



ANÁLISE QUÍMICA DA PRÓPOLIS DE DIFERENTES REGIÕES DO PARANÁ E FORMULAÇÕES DE PRÓPOLIS PARA SER USADOS COM ENXAGUANTES BUCAIS

*Cintia Corteccioni Nunez Del Prado*¹; *Jéssica Cristina Stefanutto*²; *Juliana Oliva Stevanato*³; *José Eduardo Gonçalves*⁴; *Mirian Ueda Yamaguchi*⁵; *Selma Luci Franco*⁶;

RESUMO: A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* através da coleta de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto. Várias substâncias químicas têm sido isoladas da própolis, sendo os flavonóides e os fenóis considerados os principais compostos biologicamente ativos, onde se destaca a expressiva atividade antimicrobiana e antioxidante, o que indica que o extrato da própolis tem potencial para ser usado como enxaguante bucal, no combate à cárie. Este estudo tem como objetivo avaliar o perfil químico e ação antimicrobiana do extrato etanólico da própolis de diferentes regiões do estado do Paraná. Para isso as amostras foram submetidas a vários testes para a determinação de suas características químicas, atividade antimicrobiana, e por fim sua ação sobre o revestimento dental. As amostras de própolis mostraram para as colheitas analisadas, valores para cinzas, umidade, cera, sólidos solúveis e resíduos insolúveis dentro dos limites da legislação vigente. Dentre os compostos presentes, destacou-se em todas as amostras o Artepilin C, que tem inúmeras propriedades biológicas, em especial antimicrobiana, que foi comprovada pelos testes microbiológicos realizados. Observou-se ainda que quando imerso na solução de própolis, os dentes apresentam melhor aspecto e nitidez nos túbulos dentinários do que quando não são expostos à nenhuma substância. Os resultados obtidos demonstram que a própolis verde tem potencial para ser usada em solução como enxaguante bucal, com a vantagem de ser um produto natural.

PALAVRAS-CHAVE: Ação antimicrobiana; Análise química; Enxaguante bucal; Própolis.

ABSTRACT: Propolis is a resinous substance produced by bees of the species *Apis mellifera* by collecting shoots, flowers and plant exudates, in which they add salivary secretions, wax and pollen for the preparation of the final product. Several chemicals have been isolated from propolis. Flavonoids and phenols are considered the main biologically active compounds, in which highlights the significant antimicrobial and antioxidant activities, indicating that the extract of propolis has potential to be used as a mouthwash to combat caries. This study aims to evaluate the chemical profile and antimicrobial activity of the ethanol extract of propolis from different regions of the state of Paraná. For this, the samples were subjected to various tests to determine their chemical composition, antimicrobial activity, and action on dental coating. The propolis samples showed values for ash, wax, soluble solids and insoluble residues within the bounds of law. Among the present compounds, artepillin C stood out in all the samples. It has numerous biological properties, especially antimicrobial, which has been proved by microbiological tests carried out. It was also observed that when immersed in the solution of propolis, the teeth have a better look and clarity in the

¹ Graduação em Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – Unicesumar. cintiadelp Prado@hotmail.com

² Graduação em Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – Unicesumar. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar – PROBIC. jessica_cristinna@hotmail.com

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde. Centro Universitário de Maringá – Unicesumar. oliva_juli70@hotmail.com

⁴ Orientador e Docente do Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário de Maringá – Unicesumar. jagoncal@cesumar.br

⁵ Co-orientadora e Docente do Programa de Pós-Graduação em Promoção da Saúde do Centro Universitário de Maringá – Unicesumar. mirianueda@gmail.com

⁶ Co-orientadora e Docente do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá – UEM.

dentinal tubules than when they are not exposed to any substance. The results show that the propolis has the potential to be used as a mouthwash solution, with the advantage of being a natural product.

KEYWORDS: Antimicrobial action; Chemical Analysis; Mouthwash solution; Propolis.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* através da coleta de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto (KOO et al., 2002). É encontrada nas colméias, onde é responsável pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e tratamento anti-séptico (SANTOS, 1999).

A própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, etc. (KOSALEC et al., 2005; SIMÕES et al., 2008). Esse potencial biológico se deve a um sinergismo que ocorre entre seus constituintes (MARCUCCI, 1996), sendo os flavonóides e fenóis considerados os principais compostos biologicamente ativos (KOO et al., 2002).

A utilização de extratos etanólicos de própolis (EEPs) no campo da Cariologia tornou-se realidade quando estudos relataram sua atividade sobre a inibição de agentes, microorganismos relacionados à cárie dentária e sobre o processo de formação do biofilme cariogênico (KOO et al., 2002; KOSALEC et al., 2005). O presente estudo visa avaliar o perfil químico e a atividade antimicrobiana do extrato da própolis verde de diferentes regiões do estado do Paraná, determinando seu potencial para uso como enxaguante bucal.

2. METODOLOGIA

Foram analisadas seis (6) amostras de própolis de diversas regiões do estado do Paraná, quanto às suas características químicas, ação antibacteriana e efeito do extrato alcoólico sobre o revestimento dental.

As própolis analisadas foram coletadas de colméias de abelhas *Apis mellifera* do tipo *Langstroth*, sendo as amostras das regiões de Cambará, Cianorte, Ilha Grande, Maringá (UEM), Paranavaí e Uniflor.

2.1 ANÁLISE QUÍMICA

2.1.1 Umidade

Para análise de umidade, foi pesado aproximadamente 1,0 g de cada amostra de própolis em um recipiente apropriado. Depois de pesadas, as amostras são levadas à estufa a 70°C por 1 hora. Em seguida as amostras serão resfriadas e pesadas novamente. O procedimento é repetido até obter-se peso constante.

2.1.2 Teor de Cinzas

Para determinação do teor de cinzas, 2,0 g de cada amostra de própolis são pesadas em cadinhos, que em seguida são levados à mufla na temperatura de 600°C,

deixando-se ali por aproximadamente 24 horas. Com os dados, calcula-se a porcentagem de cinzas.

2.1.3 Determinação de Resíduos Insolúveis, Sólidos Solúveis e Cera

Para a determinação dos valores de resíduos insolúveis, sólidos solúveis e cera, é realizado à extração em aparelho tipo *Soxhlet*. Em um cartucho, feito com papel de filtro de peso conhecido, após secagem em estufa, é pesado aproximadamente 25,0 g de cada amostra de própolis e colocado no aparelho *Soxhlet*, para extração com álcool de cereal por 24 horas. Ao término do processo, o precipitado obtido da extração em *Soxhlet* é colocado em um béquer, esfriado à temperatura ambiente e levado à geladeira para posterior filtragem em funil de *Buchner* forrado com papel filtro apropriado. Logo após isso, o precipitado da filtragem é lavado com etanol gelado, até obter-se um resíduo branco no papel filtro. O resíduo que sobrar no papel filtro é secado em estufa a 40°C por aproximadamente 24 horas. Por diferença, encontra-se o teor de cera da amostra. Após a extração da cera, o cartucho com o resíduo é levado para estufa a 40°C por 24 horas, efetuando-se a pesagem em seguida, em balança analítica. O filtrado da extração da cera é medido em proveta de 250 mL e guardado em vidro de cor âmbar. Em um béquer de peso conhecido, é adicionada uma alíquota de 5,0 mL (Va) do extrato da própolis que foi filtrado, seguido de secagem em estufa a 60°C. Assim através do método gravimétrico é encontrado o valor de sólidos solúveis em etanol.

Com o filtrado dos sólidos solúveis em etanol, é procedida ainda às análises de oxidação, ação antimicrobiana, HPLC e ação sobre o revestimento dental.

2.1.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC

Inicialmente os extratos de própolis foram preparados para injeção, onde para cada amostra, juntou-se 1 mL do extrato a 15 mL de água ultrapura, sendo transferida para um funil de separação com cerca de 25 mL de acetato de etila. A solução obtida foi transferida para um bequer contendo sulfato de sódio anidro, e em seguida deixada em recipiente adequado em banho-maria (45°C) para evaporação dos compostos líquidos. O resíduo seco obtido foi retomado em metanol, filtrado em membrana Milipore® com porosidade de 0,45 µm e injetado no cromatógrafo. Os extratos foram ainda comparados qualitativamente à substâncias padrões.

Para as análises utilizou-se cromatógrafo líquido com detector UV/Vis, utilizando uma coluna Phenomenex® Luna PFP (2), 250X4,6mm, 100 Å, como fase estacionária. Como fase móvel utiliza-se gradiente de eluição não-linear com metanol grau HPLC e solução de ácido acético 5% (Comunicação pessoal, Aguiar et al. , 2012. Em publicação). A vazão é de 1,0 mL/minuto e o volume injetado de 20 µL, sendo o sistema operado à temperatura ambiente. A detecção é realizada a 310 nm e o tempo de corrida de 30 minutos, sendo realizadas três repetições para cada extrato analisado.

2.2 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA

Neste estudo, foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) e o experimento realizado em capela de fluxo laminar, em triplicata para cada extrato de própolis. As linhagens das bactérias foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h em caldo Mueller Hinton, e após o desenvolvimento procedeu à padronização do inóculo em solução salina, comparado à

escala 0,5 de Mc Farland, a partir do qual foi diluído 1:10 em caldo Mueller Hinton, estando o inóculo pronto para o experimento.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o protocolo M7-A7 do National Committee for Clinical Laboratory Standards, atual CLSI (NCCLS, 2006). Para tanto, foram utilizadas microplacas de 96 poços, que contêm 8 linhas e 12 colunas. O meio de cultura utilizado é o caldo Mueller Hinton, do qual foram colocados 100 µL em cada poço da placa. Nos poços da coluna 1 acrescentou-se 100 µL do extrato etanólico de própolis a ser testado, em concentração de 2.000 µg/mL, e após homogeneização passado 100 µL deste para os poços da coluna 2, e assim sucessivamente até a coluna de número 10, onde o mesmo volume(100 µL) é descartado. A coluna 11 é o controle negativo, onde adicionou-se ao meio de cultura álcool de cereais, e a coluna 12 o controle positivo, contendo apenas o meio de cultura. Em seguida foram adicionados 5 µL do inóculo de microrganismo em cada poço. A placa é então incubada em estufa a 37°C e a leitura realizada após 24 horas, onde observa-se se há desenvolvimento bacteriano através de turvação. É determinada como CIM a menor concentração do extrato de própolis onde não ocorreu o desenvolvimento dos microrganismos.

É realizada ainda a determinação da concentração bactericida mínima, onde após a leitura da CIM, com o auxílio de micropipetadores transfere-se cerca de 10 µL de cada poço das placas, para regiões determinadas de placa de Petri contendo Agar Mueller Hinton. É levado à estufa por 24 horas a 37°C, procedendo à leitura. A região em que não ocorrer crescimento bacteriano é indicada como a menor concentração do extrato a ter ação bactericida contra o microrganismo estudado.

2.3 ANÁLISE DA AÇÃO SOBRE O REVESTIMENTO DENTAL

Dentes decíduos e permanentes foram lavados com água e sabão, e em seguida limpos com álcool. Foram colocados em tubos de ensaio previamente identificados, os extratos de própolis e clorexidina 0,12%. Mergulhou-se os dentes nestas soluções, mantendo tubos controle sem imersão de dentes em qualquer substância. Durante dois meses, estes foram imersos e retirados das soluções semanalmente. Após este período e com os dentes secos, foram feitos cortes com brocas diamantadas em forma de lápis, número 1092, com motor de alta rotação. Os fragmentos, que contém esmalte, dentina e polpa foram colocados sobre a superfície de uma fita dupla face aderida a um porta amostra de alumínio. Em uma segunda etapa foi depositado sobre as amostras uma fina camada de substância condutora (ouro) através de um metalizador Balzer, modelo MED 020, para posterior análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As micrografias foram obtidas em um microscópio SHIMADZU modelo SS 550, equipado de microssanda com detector de energia dispersiva (EDS). A tensão de aceleração utilizado foi de 15 KeV.

3. RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos são detalhados na Tabela 2, apresentando os valores médios para o teor de cinzas, umidade, resíduos insolúveis, sólidos solúveis e cera para todas as amostras analisadas, de acordo com as regiões de coleta. Foi demonstrado que exceto pelo teor de umidade, todos os demais parâmetros químicos encontram-se de acordo com os limites preconizados pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001).

Tabela 1: Teores de Cinzas, Umidade, Resíduos Insolúveis, Sólidos Solúveis e Cera, expressos em porcentagem (%).

	Teor de Cinzas (%)	de Umidade (%)	Resíduos Insolúveis (%)	Sólidos Solúveis em Etanol (%)	Teor de Cera (%)
Cambará	2,51 ± 0,09	2,09 ± 0,08	24,68 ± 0,51	65,40 ± 0,52	10,31 ± 0,29
Cianorte	3,45 ± 0,05	8,21 ± 0,32	33,93 ± 3,26	56,40 ± 9,04	2,33 ± 0,23
Ilha Grande	3,52 ± 0,07	6,98 ± 0,20	35,97 ± 0,77	60,88 ± 2,89	2,49 ± 0,20
Maringá	3,41 ± 0,05	4,91 ± 0,27	30,34 ± 4,70	53,68 ± 5,70	5,58 ± 1,49
Paranavaí	2,72 ± 0,07	9,13 ± 1,81	29,28 ± 1,79	54,60 ± 1,38	6,93 ± 0,52
Uniflor	2,60 ± 0,04	5,62 ± 0,26	34,12 ± 2,09	50,92 ± 1,45	11,09 ± 1,59

Observou-se que entre as diferentes amostras de própolis estudadas o teor de cinzas com melhor média foi a de Cambará com 2,51%, mostrando ser a que resultou em menor quantidade de resíduos inorgânicos, porém todas as amostras estão de acordo com os requisitos do Ministério Agricultura (BRASIL, 2001). Esta determinação é importante podendo detectar adulterações no produto, principalmente nos que são comercializados em pó, onde a adição de elementos como terra, por exemplo, resultaria em valores elevados de cinzas (WOYISKI, 1996).

O teor de umidade deve ser inferior a 8% para garantir-se qualidade da própolis (BRASIL, 2001), Para este parâmetro houve uma variação grande entre as amostras estudadas, de 2,09% a 9,13%, sendo que as própolis de Cianorte e Paranavaí excederam o limite do Ministério da Agricultura, porém deve-se considerar que podem ocorrer variações pelas condições de armazenamento e manipulação (WOYISKI, 1996).

Os resultados para resíduos insolúveis e sólidos solúveis em etanol estão de acordo com a legislação, sendo abaixo de 40% e acima de 35% respectivamente (BRASIL, 2001), parâmetros altamente relacionados ao solvente utilizado e solubilidade da amostra neste (FUNARI et al., 2006).

Os resultados obtidos para o teor de cera mostram que todas as própolis estão de acordo com o exigido, pois apresentam valores baixos, entre 2,33% e 11,09%, percentagens que estão dentro do limite permitido, que é de no máximo 25% (BRASIL, 2001), importante, pois as substância que compõem a cera não são consideradas farmacologicamente ativas (WOYISKI, 1996).

Quanto às análises cromatográficas, a Figura 1 mostra os cromatogramas obtidos para as amostras de extratos de Própolis de Uniflor, Cambará, Maringá, Cianorte, Paranavaí e Ilha Grande respectivamente. Nos extratos de própolis foram detectados, no total, nove compostos, mostrando os picos com as substâncias identificadas, sendo Ácido cafeico (1); Ácido *p*-cumárico (2); Apigenina (3); CAPE (4); Pinocembrina (5); Crisina (6); Galangina (7); Acetina (8); e Artepilin C(9).

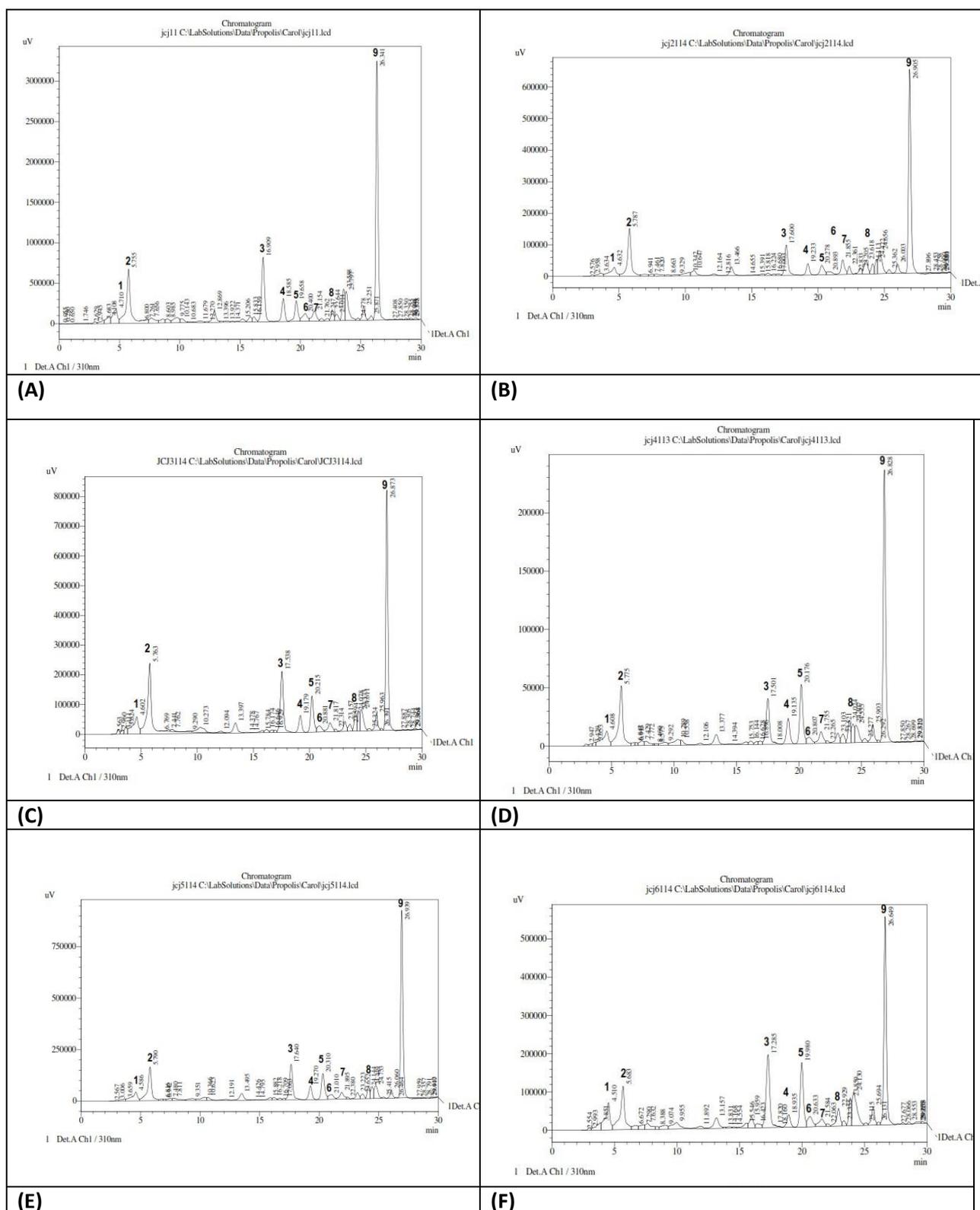


Figura 1: Cromatograma da amostra de Extrato de Própolis: (A) Uniflor; (B) Cambará; (C) Maringá; (D) Cianorte; (E) Paranavai; (F) Ilha Grande.

Para estas amostras, quatro compostos de ácidos fenólicos foram identificados: ácido cafeico, ácido p-cumárico, CAPE e Artepilin C, bem como a presença dos flavonóides: apigenina, crisina e pinocembrina. Estes resultados mostram a importância de utilizar os ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido p-cumárico, CAPE e Artepillin C) e

flavonóides (apigenina, crisina e pinocembrina), como marcadores para quantificar própolis e seus produtos derivados.

Entre todos os compostos já identificados na própolis, Artepillin C (Figura 2) é o composto químico que atrai a atenção de pesquisadores, devido a suas inúmeras propriedades biológicas. Devido aos altos níveis de Artepillin C, a própolis brasileira tem sido amplamente estudado por pesquisadores em todo o mundo, especialmente a própolis verde. (CHANG et al., 2008)

Através dos resultados obtidos neste trabalho e de informações obtidas na literatura, a própolis usada neste estudo pode ser considerada como sendo a própolis verde, porque, entre os compostos fenólicos identificados, Artepillin C constitui a principal substância química.

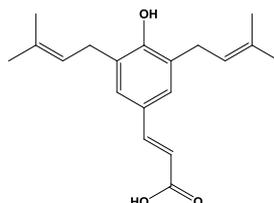


Figura 2: Estrutura Química do composto Artepillin C.

Através da análise da Figura 1 é possível observar que todas as amostras de própolis apresentam as mesmas características químicas onde predomina os picos 2, 3 e 9. Já nos cromatogramas de Cianorte, Paranavaí e Ilha Grande, observa-se o pico da substância 5 bem elevado, com concentração similar à substância do pico 3 para cada amostra.

Devido à variação na composição química da própolis, que ocorre de acordo com a flora local e condições geográficas, se torna necessária uma padronização destes extratos de própolis. (SALATINO et al., 2011). Através das análises dos cromatogramas, pode-se verificar que, em função da concentração de própolis, diferentes compostos fenólicos são extraídos a partir da própolis, resultando em extratos com diferentes propriedades biológicas.

A ação antimicrobiana foi comprovada através dos testes microbiológicos realizados, onde obteve-se ação bacteriostática e bactericida da própolis frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus rhamnosus*.

As Figuras abaixo 3, 4 e 5 são imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura de cortes de dentes permanentes e decíduos imersos em soluções de extrato de própolis e de clorexidina manipulada à 0,12% e corte de dentes que ficaram em tubos vazios.

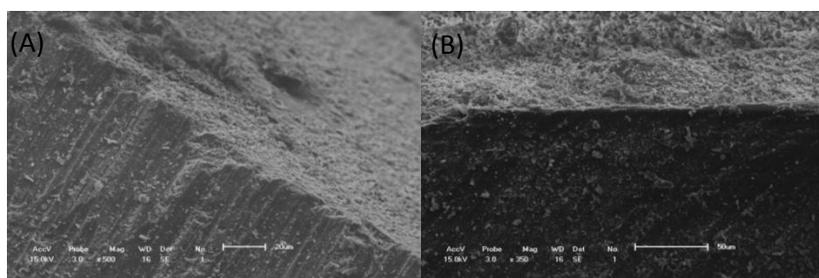


Figura 3: Micrografia de MEV de dentes imersos em amostras de extrato de própolis: (A) Dente permanente com aumento de 500 X e (B) Dente Decíduo com aumento de 350 X.

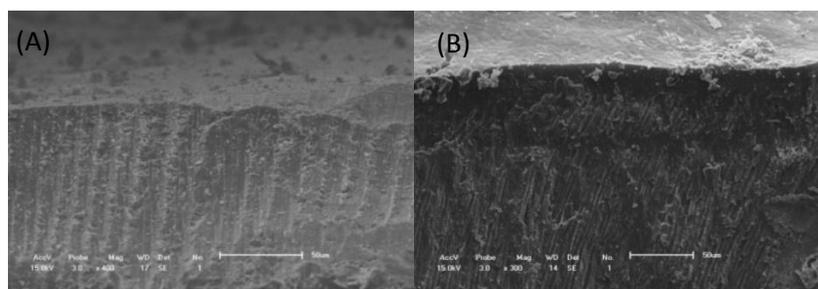


Figura 4: Micrografia de MEV de dentes imersos em clorexidina à 0,12% manipulada: (A) Dente permanente com aumento de 400 X e (B) Dente Decíduo com aumento de 300 X.

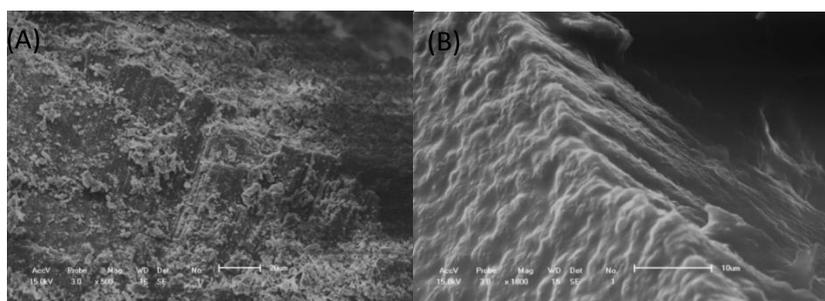


Figura 5: Micrografia de MEV de dentes que não foram imersos em soluções, ficaram em tubos vazios: (A) Dente permanente com aumento de 500 X e (B) Dente Decíduo com aumento de 1800 X.

Observou-se que os dentes que ficaram em soluções com o extrato de própolis e o antisséptico clorexidina à 0,12%, mostraram certa nitidez da imagem em relação aos túbulos dentinários, tanto nos dentes decíduos como nos permanentes, o que não aconteceu com a imagem da figura 3, onde os dentes não foram imersos em soluções, verificando uma superfície bastante rugosa com pouca organização dos túbulos dentinários. Isso demonstra que as soluções possuem algumas características favoráveis, semelhantes e que atuam de alguma forma na estrutura dos tecidos dentários, o esmalte e a dentina.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstram que a própolis verde do Paraná tem potencial para ser usada em solução como enxaguante bucal, inibindo a proliferação bacteriana, e melhorando o aspecto do esmalte dentário, sendo benéfico em relação aos produtos químicos já utilizados, pois se tratando de um produto natural não acarreta prejuízos aos usuários nem ao meio ambiente, contribuindo para a melhoria da saúde bucal, porém são necessários maiores estudos que contribuam com a caracterização e padronização deste material, quanto às características desejadas.

5. REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.

CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. (2008). Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 549-556.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de Própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(1): 171-178, jan.-mar. 2006.

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

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. 2005. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm** 55: 423-430.

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

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition. **NCCLS document M7-A6** {ISBN 1-56238-486-4}. NCCLS, 940 West Valley Road, suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

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

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

SIMÕES, C.C.; ARAUJO, D.B.; ARAUJO, R.P.C. 2008. 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** 18: 84-89.

WOISKY, R.G. do Rio. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. São Paulo. 1996. 74 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.