MARIA PASTORE

Cargo/Função: Pró-Reitora de Pesquisa

CPF: 602.929.038-04 **RG:** 54628908

Projeto: Estudo das atividades farmacológicas da geoprópolis de *Melipona scutellaris*

Coordenador do Projeto: Pedro Luiz Rosalen

CPF: 030.958.228-80 **RG:** 11185975 - SSP / SP

Finalidade do projeto: Devido a grande variedade de espécies da flora mundial, os produtos naturais têm sido uma fonte promissora para descoberta de novos compostos bioativos. Dentre eles, a própolis coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* possui atividades biológicas relevantes descritas na literatura internacional como: anticâncer, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer entre outras. Entretanto, a grande maioria dos estudos sobre própolis se refere àquelas coletadas pelas abelhas do tipo *A. mellifera* e pouco se tem conhecimento de outras, como a geoprópolis, produzida por abelhas sem ferrão (*Melipona scutellaris*). O objetivo deste trabalho é ampliar o conhecimento sobre as propriedades químicas e farmacológicas da geoprópolis, realizando um estudo bioguiado a fim de encontrar os compostos responsáveis pelas suas atividades biológicas sobre a origem de algumas condições patológicas relevantes da clínica médica e/ou odontológica, tais como: 1) Antimicrobiana, 2) Anti-inflamatória, 3) Antioxidante, 4) Citototoxicidade, 5) Remodelação óssea, 6) Atividade de inibição da metaloproteinase de matriz, e os respectivos mecanismos de ação. Para isso, serão utilizadas técnicas de fracionamento químico e metodologias avançadas de farmacologia, microbiologia e biologia molecular para elucidação de biocompostos presentes neste produto natural e seus possíveis mecanismos de ação. Dessa maneira, espera-se através desse estudo isolar e/ou identificar os compostos ativos da geoprópolis bem como estudar as biológicas deles de interesses médico e/ou odontológico para futuro desenvolvimento de fármacos com aplicações nestas áreas de saúde.

Amostras a serem acessadas:

Grupos Taxonômicos: Reino: Animal; Filo: Arthropoda; Classe: Insecta; Ordem: Hymenoptera; Subordem: Apocrita; Superfamília: Apoidea; Família: Apidae; Subfamília: Meliponinae; Gênero: *Melipona*; Espécie: *Melipona scutellaris*

Tipo de material/quantidade de amostras: Tipo: geoprópolis ou própolis de abelha *Melipona scutellaris*. Será coletada aproximadamente 10 kg da geoprópolis. A época de coleta será nos meses junho e julho.

Local de depósito de subamostra: Coleção Entomológica Paulo Nogueira Neto, do Laboratório de Abelhas do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências

Equipe do projeto: PEDRO LUIZ ROSALEN / CPF 030.958.228-80

SEVERINO MATIAS DE ALENCAR / CPF 550.118.024-34

MASAHARU Ikegaki / CPF 139.472.858-17

LAILA FACIN DE PAULA EDUARDO / CPF 324.276.368-86

MARCOS GUILHERME DA CUNHA / CPF 359.883.578-73

MARCELO FRANCHIN / CPF 359.012.218-85

LIVIA CAMARA DE CARVALHO GALVAO / CPF 005.901.533-07

SERGIO LUIZ DE ALMEIDA ROCHELLE / CPF 023.226.248-96

CARINA DENNY / CPF 149.921.628-94

Validade da Autorização: 03/11/2014 a 03/11/2016

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico, para o endereço apg@cnpq.br e, preferencialmente, em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010666/2014-1. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço apg@cnpq.br, preferencialmente em formato .pdf. Ainda, para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, especialmente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 15 de Outubro de 2014

Marcelo Marcos Morales

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 9592596509164187 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.



Autorização de Acesso e de Remessa de
Componente do Patrimônio Genético

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.

Brasília, 15 de Outubro de 2014

Marcelo Marcos Morales

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

PO 161/2010

Processo: 010666/2014-1

Validade: 03/11/2014 a 03/11/2016

Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CNPJ: 460.684.250/0001-33

Pesquisador: Pedro Luiz Rosalen

CPF: 030.958.228-80

RG: 11185975 - SSP / SP

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página

<http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 0260677585930147 para recuperá-la do banco de dados do CNPq

ANEXO 3: E-mail de confirmação da submissão do artigo referente ao Capítulo 1

O artigo foi submetido à revista abaixo:

Journal of Ethnopharmacology

Editor-in-Chief - Dr. R. Verpoorte

IF = 2.939

Em Quarta-feira, 3 de Dezembro de 2014 9:42, Journal of Ethnopharmacology <jethnoph@chem.leidenuniv.nl> escreveu:

Full Length Article

Dear Dr. Rosalen,

Your submission entitled "Nemorosone from Brazilian geopropolis possesses antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.