

Efeito antifúngico de cimentos de ionômero de vidro com própolis

Antifungal effect of glass ionomer cements incorporated with propolis

Flaviana B. de Andrade Ferreira*
 Louise C. L. Torres Pereira*
 Linda Wang*
 Karen Barros P. Fernandes*
 Adriana Tozzo*
 Maria Cristina Marcucci*

* Universidade Norte do Paraná (UNOPAR)

** Universidade Bandeirantes (UNIBAN).

Resumo

A efetividade antimicrobiana dos cimentos de ionômero de vidro Ketac molar, Fuji IX e Vitremer, acrescidos ou não de diferentes volumes de extrato etanólico de própolis (EEP) ou de nistatina (antifúngico) foi testada sobre cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231). Esta análise foi realizada por difusão em ágar, com leitura de halo inibitório do crescimento após 48 horas. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelos testes ANOVA e *t*- Student ($p < 0,05$). Nistatina e EEP demonstraram efeito potencializador do efeito antifúngico, sendo que os maiores halos de inibição foram observados nos grupos associados à nistatina, seguidos do CIV Vitremer acrescido de própolis.

Palavras-chave: Cimentos de ionômero de vidro. *Candida albicans*. Própolis.

Abstract

The antimicrobial effect of glass ionomer cements Ketac Molar, Fuji IX and Vitremer associated with either propolis or nystatin in different volumes against *Candida albicans* reference strain (ATCC 10231) was evaluated. This analysis was performed using agar diffusion test, and inhibition zones were measured after 48 hours. Results were statistically analyzed by ANOVA and Student *t* test. Nystatin and EEP showed optimized antifungal effect; and greatest inhibition zones were observed for the groups associated with nystatin, followed by Vitremer with propolis.

Key-words: Glass ionomer cements. *Candida Albicans*. Propolis

1 Introdução

Os cimentos de ionômero de vidro (CIV) têm sido utilizados na Odontologia devido às suas propriedades interessantes, principalmente no âmbito social, em cavidades cariosas. É um material com adesividade à estrutura dentinária, confere resistência à mastigação e liberação contínua de flúor. Este flúor é capaz de interagir com os tecidos do dente, reduzindo sua solubilidade, diminuindo a desmineralização e favorecendo a remineralização, e, alterando o metabolismo de microrganismos da placa (COSTA et al., 1996; DIJKEN et al., 1997).

Por estas propriedades, o CIV é o material de eleição no tratamento restaurador atraumático (ART), que consiste na remoção da cárie dental com mínima invasão. É uma técnica utilizada principalmente em regiões onde há poucos recursos e mínima infraestrutura, envolvendo a remoção do tecido cariado amolecido desmineralizado apenas por meio de instrumentos manuais, sem uso de motor, seguido da restauração da cavidade com CIV (TOI, BÖNECKER e CLEATON-JONES, 2003; WANG et al., 2004). O efeito antimicrobiano do flúor nestes casos, onde nem sempre é possível retirar todo o tecido cariado, é benéfico por contribuir na remineralização e inibição dos microrganismos sobreviventes instalados nos túbulos dentinários (WEERHEIJM et al., 1999).

Alguns autores pesquisam a inserção de outras substâncias em CIV, buscando aprimorar as qualidades deste material. Yip et al. (2001) introduziram flúor fosfato acidulado em CIV e resinas, para aumentar a concentração de flúor e avaliaram a rugosidade gerada por microscópio óptico e eletrônico. Observaram que a rugosidade aumentou nas resinas e compômeros diferentemente dos CIV convencionais.

Sanders et al. (2002) inseriram clorexidina na massa de CIV modificado por resina e avaliaram propriedades físicas e microbiológicas, comparando com um controle. Os resultados indicaram que a adição de clorexidina não prejudicou seriamente as propriedades físicas avaliadas (dureza, resistência à tração diametral e erosão) e, possibilitou uma boa diminuição de *Streptococcus mutans* quando comparado com o CIV puro. Osinaga et al. (2003) adicionaram sulfato de zinco aos CIV (convencional e modificado por resina). A solubilidade aumentou, entretanto, permaneceu dentro do limite ISO e a resistência à fratura não foi afetada. A adição de sulfato de zinco aos CIV diminuiu os microrganismos em cultura e melhorou a liberação de flúor, sem alterar suas propriedades físicas.

Pinheiro, Simionato e Oda em 2003 avaliaram a efetividade antimicrobiana de CIV acrescido de própolis ou antibióticos sobre *Streptococcus mutans*, utilizando cimentos recém-espatulados ou armazenados em água por 48 horas. Observaram, pela metodologia da difusão

em ágar, que o CIV com acréscimo de antibiótico promoveu maiores halos de inibição bacteriana do que com própolis. A idéia de acrescentar própolis aos CIV surgiu pelo efeito antimicrobiano comprovado desta substância sobre vários microrganismos, especialmente sobre *S.mutans*, o principal microrganismo envolvido com a cárie (KOO et al., 2002).

A própolis é uma substância natural produzida por abelhas com efeitos biológicos comprovados, principalmente os de reparo e antimicrobiano (MARCUCCI, 1995), sendo bastante pesquisada na Odontologia. *Candida albicans* não é um microrganismo diretamente envolvido com a etiologia da cárie, no entanto, seu número na cavidade bucal serve como índice de atividade cariogênica (JORGE, 1998).

A suscetibilidade de 12 cepas de *Candida albicans*, coletadas de pacientes HIV-positivos foi testada por Martins et al. (2002) em relação a um extrato etanólico de própolis (EEP) comercial a 20%, por meio da difusão em ágar, comparando-o com os agentes antifúngicos nistatina, clotrimazol, econazol e fluconazol. O EEP inibiu todas as cepas testadas, não sendo observadas diferenças entre este e a nistatina. *Candida albicans* demonstrou resistência aos demais antifúngicos clotrimazol, econazol e fluconazol.

Giamalia et al. (1999) utilizaram uma tintura de própolis a 20%, cuja amostra já havia sido testada quanto ao efeito antimicrobiano. A amostra foi diluída a 0,4% e avaliado o efeito na microdureza do esmalte. A dureza Vickers foi aferida com um peso de 300 g, sobre superfícies de amostras de esmalte imersas por uma hora na tintura de própolis ou em solução salina. O pH da tintura de própolis variou entre 5 e 6, mesmo assim a microdureza do esmalte aumentou, devido provavelmente a algum componente com atividade mineralizadora do extrato de própolis.

O efeito da própolis em culturas de células de fibroblastos pulpares e periodontais foi bastante favorável, comparado com a do hidróxido de cálcio, comprovando sua compatibilidade biológica (AL-SHAHER et al., 2004).

Diante da viabilidade de uso da própolis, com seu efeito antimicrobiano, aumento da dureza do esmalte e biocompatibilidade, nos parece plausível a sua união aos CIV, desde que não prejudique as características físicas desses cimentos, o que será testado posteriormente. Objetivou-se neste trabalho melhorar a atividade antimicrobiana de três marcas de CIV (Ketac Molar, Fuji IX e Vitremer) com própolis (extrato etanólico a 50%), ou nistatina (solução aquosa a 25%), por meio da metodologia de difusão em ágar sobre o microrganismo *Candida albicans* (ATCC 10231).

2 Material e Métodos

O poder antimicrobiano dos cimentos de ionômero de vidro Ketac Molar (3M ESPE), Fuji IX (GC América) e Vitremer (3M ESPE) foi testado, isoladamente ou acrescidos de extrato etanólico de própolis a 50% em etanol, ou, nistatina em uma concentração de 25% em água destilada esterilizada, proporcionados em balão volumétrico.

O extrato etanólico de própolis foi obtido a partir de 50 gramas da própolis bruta (sólida). O processo de extração foi desenvolvido utilizando-se etanol à ebulição e resfriamento para eliminação da cera. O filtrado resultante foi concentrado, obtendo-se o extrato mole, ou extrato etanólico de própolis (EEP).

Foram realizados os controles: a) positivo - crescimento dos microrganismos, sem a presença dos antimicrobianos, b) negativo: com os cimentos, sem os microrganismos, para verificar o possível aparecimento de halos de difusão destes materiais, c) controles das substâncias antimicrobianas própolis e nistatina exclusivamente, com discos de papel filtro embebidos nestas, sobre o microrganismo testado.

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram os meios de cultura Mueller-Hinton (Difco, EUA) como base e Saboraud ágar (Difco, EUA) para a confecção do inóculo na camada dupla. O caldo Saboraud (Difco, EUA) foi utilizado para repiques prévios de *C. albicans* e padronização do inóculo. Todos os meios preparados foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e mantidos em estufa (FANEM, Brasil) a 37°C durante 24 horas para teste de esterilidade.

Foi obtida uma cepa fúngica de referência, liofilizada, catalogada com um número de registro da American Type Culture Collection (ATCC), proveniente da Fundação André Tosello (Campinas – SP): *Candida albicans* - ATCC 10231. A cepa foi reativada em caldo Saboraud, cultivada em estufa a 25°C por 24 a 48 horas, verificada a morfologia colonial e aspecto microscópico pela coloração de Gram. Estes procedimentos foram realizados para confirmar a pureza da cepa.

Foram feitos estoques em caldo Saboraud acrescido de glicerol, sendo todos congelados. Quando necessário, um exemplar do estoque foi descongelado e reativado para utilização nos testes.

O método da difusão em ágar do antimicrobiano foi selecionado por ser uma técnica de fácil execução e bastante utilizada na literatura. Placas de Petri de 130 mm de diâmetro foram preenchidas com uma camada de ágar Mueller-Hinton, para posteriormente receber o inóculo microbiano disperso em ágar Saboraud, formando assim uma camada dupla com o objetivo de uniformizar o crescimento do microrganismo pela placa.

O inóculo foi obtido por meio de crescimentos sucessivos no caldo citado. O microrganismo foi inoculado em solução salina esterilizada para que esta suspensão fosse ajustada, por meio de leitura em espectrofotômetro, a uma turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mc Farland.

Quinhentos microlitros desta suspensão foi inoculado em frascos contendo 50 mL de ágar Saboraud a 46°C, portanto, ainda na forma líquida, homogêneos e então dispensados nas placas previamente preparadas com o ágar Mueller-Hinton. Após o endurecimento da camada superior procedeu-se à colocação dos antimicrobianos.

Foram utilizadas matrizes metálicas com espaços de 5mm de diâmetro por 2mm de altura, desinfetadas com álcool 70%, para a obtenção dos espécimes de CIV. Os cimentos foram manipulados acrescentando

8, 10, 12 ou 15 mL da própolis ou da nistatina e então aguardada sua presa por no mínimo 15 minutos.

Os espécimes foram colocados na superfície do ágar já semeado com o inóculo padronizado em posição equidistantes, para melhor visualização dos futuros halos inibitórios, sendo três amostras de ionômero por placa. As placas foram incubadas em estufa a 25° C por 48 horas.

Após o período de incubação, as zonas ou halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros pelo meio de paquímetro por um único examinador. A zona de inibição foi considerada como o diâmetro do halo. Os testes foram feitos em triplicata.

Os resultados obtidos foram tabulados e tratados estatisticamente por meio da análise de variância (teste ANOVA), visando detectar as diferenças na suscetibilidade do microrganismo frente aos cimentos testados puros ou com os acréscimos de própolis ou nistatina. O teste *t* de Student comparou os efeitos de própolis e nistatina em cada cimento estudado.

3 Resultados

A inibição bacteriana proporcionada pelos três diferentes cimentos acrescidos ou não do extrato etanólico de própolis a 50% ou nistatina a 25% sobre o microrganismo *C. albicans*, obtida pela metodologia da difusão em ágar, está expressa na tabela 1 e nas figuras 1 a 3. Os valores das tabelas são as médias dos valores obtidos nos experimentos realizados em triplicata.

No presente trabalho houve a formação de grandes halos inibitórios dos CIV quando acrescidos de nistatina. Com o adicionamento da própolis, houve a produção de halos inibitórios nas maiores concentrações apenas com o cimento Vitremer (Tabela 1), mas sem diferença estatística para os demais cimentos.

	Fuji IX	Ketac Molar	Vitremer
Cimento puro	0	0	0
concentração de própolis			
1,00%	0	0	0
1,30%	0	0	0
1,50%	0	0	13
2,00%	0	0	16
concentração de nistatina			
1,00%	22	14	19
1,30%	23	15	21
1,50%	25	13	23
2,00%	28	17	22

Tabela 1. Média dos halos inibitórios em milímetros (mm) obtidos com os CIV acrescidos ou não de diferentes concentrações de própolis ou nistatina sobre o microrganismo *C. albicans*.

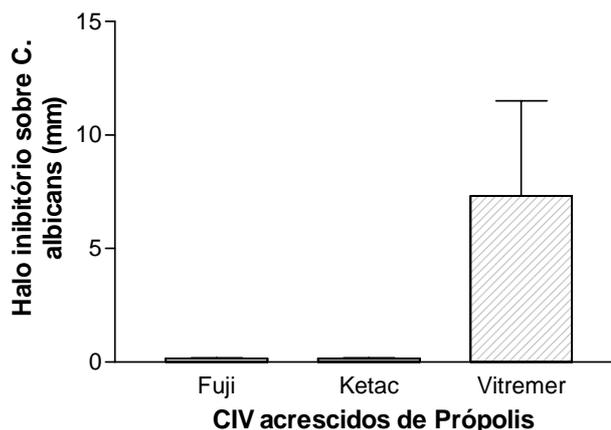


Figura 1. Halos inibitórios (média) dos cimentos de ionômero de vidro (CIV) acrescidos de própolis (nas concentrações de 1 a 2%) sobre *C. albicans*. As barras representam os erros padrões das médias, não houve diferença estatística entre os cimentos, ANOVA a um critério, $p < 0,05$, seguido por Bonferroni.

Com o adicionamento de nistatina, o cimento Ketac Molar foi estatisticamente menos efetivo contra este microrganismo do que os demais, Fuji IX e Vitremer (ANOVA a um critério, $p < 0,05$ seguido por Bonferroni), como demonstrado na figura 2.

Os halos produzidos na metodologia da difusão em ágar mostraram que os cimentos, acrescidos de própolis ou nistatina, tiveram diferenças entre si. Por meio do teste *t* de Student não pareado ($p < 0,05$), os cimentos acrescidos de própolis produziram halos significativamente menores do que os CIV adicionados de nistatina, conforme figura 3.

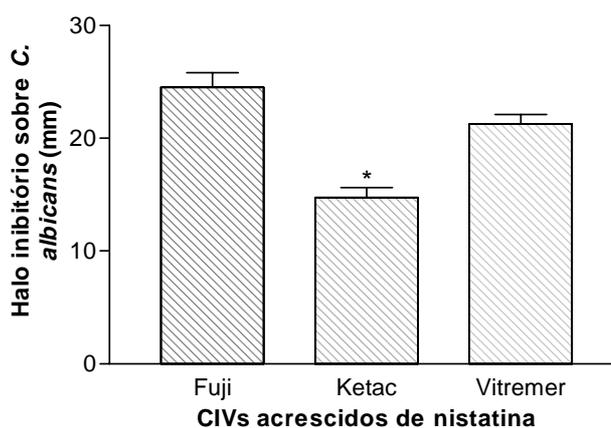


Figura 2. Halos inibitórios (média) dos cimentos de ionômero de vidro (CIV) acrescidos de nistatina (nas concentrações de 1 a 2%) sobre *C. albicans*. As barras representam os erros padrões das médias, * estatisticamente diferente de Fuji IX e Vitremer, ANOVA a um critério, $p < 0,05$, seguido por Bonferroni.

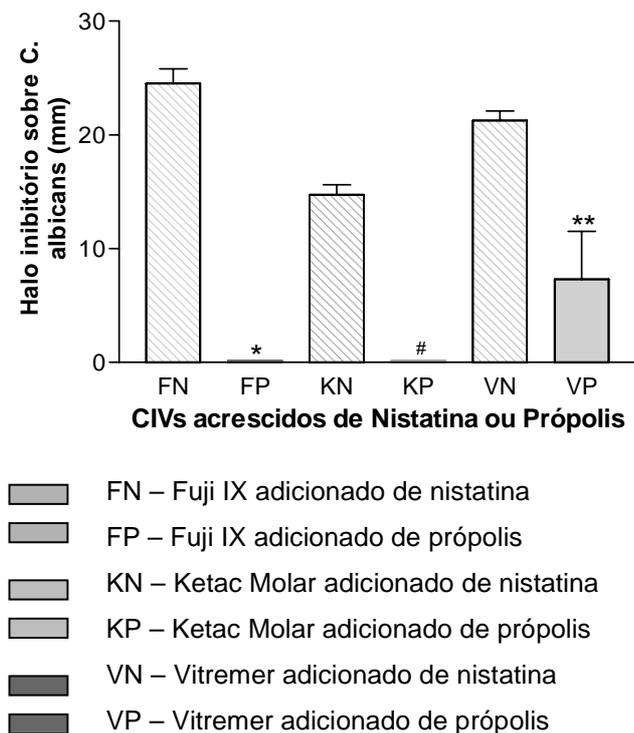


Figura 3. Halos inibitórios (média) dos cimentos de ionômero de vidro (CIV) acrescidos de própolis ou amoxicilina (nas concentrações de 1 a 2%) sobre *C. albicans*. As barras representam os erros padrões das médias.

* estatisticamente diferente de FN

estatisticamente diferente de KN

** estatisticamente diferente de VN

(teste t de Student, não pareado, $p < 0,05$).

4 Discussão

O cimento de ionômero de vidro foi desenvolvido com o objetivo de conseguir um material que associasse as qualidades benéficas de liberação de flúor do cimento de silicato com a biocompatibilidade e adesão do cimento de poliacrilato de zinco. As propriedades como adesão às estruturas dentárias e liberação de flúor tem possibilitado sua ampla aplicação na Odontologia, podendo ser utilizado como material restaurador, cimentante, como base e forramento e, ainda, como núcleo de preenchimento (SERRA; RODRIGUES, 1998).

O cimento de ionômero de vidro tem sido utilizado como um material restaurador com potencial de inibir cárie secundária, devido principalmente à sua capacidade de liberar flúor e ao efeito desse elemento sobre o processo de remineralização do esmalte adjacente às restaurações (COSTA et al., 1996). De acordo com Dijken et al. (1997), o flúor liberado do cimento de ionômero de vidro interfere no metabolismo das bactérias, consistindo em grande importância clínica para os materiais restauradores.

Alguns estudos avaliaram o efeito antimicrobiano de CIV acrescidos de substâncias antimicrobianas em

diversas concentrações, obtendo bons resultados inclusive quanto às propriedades físicas destes materiais (SANDERS et al., 2002, BOTELHO, 2003).

A idéia de acrescentar própolis aos CIV surgiu pelo efeito antimicrobiano comprovado desta substância sobre vários microrganismos, especialmente sobre *Streptococcus mutans* (KOO et al., 2002), o principal microrganismo envolvido com a cárie e, também, *Candida albicans* (MARTINS et al., 2002).

Pinheiro, Simionato e Oda (2003) avaliaram a efetividade antimicrobiana de CIV acrescido de própolis ou antibióticos sobre *Streptococcus mutans* e observaram, pela metodologia da difusão em ágar, que o CIV com acréscimo de antibióticos promoveu maiores halos de inibição bacteriana do que com própolis. A isto se deve o grande poder antimicrobiano dos primeiros, porém, sua utilização nem sempre é recomendável devido à possibilidade do desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos (BASCONES et al., 2004).

No presente trabalho foi encontrado a formação de halos inibitórios dos CIV sobre *Candida albicans*, no entanto, quando acrescidos do antifúngico nistatina. Os CIV puros, sem acréscimo de substâncias antimicrobianas não foram capazes de inibir o crescimento nas condições deste estudo. Com o adcionamento da própolis, houve a produção de halos inibitórios somente nas maiores concentrações com o cimento Vitremer. Em pequenas concentrações esta substância não conseguiu inibir totalmente o crescimento microbiano.

O cimento Vitremer, embora não indicado para ART, confirmou resultados melhores quanto à inibição bacteriana observada em outros estudos (LOYOLA-RODRIGUEZ et al., 1994, HERRERA et al., 2000).

Alguns autores observaram efetividade antimicrobiana da própolis (KEDZIA, 1990, IKENO et al., 1991, FERREIRA et al., 2000, KOO et al., 2002, MARTINS et al., 2002, FERREIRA et al., 2004), no entanto, há de se considerar as condições dos experimentos, pois, a substância pura proporcionará maior efetividade do que a inserção da própolis em um material que se solidifica e provavelmente dificulta sua liberação da massa do cimento.

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta (BASCONES et al., 2004). Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos (e antifúngicos), podendo aumentar a utilização de antimicrobianos de origem natural, se tratando de uma alternativa sadia, eficaz e barata.

5 Conclusão

O antifúngico nistatina inserido nos CIV proporcionou melhor resultado antimicrobiano. A própolis inserida nos CIV pode potencializar o efeito antimicrobiano deste material restaurador, no entanto, a formação de halos inibitórios ocorreu quando as concentrações de própolis foram aumentadas. Com este propósito, este

adicionamento em grandes concentrações gera a necessidade de testes físico-mecânicos subseqüentes destes materiais modificados para uso clínico futuro.

Referências

- AL-SHAHER, A et al. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod*, v. 30, n. 5, p.359-61.
- BASCONES, A et al. Consensus statement on antimicrobial treatment of odontogenic bacterial infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 9, p. 363-76, 2004.
- BOTELHO, M.G. Inhibitory effects on selected oral bacteria of antibacterial agents incorporated in a glass ionomer cement. *Caries Res.*, v. 37, n. 2, p. 108-14, 2003
- COSTA, B. et al. Atividade antimicrobiana de cimentos de ionômero de vidro restauradores convencionais e modificados com resina "in vitro". *Rev. Fac. Odontol. Bauru*; 4(1/2):25-31, jan-jun.1996.
- DIJKEN, J.W.W. et al. Fluoride and mutans streptococci levels in plaque on aged restorations of resin composite. *Caries Res*, v.31, p.379-383, 1997.
- FERREIRA, F.B.A. et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against anaerobic bacteria. In: GENERAL SESSION OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF DENTAL RESEARCH, 78, Washington D.C., E.U.A., 2000. IADR Abstract, *J. Dent. Res.*, v. 79, Issue, 2000, p. 572, 3431.
- _____. et al. Antimicrobial evaluation of endodontic treatment in dog's teeth In: GENERAL SESSION OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF DENTAL RESEARCH, Honolulu, Hawaii, E.U.A., 2004. IADR Abstract, *J. Dent. Res.*, v.83, Special Issue, 2004, 3033.
- GIAMALIA, D. et al. The effect of propolis exposure on microhardness of human enamel *in vitro*. *J. Oral Rehab.*, v.26, p.941-943, 1999.
- HERRERA, M. et al. Antibacterial activity of glass-ionomer restorative cements exposed to cavity-producing microorganisms. *Oper. Dent.*, v. 24, n. 5, p. 286-91, 1999.
- IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res.*, v.25, p.347-51, 1991.
- JORGE, A.O.C. Testes microbiológicos de atividade de cárie. In: _____ *Microbiologia Bucal*. 2. ed. São Paulo, Santos Editora, 1998. Cap. 5, p.66-75.
- KEDZIA, A. Sensitivity of anaerobic bacteria to the ethanol extract of propolis. *Phytotherapie*, v.6, p.4-6,1990.
- KOO, H. et al. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *J. Dent. Res.*, 2002.
- LOYOLA-RODRIGUEZ, J. P. et al. Growth inhibition of glass ionomer cements on *mutans* streptococci. *Pediatr Dent*, 16: 346-349, 1994.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties, and therapeutic activity. *Apidologie*, v.26, p.83-99, 1995
- MARTINS, S.R. et al. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J. Oral Sci.*, v.44, n.1, p.41-48, 2002.
- OSINAGA, P.W. et al. Zinc sulfate addition to glass-ionomer-based cements: influence of physical and antibacterial properties, zinc and fluoride release. *Dent. Mater.*, v. 19, n.3, p. 212-7, May 2003.
- PINHEIRO, S.L.; SIMIONATO, M.R.L.; ODA, M. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos cimentos de ionômeros de vidro associados a própolis ou antibióticos. *Rev.Assoc Paul Cir Dent*, v. 57, n. 3, p. 215-9, 2003.
- SANDERS, B.J. et al. Antibacterial and physical properties of resin modified glass-ionomers combined with chlorhexidine. *J. Oral Rehabil.*, v. 29, n.6, p. 553-8, Jun 2002.
- SERRA, M.C.; RODRIGUES, A.L. Potencial cariostático de materiais restauradores contendo flúor. *Rev.Assoc Paul Cir Dent*, v.52, n.5, p.359-364, set/out 1998.
- TOI, C.S.; BÖNECKER, M.; CLEATON-JONES, P.E. Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during atraumatic restorative treatment. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 18, n. 3, p. 160-4, 2003.
- WANG, L et al. Evaluation of Class I ART restorations in Brazilian schoolchildren: three-year results. *Spec Care Dentis.*, v.24, n.1, p. 28-33, 2004.
- WEERHEIJM, K.L. et al. Bacterial counts in carious dentine under restorations: 2-year *in vivo* effects. *Caries Res.*, v. 33, n. 2, p. 130-4, 1999.
- YIP, K.H; PENG, D.; SMALES, R.J. Effects of APF gel on the physical structure of compomers and glass ionomer cement. *Oper. Dent.*, v.26, n.3, p. 231-8, 2001.

Flaviana Bombarda de Andrade Ferreira

Doutora . Docente do Mestrado em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

e-mail: <flavianaferreira@uol.com.br>

Louise Cristina Lunardelli Torres Pereira

Graduanda em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

Linda Wang

Mestre e Doutora em Dentística pela Universidade de São Paulo (FOB - USP). Docente do Mestrado em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

e-mail: <wang.linda@uol.com.br>

Karen Barros Parron Fernandes

Doutora . Docente do Mestrado em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

Adriana Tozzo

Mestranda em Odontologia pela Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

Maria Cristina Marcucci

Doutora. Docente da Universidade Bandeirantes (UNIBAN).

*** Endereço para correspondência:**

Av. Inglaterra, 770. Apto 502 – CEP 86046-000 – Londrina, Paraná, Brasil.
