

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA CONTRA BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS

Bruna Hypólito Garcia¹; Ariane Giachini dos Santos¹; Claudenice Francisca Providelo Sartor²; Daniele Fernanda Felipe²

RESUMO: É crescente a preocupação do consumidor em fazer o uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível de produtos naturais, um extrato que têm sido empregado há milhares de anos na medicina popular é o extrato de própolis. A própolis é uma resina produzida por abelhas a partir de partes de plantas, que contém inúmeras substâncias, dentre elas os flavonóides. Suas características variam conforme a espécie vegetal visitada pelas abelhas, bem como o clima predominante, ou seja, sua cor, sabor, odor, consistência, composição química e atividade biológica dependem das procedências das espécies vegetais e das estações do ano. A grande variedade de sua composição química vem despertando um grande interesse devido a sua ação farmacológica e suas diversas propriedades terapêuticas, destacando-se as ações antiinflamatórias, cicatrizante, antifúngica e antimicrobiana. Sendo assim, este trabalho visou testar e comprovar a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis verde do apiário da universidade estadual de Maringá e da própolis vermelha vinda de João Pessoa-PB, contra as bactérias *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos casei* causadoras da cárie. Primeiramente, foi avaliada a ação antimicrobiana dos extratos de própolis liofilizados e a partir dos resultados obtidos o extrato da própolis vermelha foi incorporado em um enxaguatório bucal por apresentar uma maior atividade antimicrobiana. Foram realizados testes para saber se a formulação apresenta ação contra as bactérias cariogênicas e após foi efetuado o controle de qualidade e estudo da estabilidade acelerada com a formulação desenvolvida que será destinada a prevenção da cárie.

PALAVRAS-CHAVE: Ação anticariogênica; Formulações contra cárie; *Lactobacillus casei*; *Streptococcus mutans*; Substâncias de origem natural.

1 INTRODUÇÃO

É crescente a preocupação do consumidor em fazer o uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível de produtos naturais (PACKER; LUZ, 2007). Segundo Nogueira et al (2007), um extrato que têm sido empregado há milhares de anos na medicina popular é o extrato de própolis, o qual tem sido utilizado por várias finalidades.

Em países de clima temperado, segundo Nogueira et al (2007), são poucas as plantas que produzem essa resina, mas no Brasil há uma grande variedade delas como própolis verde e vermelha. As características da própolis variam conforme a espécie vegetal visitada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, bem como o clima predominante, ou seja, sua cor, sabor, odor, consistência, composição química, e sua atividade biológica dependem das procedências das espécies vegetais e das estações do ano. Sua

¹ Acadêmicos do Curso Farmácia do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). brunahypolito@hotmail.com; ariane_ags@hotmail.com

² Orientadoras e docentes do curso de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. claudenice@cesumar.br; daniefefelipe@cesumar.com

composição química é variada, sendo que já foram identificadas mais de 200 substâncias em própolis de diferentes localidades, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. Dentre essas classes de substâncias, destacam-se a dos flavonóides e a dos ácidos fenólicos, pois é atribuída a elas grande parte das atividades biológicas constatadas para a própolis (FUNARI e FERRO, 2006).

A própolis é uma importante alternativa terapêutica do ponto de vista econômico e eficácia farmacológica por ser de fácil obtenção e por apresentar inúmeras propriedades farmacêuticas. Entre estas, está comprovada a ação antimicrobiana frente a vários agentes etiológicos, sobretudo bactérias causadoras da cárie e leveduras, sobretudo *Candida albicans* (LONGHINI et al, 2007). E ainda a ação antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, e anticariogênica.

Medidas terapêuticas capazes de combater a placa bacteriana, tanto curativamente, como preventivamente têm um impacto bastante positivo sobre a prevenção de várias patologias bucais dentre elas a cárie. Assim, nas ultimas décadas tem sido observado mundialmente um crescente interesse global no aproveitamento da biodiversidade, particularmente nas espécies vegetais, que vêm sendo utilizadas em várias áreas da saúde. Portanto, a procura pela descoberta de agentes antimicrobianos, oriundos de substâncias naturais pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos importantes na odontologia (ANDREWS, 2001).

A cárie, que é formada por um processo de descalcificação do esmalte dentário e da dentina por ação de ácidos orgânicos formados por bactérias fermentadoras, principalmente, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, que atuam sobre os carboidratos introduzidos com a dieta alimentar do homem, onde acredita-se que *S. mutans* esteja envolvido com o desenvolvimento inicial da cárie, enquanto os *Lactobacilos casei* sejam os responsáveis pelo comprometimento da lesão (NOGUEIRA et al, 2007).

Além dos métodos tradicionais, tais como acompanhamento periódico, escovação com flúor, aplicação tópica com flúor, dieta baixa de sacarose, selante e coloração com soluções, alguns casos exigem uma maior eficácia no controle da cárie. Por isso, pesquisadores estão atualmente interessados em substâncias naturais que oferecem como alternativas o controle da cárie e resposta antimicrobiana com menos riscos associados (DUAILIBE; GONÇALVES e AHID, 2007).

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo testar e comprovar a ação antimicrobiana dos extratos de própolis verde e vermelha frente às bactérias cariogênicas e desenvolvimento de um enxagatatório bucal para prevenção da cárie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A própolis verde foi coletada do apiário da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a própolis vermelha teve origem de um apiário localizado em João Pessoa-PB.

Foram pesados 100g de própolis verde e triturados em um liquidificador até virar pó, após foi pesado novamente até obter 100g de pó de própolis verde, o mesmo foi realizado com a própolis vermelha. As duas própolis foram colocadas em bécker diferentes e se adicionou um litro de álcool 96° GL em cada bécker deixando por 24 horas em um recipiente hermético. Após às 24 horas a própolis foi batida no liquidificador novamente por 5 minutos durante 5 vezes. Em seguida as própolis foram filtradas e armazenadas para realizar a liofilização.

A liofilização foi realizada na UEM, onde se obteve os extratos liofilizados, da própolis verde e vermelha, assim como seus resíduos.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foi utilizada a bactéria *Streptococcus mutans*, ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* isolada a partir do produto lácteo yakult 40. A

padronização das bactérias foram realizadas da seguinte forma: os *Streptococcus mutans* cultivados em meio Ágar Sangue (BHI 5% sangue), retirou-se, com alça de platina, uma colônia isolada da bactéria que foi transferida para uma placa contendo Ágar sangue, pelo método de estrias contínuas. Para o *Lactobacillus casei*, a partir da placa onde foi acondicionado 0,1mL do Yakut, retirou-se, uma colônia isolada, com auxílio de uma alça de platina, que foi inoculada em tubo de ensaio contendo o meio Ágar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) inclinado em ápice, pelo método de estrias contínuas. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C, por 24 horas. Após o crescimento das respectivas bactérias, fez-se a padronização do inoculo para 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Os extratos de própolis foram submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em Ágar de acordo com a metodologia de Nogueira et al (2007). Foram colocados em discos de papel de filtro com 5mm de diâmetro e aplicados os extratos de própolis em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75 E 1%), e 10uL de solução Digluconato de Clorexidina a 1% como controle antimicrobiano. As placas contendo as bactérias cariogênicas como microorganismos detectores foram incubadas por 24 horas a 37°C para leitura dos resultados.

Após leitura dos resultados e levantamento bibliográfico uma formulação de uso odontológico foi desenvolvida, no caso, um enxaguatório bucal onde foi incorporado o extrato de própolis vermelha (0,75%) por apresentar maior ação antimicrobiana. Os componentes utilizados na formulação foram: mentol, eucaliptol, álcool 96°GL, lauril sulfato de sódio, sacarina sódica, nipagin, Glicerina, extrato de própolis (0,75%), essência de menta, corante vermelho, água destilada.

Quanto ao preparo da formulação, pulverizou-se o mentol (0,1g) e adicionou o eucaliptol (0,4mL) e homogeneizou-se, adicionou o álcool (1mL) e homogeneizou até completa solubilização do mentol. Adicionou-se lauril sulfato de sódio (3mL) e a essência de menta, pesou-se 100 gramas de própolis vermelha e diluiu com 1 mL de álcool pipetando-se 750µL da mistura formada e misturar com 250µL de álcool, adicionou-se 1 mL de tween 20. Em seguida pulverizou o nipagin e a sacarina, adicionou a glicerina e homogeneizou até solubilização (se necessário aquecer). Os componentes da formulação foram todos misturados e homogeneizados completando o volume com água destilada (q.s.p), ainda adicionou o corante e 2mL de tween, homogeneizou e verificou o pH (6).

Foram desenvolvidas 3 formulações: Formulação com extrato de própolis vermelha, Formulação sem extrato de própolis vermelha (Saber se o conservante da formulação apresenta ação antimicrobiana), Formulação sem extrato de própolis vermelha e sem nipagin (Saber se os componentes da formulações apresentam ação antimicrobiana).

Após, foi testada ação da formulação seguindo a mesma metodologia descrita na avaliação da atividade dos extratos de própolis. Foi realizado controle de qualidade do produto desenvolvido sendo avaliados os itens aspecto, cor, odor e pH. Além disso, foi realizado o estudo de estabilidade preliminar, seguindo o Guia de estabilidade da ANVISA (COSMÉTICOS, 2004). Neste teste, amostras do produto foram armazenadas em estufa (40°C), na geladeira (5°C) e em temperatura ambiente durante 30 dias, sendo avaliadas nos tempos zero, 24 horas e após 7,15 e 30 dias, quanto aos mesmos itens que foram verificados no controle de qualidade.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Tendo em vista que as características da própolis variam conforme a espécie vegetal visitada pelas abelhas, bem como o clima predominante, ou seja, sua cor, sabor, odor, consistência, composição química, e sua atividade biológica dependem das procedências das espécies vegetais e das estações do ano, pode-se perceber que a

própolis verde do apiário da universidade estadual de Maringá apresentou uma ação menor do que a própolis vermelha originada de João Pessoa. Sendo assim, a própolis vermelha 75% foi utilizada para desenvolvimento de um enxaguatório bucal.

Todos os testes antimicrobianos em difusão em ágar foram realizados em triplicatas, obtendo-se uma média.

Tabela 1. Média obtida para as bactérias cariogênicas para própolis verde e vermelha

Bactéria utilizada	Extrato de própolis	Halo obtido	Digluconato clorexidina	Halo obtido
<i>Streptococcus mutans</i>	Verde 0,75%	0,5 cm	1%	1,0 cm
	Vermelha 0,75%	1,0 cm	1%	1,0 cm
<i>Lactobacillus casei</i>	Verde 0,75%	0,3 cm	1%	1,2 cm
	Vermelha 0,75%	1,0 cm	1%	1,4 cm

Após o desenvolvimento das formulações as mesmas foram testadas utilizando o método de difusão em ágar e a clorexidina como padrão, onde os testes foram realizados em triplicata obtendo-se a média. A formulação sem extrato de própolis vermelha, formulação sem extrato de própolis vermelha e sem nipagin, não apresentaram ação contra as bactérias cariogênicas. Já a formulação com extrato de própolis vermelha à 0,75% apresentou um resultado satisfatório contra as bactérias cariogênicas, obtendo-se uma média de halo de 1,1 cm para *streptococcus mutans* e para digluconato de clorexidina (padrão) 1,0 cm, já para *Lactobacillus casei* o halo obtido foi de 1,9 cm e para padrão o halo obtido foi de 1,1 cm.

A formulação foi submetida à temperatura ambiente, 40°C em estufa e 5°C em geladeira para estudo da estabilidade preliminar, onde após 30 dias a formulação apresenta-se dentro dos padrões, ou seja, a cor, pH, odor encontram-se sem alterações.

4 CONCLUSÃO

Os estudos da atividade antimicrobiana realizadas com os extratos de própolis liofilizados mostraram que a própolis vermelha provinda de João Pessoa–PB apresenta atividade antimicrobiana contra as bactérias causadoras da cárie. O enxaguatório bucal também se mostrou eficaz contra o *streptococcus mutans* e *lactobacillus casei* mostrando que o mesmo pode ser utilizado como alternativas para prevenção, controle e resposta antimicrobiana com menos riscos associados da cárie. Após levantamento bibliográfico a formulação desenvolvida foi um enxaguatório bucal e para trabalhos futuros deve-se desenvolver e testar ação antimicrobiana com outras formas farmacêuticas de interesse odontológico como: gel dental, creme dental, flúor para ser utilizada no tratamento e prevenção da cárie.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, J. M. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 5-16, (2001).

COSMÉTICOS – **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 47p., 2004.

DUAILIBE, Silvana Alves de Carvalho; GONÇALVES, Azizedite Guedes; AHID, Fernando Jorge Mendes. Effect of a propolis extract on Streptococcus mutans counts in vivo. **Journal Of Applied Oral Science**, Bauru, p. 420-423. set. 2007.

FUNARI, Cristiano; FERRO, Vicente. Análise de própolis. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, p 171-178, jan/mar. 2006.

LONGHINI, Renata; RAKSA, Sheila M.; OLIVEIRA, Ana Carla P.; SVIDZINSKI, Terezinha I. E.; FRANCO, Selma L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. João Pessoa, p. 388-395. July/Sept. 2007.

NOGUEIRA, M.A; DIAZ, M.G; TAGAMI, P.M; LORSCHIDE, J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Viçosa, n.1, p.93-97, jul. 2007.

PACKER, Janaina F.; LUZ, Marisa M.s. da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, n.1, p.102-107, mar. 2007.