

Avaliação *in vitro* da Atividade Antimicrobiana de Extrato Alcoólico de Própolis Comparado à Solução de Clorexidina 0,12%

In vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Alcohol Extract of Propolis Compared to Chlorhexidine 0.12% Solution

Amanda da Silva^{a*}; Fernanda da Conceição Antônio Ferreira^b; Lígia Maria Molinari Capel^a;
Maria Paula Jacobucci Botelho^c

^aCentro Universitário de Maringá. PR, Brasil.

^bUnopar, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Odontologia. PR, Brasil.

^cUnopar, Curso de Odontologia. PR, Brasil.

*E-mail: amann.silva@gmail.com

Recebido em: 02/02/2017 – Aceito em: 03/04/2017

Resumo

Apesar dos esforços e do amplo entendimento sobre a cárie dental, esta continua bastante prevalente em determinados segmentos da população. A doença apresenta etiologia multifatorial, com a dieta e os micro-organismos envolvidos desenvolvendo papéis fundamentais. Os *Streptococcus mutans* têm papel fundamental em seu início e é ubíquo em crianças a partir dos sete anos de idade. Para controlar essas bactérias é preciso uma dieta com baixo consumo de sacarose e de carboidratos fermentáveis, o que nem sempre se consegue. Sua remoção da superfície dentária só é possível por meio da fricção mecânica, mas pode-se prevenir sua presença no biofilme dentário através da utilização de antissépticos. O mais utilizado na Odontologia é a clorexidina, porém como não é isenta de efeitos adversos, atualmente, vêm-se estudando produtos alternativos, dentre os quais alguns agentes fitoterápicos. O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade da própolis contra os *S. mutans* em relação à clorexidina. Foi analisada própolis 70% diluída em álcool 96% e após diluída em água potável 5ml, própolis 50%, própolis 12% e clorexidina 0,12% (controle positivo), e solução salina (controle negativo). O operador foi cego em relação às substâncias que estava utilizando. Somente a clorexidina 0.12% e a própolis 12% apresentaram halo de inibição claro. Neste estudo, a clorexidina apresentou melhor atividade contra os *S. mutans*.

Palavras-chave: Clorexidina. Cárie Dentária. *Streptococcus mutans*.

Abstract

Despite the efforts and the broad understanding on dental caries, it is still quite prevalent in certain segments of the population. The disease shows a multifactorial etiology, with diet and microorganisms involved developing fundamental roles. The *Streptococcus mutans* has key role in its beginning and is ubiquitous in children as young as seven years of age. To control these bacteria a diet is necessary with low consumption of sucrose and of fermentable carbohydrates, which is not always possible. The tooth surface removal is only possible through mechanical friction, but it is possible to prevent the presence of dental biofilm through the use of antiseptics. The most widely used in dentistry is chlorhexidine, however as it is not devoid of adverse effects, currently alternative products have been studying, among which some herbal agents. The aim of this study was to analyze the activity of propolis against *S. mutans* compared to chlorhexidine. Propolis was analyzed diluted in 70% ethanol 96% and further diluted in drinking water 5ml, 50% propolis, propolis 12% and 0.12% chlorhexidine (positive control), and saline (negative control). The operator was blinded for the substances he was using. Only 0.12% chlorhexidine and 12% propolis showed clear inhibition halo. In this study the chlorhexidine presented better activity against *S. mutans*.

Keywords: Chlorhexidine. Dental Caries. Antimicrobials. *Streptococcus mutans*.

1 Introdução

A cárie dentária é uma doença multifatorial e infecciosa e, embora venha apresentando redução em sua prevalência no Brasil, nos últimos anos, ainda é preocupante, já que em adultos, o índice CPO em levantamento realizado em nível nacional, em 2010, foi de 27,5¹. Embora muitos fatores tenham influência na iniciação e progressão da cárie, a interação do biofilme com a superfície dentária é fundamental, pois as lesões cariosas ocorrem em decorrência da perda de minerais². Nesse aglomerado de bactérias, as primeiras cepas encontradas são de *Streptococcus mutans*, que produzem ácido láctico, responsável pela patogenicidade da doença e pela desmineralização inicial do esmalte, polissacarídeos extracelulares, que favorecem a formação do biofilme, em

esmalte dentário, e polissacarídeos intracelulares, que são formados depois de esgotado o açúcar exógeno, formando ácido láctico³.

Assim, o controle do biofilme dentário é de grande importância na prevenção da cárie. Com a finalidade de remover esse biofilme, são utilizados métodos convencionais como escovação e fio/fita dental e, atualmente, vêm se estudando produtos químicos como substâncias auxiliares⁴. Dentre os agentes químicos utilizados para o controle do biofilme dentário, a clorexidina é considerada o padrão-ouro, sendo eficaz e segura. Ela inibe absorção de sacarose pelos *S. mutans*, porém possui efeitos adversos, quando utilizada por tempo prolongado e em grandes concentrações, como hiperqueratose, inflamação e úlceras⁵.

Novos estudos vêm sendo realizados para desenvolver

produtos, que apresentem ações semelhantes às da clorexidina, mas sem efeitos secundários. Os produtos fitoterápicos vêm se destacando há décadas por suas vantagens: poucos efeitos adversos em comparação a produtos sintéticos, baixo custo e fácil acessibilidade⁶.

Entre os fitoterápicos estudados para esta finalidade destaca-se a própolis, uma substância produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, com a função de proteger, vedando a colmeia contra micro-organismos. A composição da própolis varia de acordo com a biodiversidade da região, sazonalidade e período da coleta⁷. É usada na medicina há milhares de anos, pela presença de propriedades biológicas e atividade antimicrobiana⁸, antifúngica⁹, atividades imunomoduladoras e anti-inflamatória¹⁰, antioxidante¹¹ e cicatrizante¹². Estudos anteriores mostraram a efetividade de atividade antimicrobiana desses produtos, e atribuíram esta propriedade à presença de flavonoides e compostos fenólicos^{9,13}.

Graças a essas propriedades, buscou-se estudar a ação da própolis na inibição do crescimento de *S. mutans*.

2 Material e Métodos

Amostras de *Streptococcus mutans* (SM) (ATCC 25175) foram ativadas em meio BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas¹⁴⁻¹⁶. Foram inoculados 50 µL de SM em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até que fosse obtida uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland (1x10⁶ UFC/mL). As colônias que foram utilizadas foram provenientes de cultivo bacteriano recente (18 a 24 horas).

Um swab estéril foi embebido na suspensão bacteriana, comprimindo-o contra as paredes do tubo para remoção de excessos e, em seguida, foi feita a semeadura em superfície de meio ágar mitis salivarius acrescido de bacitracina e telurito de potássio, de forma suave em todas as direções na placa (cinco direções), procurando abranger toda a superfície. Houve o cuidado para que a espessura do meio fosse de 4 mm, para evitar resultados falsamente aumentados ou diminuídos. Para evitar a difusão errática do agente antimicrobiano, após a implantação dos discos foi aguardado um período de 15 minutos.

As soluções foram removidas de seus frascos originais e rotuladas com números de forma aleatória, por uma das técnicas do laboratório, para que o operador não fosse influenciado. Somente após os resultados finais, os autores souberam quais eram os conteúdos das soluções (substância 1 = soro fisiológico, substância 2 = própolis 50%, substância 3 = própolis 70% com álcool 96% diluída em água potável 15 gotas em 5 ml e substância 4 = própolis 12%, substância 5 = própolis 70% 10 gotas em 5ml, substância 6 = própolis 70% 5 gotas em 5ml, substância 7 = clorexidina 0.12%).

No experimento foi utilizado como controle positivo a Clorexidina 0.12% e como controle negativo foi utilizada a solução salina estéril. A própolis foi utilizada como tintura a 70% em álcool 96%, diluída em água potável 5,10 e 15 gotas

em 5 ml^{17,18} e como tintura a 50% em álcool 96%, também diluída em água potável da mesma forma. As tinturas a 70% e própolis 12% foram encomendadas em uma Farmácia de manipulação (FARMACOTÉCNICA) e a própolis a 50% foi manipulada pela Universidade Estadual de Maringá.

A atividade antimicrobiana foi verificada adaptando o método NCCLS (M44-P, 2003), utilizando discos de papel de filtro estéreis. Os discos foram dispostos sobre gaze esterilizada sendo utilizada pinça flambada para segurar e evitar que a gaze pudesse absorver a solução. Em cada disco foram colocados 20 µL de cada solução a ser testada esperando sua secagem para o uso^{17,18}. Cada solução foi colocada em dois discos. Com o auxílio de uma pinça flambada e resfriada, em capela de fluxo laminar com o bico de Bunsen ligado, os discos foram colocados sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão. Foram utilizadas duas placas Agar para cada solução. As placas foram, então, incubadas em microaerofilia em uma estufa bacteriológica a 35 – 37 °C, tendo sido realizadas leituras após 24, 48 e 72h.

Foi utilizado um paquímetro para medir o diâmetro dos halos de inibição de cada disco e permitir a comparação entre as substâncias.

3 Resultados e Discussão

A clorexidina foi a solução que apresentou melhores resultados, em seguida, a própolis a 12%, e os extratos de própolis hidroalcoólico (50% e 70%) não apresentaram efeitos sobre a cepa de *S. mutans* de forma bem definida. Os resultados após 24 horas não foram conclusivos, porém 48 horas e 72 horas o halo de inibição da clorexidina obteve 10 mm e da própolis a 12% apresentou 6 mm, sendo que as substâncias 5 e 6 obtiveram inibição de *S. mutans*, porém não foram definidos como nas substâncias 4 e 7, e as outras soluções não apresentaram halo de inibição.

Embora a fricção mecânica seja o meio mais efetivo para a remoção do biofilme das superfícies dentais, evitando o estabelecimento de doenças bucais, algumas pessoas têm dificuldade para realizar as manobras adequadas. O *Streptococcus mutans* é considerado o principal iniciador do processo carioso¹⁶ sendo, particularmente, sensível à ação da clorexidina, antimicrobiano mais utilizado no ambiente odontológico^{20,21}, o que foi confirmado neste trabalho.

Como alguns trabalhos relatam que, com grande frequência, a clorexidina pode causar alguns efeitos adversos, vêm-se estudando os produtos naturais. Entre eles, encontra-se a *Apis mellifera*, conhecida como própolis, que em alguns estudos realizados anteriormente apresentaram bastante atividade biológica, podendo ser responsável, principalmente, e não apenas, os compostos fenólicos e os flavonoides^{8,13}.

Os resultados obtidos, neste estudo, confirmaram estudos anteriores em relação ao extrato alcoólico de própolis 12%²², à solução de própolis a 70% diluída em água e à própolis a 50%⁸.

A clorexidina 0.12% utilizada como controle positivo foi a solução que apresentou melhores atividades antimicrobianas sobre os *S. mutans* apresentando halo de inibição 10 mm, seguida pela solução de própolis a 12% com halo de inibição de 6 mm. Em relação a não inibição dos *S. mutans* pelas outras soluções testadas, isto pode ser devido à quantidade de própolis extraída, que em grandes quantidades carrega impurezas e pode diminuir a concentração de flavonoides^{23,24}, responsáveis pela atividade antimicrobiana da própolis^{9,13}.

Além disso, os resultados podem ter sido influenciados pela composição da própolis, que pode variar dependendo da biodiversidade da região, sazonalidade e período da coleta. Neste estudo, a própolis utilizada foi obtida em Maringá, sendo a coleta realizada no período do inverno, o que pode também explicar a diminuição da atividade antimicrobiana de própolis²³.

3 Conclusão

Diante dos resultados obtidos, a clorexidina foi o produto que apresentou a melhor atividade antimicrobiana, seguida pela solução de própolis a 12%. Em concentrações maiores, em meio aquoso, a própolis não apresentou efeito inibidor.

Referências

- Brasil. SB Brasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Resultados principais. Brasília: MS; 2011.
- Kidd EAM, Ferjerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 2004;83:35-8.
- Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ERS. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita* 2006;25(2):239-25.
- Gebran MP, Gebert APO. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. *Tuiuti Ciênc Cultura* 2012;26:45-58.
- Pinto LP, Souza LB, Lagrange MBS, Cardoso LBQ, Andrade M C. Estudos dos efeitos de gluconato de clorexidina 0,5% e 5% na mucosa oral do rato wistar. *Rev Fac Odontol* 2002;43(1):3-7.
- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 2000;3:79-89.
- Castro ML, Cury JÁ, Rosalen PL, Alencar SM, Ikegaki M, Duarte S, Koo H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim. Nova* 2007;30(7):1512-6.
- Gondim BLC, Vieira TI, Cunha DA, Santiago BM, Valença AMG. Atividade antimicrobiana de produtos naturais frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2011;11(1):123-7.
- Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade anti-fúngica. *Rev Bras Farmacogn* 2007;17(3):388-9.
- Machado JL, Assunção AKM, Silva MCP, Reis AS, Costa GC, et al. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-Based Complement Alternative Med* 2012;10. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/157652>
- Cabral, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar SM. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim Nova* 2009;32(6):1523-7.
- Barbosa MH, Zuffi FB, Maruxo HB, Jorge LLR. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm* 2009;22(3):318-22.
- Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. 2002. Disponível em <http://www.naturapi.com.br/artigo.htm>.
- Swerts MS, Costa AM, Fiorini JE. Efeito da solução associada de clorexidina e própolis na inibição da aderência de *Streptococcus* spp. *Rev Int Periodontol Clin* 2005;2:10-6.
- Castro SL. "In vivo" Study efficacy of antiseptics on microaerobic microorganisms of the oral cavity. *Rev Dent* 2001;1:1-9.
- Fiorini GSRM, Lorenz JSK, Chiu DT Chiu. Rapid prototyping of thermoset polyester microfluidic devices. *Anal Chem* 2004;76:4697-704.
- Junior FS, Martins DTO. Avaliação da técnica de impregnação de discos na triagem de plantas medicinais com atividade antifúngica pelo Método de Difusão em Ágar. In: Anais do 4º Congresso Brasileiro de Micologia, 2004, Ouro Preto. Centro de Artes e Convenções da UFOP Ouro Preto; 2004..
- Martin RS, Gawron AJ, Lunte SM, Henry CS. Dual-electrode electrochemical detection for poly(dimethylsiloxane)-fabricated capillary electrophoresis microchips. *Anal Chem* 2000;72:3196-202.
- Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol* 1960;1:304-20.
- Krasse B. Risco de cáries. São Paulo: Quintessence; 1988.
- Moreira ACA, Santos TAM, Carneiro MC, Porto MR. Atividade de um enxagatatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. *Rev Ciênc Méd Biol* 2008;7(3):266-72.
- Auricchio MT. Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2006;3(65):209-12.
- Bruschi ML, Franco SL, Gremião MPD 2003. Applications of a HPLC method in analysis of propolis extract. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2003;26(14):2399-2409. doi: <http://dx.doi.org/10.1081/JLC-120023254>
- Franco SL, Bueno JHF. Otimização de processo extrativo de própolis. *Infarma* 1999;11(11/12):48-51.
- Leles CR, Melo M, Oliveira MMM. Avaliação clínica do efeito da prótese parcial removível sobre a condição dental periodontal de desdentados parciais. *Robrac Goiânia* 1999;8(25):14-8.
- Newbrum E. Cariologia. São Paulo: Santos; 1988.
- Salzedas DC, Oliveira MDB, Pinto JHN, Lopes JFS. Avaliação periodontal de dentes retentores de próteses parciais removíveis. *Prótese Clin Lab* 2008;5(23):52-7.
- Sforzin JM, Fernandes A, Lopes CA, Bankova V, Funari R. Seasonal effect on Brazilian propolis anti bacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000;73(1/2):243-9.
- Torres CRG. Antimicrobial agents and your potential of use in odontology. *Rev Fac Odontol São José Campos* 1996;3.