



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

MARIA ANGÉLICA DE SÁ ASSIS

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS
AQUOSO E GLICÓLICO DE PRÓPOLIS SOBRE BACTÉRIAS
ANAERÓBIAS DE IMPORTÂNCIA ODONTOLÓGICA**

2018

MARIA ANGÉLICA DE SÁ ASSIS

**AÇÃO ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS AQUOSO E
GLICÓLICO DE PRÓPOLIS SOBRE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS DE
IMPORTÂNCIA ODONTOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia Bucal. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Assis, Maria Angélica de Sá

Ação antimicrobiana e citotoxicidade de extratos aquoso e glicólico de Própolis sobre bactérias anaeróbias de importância odontológica / Maria Angélica de Sá Assis. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
47 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira.

1. Extratos naturais. 2. Própolis. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Citotoxicidade. 5. Bactérias anaeróbias. I. Oliveira, Luciane Dias de , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Univiversidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho

Centro Universitário Braz Cubas

Universidade de Taubaté (Unitau)

Dr. Jônatas Rafael de Oliveira

São José dos Campos, 27 de novembro de 2018.

DEDICATÓRIA

A meus pais Vera (*in memoriam*) e Osvaldo, por terem sido sempre meus grandes incentivadores. A motivação de vocês me trouxe até aqui e certamente me levará além. Tudo o que sou, devo a vocês!

A meu esposo Júnior e à minha filha Marina por toda compreensão, paciência e suporte ao longo de todo o processo. Sem o amor e o apoio de vocês eu não teria conseguido. Essa conquista é de vocês também!!!

À minha amiga e colega de profissão Maria Eloísa Grecco, pela oportunidade em ser sua assistente, o que me despertou o interesse em buscar o mestrado. Sua generosidade foi um presente e um aprendizado que levarei pra vida toda!

A todos os meus familiares e amigos, por compreenderem minha ausência neste período e pelas palavras de incentivo na busca desta realização!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” UNESP, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal na pessoa da coordenadora Prof. Assoc. Luciane Dias de Oliveira.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação Bruno Shiguemitsu Tanaka, Sandra Mara Cordeiro e Carolina Lourenço Rei, por toda atenção e disponibilidade.

À minha orientadora, professora Luciane Dias de Oliveira, por toda dedicação no desenvolvimento desse trabalho. Seu conhecimento, humildade, paciência, energia, otimismo e solicitude foram muito valiosos e serão sempre exemplo para minha carreira como mestre. Obrigada por acreditar em mim!

Aos docentes do Programa de Pós-graduação da área de Microbiologia e Imunologia, especialmente às professoras Juliana Campos Junqueira e Luana Marotta Vasconcellos pelos ensinamentos e por despertarem em mim o interesse e a dedicação pelos estudos e pela pesquisa.

À professora Symone Cristina Teixeira pela oportunidade de estágio docente na disciplina de Odontologia em Saúde Coletiva, que fortaleceu em mim a vontade e o carinho em ensinar.

Ao meu colega de laboratório - Lucas de Paula Ramos – por toda ajuda e disponibilidade no desenvolvimento dessa pesquisa. Sua atenção e paciência foram fundamentais em todas as etapas dos experimentos. A você toda minha admiração!

Aos colegas do Programa que, durante esta jornada, foram importantes para meu crescimento e também apoio nas dificuldades. Desejo muito sucesso a vocês!

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos.” Marcel Proust*

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Avaliação da Atividade antimicrobiana dos extratos	15
3.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)	15
3.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos sobre biofilmes	16
3.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos em queratinócitos humanos	18
3.3 Análise estatística	21
4 RESULTADO	22
4.1 Análise antimicrobiana dos extratos em cultura planctônica	22
4.2 Análise antimicrobiana dos extratos sobre biofilmes	23
4.3 Análise da citotoxicidade dos extratos em queratinócitos humanos	32
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXOS	46

Assis M.A.S. Ação antimicrobiana e citotoxicidade de extratos aquoso e glicólico de Própolis sobre bactérias anaeróbias de importância odontológica [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

As plantas medicinais e os fitoterápicos têm sido utilizados como coadjuvantes e alternativos no combate a diversas doenças com crescente frequência, no entanto, na Odontologia seu uso ainda é bastante limitado. Com isso, o objetivo deste estudo é avaliar a ação antimicrobiana dos extratos aquoso e glicólico de própolis verde sobre micro-organismos anaeróbios de interesse odontológico, bem como sua citotoxicidade, a fim de introduzir e incentivar o uso efetivo e sistemático desse fitoterápico em produtos como dentifrícios e enxaguatórios bucais no combate a cáries e doenças periodontais. Os extratos comerciais aquoso e glicólico de própolis foram obtidos das empresas Apis Flora e Mapric, respectivamente. Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas-padrão (ATCC) de *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima (CIM e CMM), segundo Clinical and Laboratory Standards Institute. Para biofilmes monotípicos, suspensões padronizadas (10^7 céls/mL) foram adicionadas em poços de microplacas e após 48 h em anaerobiose foram tratados com 3 concentrações do extrato de própolis (n=12) por 5 min. Foi incluído um controle positivo (solução fisiológica) e um controle negativo (clorexidina). O biofilme foi mensurado pelos testes MTT e Cristal Violeta. Para análise de citotoxicidade, queratinócitos humanos (HaCaT) foram cultivados e colocados em contato com os extratos por 5 min e 24h. Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes ANOVA e Tukey Test (5%). Os resultados mostraram que os extratos tiveram ação antimicrobiana contra as suspensões planctônicas e os biofilmes monotípicos dos patógenos, sendo tão ou mais eficazes que a clorexidina. Quanto à citotoxicidade, observou-se diminuição da viabilidade celular dos queratinócitos humanos após a aplicação dos extratos, do mesmo modo que a clorexidina, sendo o extrato glicólico menos citotóxico que o aquoso. Com isto conclui-se que os extratos comerciais aquoso e glicólico de própolis verde tem ação antimicrobiana contra os micro-organismos anaeróbios orais estudados e apresentam potencial para serem utilizados nos tratamentos contra os referidos patógenos, já que no que se refere à citotoxicidade, se comportaram de forma semelhante à Clorexidina, cujo uso é conhecidamente seguro e eficaz.

Palavras-chave: Extratos naturais. Própolis. Atividade antimicrobiana. Citotoxicidade. Bactérias anaeróbias.

Assis MAS Antimicrobial action and cytotoxicity of aqueous and glycolic extracts of propolis on anaerobic bacteria of dental importance [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Medicinal plants and herbal medicines have been used as adjuvants and alternatives in fighting various diseases with increasing frequency. However, in dentistry its use is still quite limited. Therefore, the objective of this study is to evaluate the antimicrobial action of the aqueous and glycolic extracts of green propolis on anaerobic microorganisms of dental interest, in order to introduce and encourage the effective and systematic use of this herbal medicine in products such as dentifrices and mouthwashes in the fight against tooth decay and periodontal diseases. Aqueous and glycolic commercial extracts of propolis were obtained from Apis Flora and Mapric companies, respectively. To evaluate the antimicrobial activity, standard strains (ATCC) of *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in planktonic culture was used, verifying the minimum inhibitory concentration and minimum microbicide concentration (MIC and CMM), according to Clinical and Laboratory Standards Institute. For monotypic biofilms, standardized suspensions (10^7 cells / mL) was added to microplate wells and after 48 h in anaerobiosis was treated with 3 concentrations of propolis extracts ($n = 12$) for 5 min. A positive control (saline solution) and a negative control (chlorhexidine) was included. The biofilm was measured by the MTT and Violet Crystal tests. For cytotoxicity analysis, human keratinocytes (HaCaT) were cultured and placed in contact with the extracts for 5 min and 24 h. Data were analyzed statistically by ANOVA and Tukey Test (5%). The results showed that the extracts had antimicrobial action against planktonic suspensions and monotypic pathogen biofilms, being as or more effective than chlorhexidine. As for cytotoxicity, the cellular viability of human keratinocytes was observed after application of the extracts, in the same way as chlorhexidine, the glycolic extract being less cytotoxic than aqueous. It is concluded that the aqueous and glycolic extracts of green propolis have an antimicrobial action against the studied oral anaerobic microorganisms and have the potential to be used in the treatments against these pathogens, since in cytotoxicity they behaved in a way similar to chlorhexidine, the use of which is known to be safe and effective.

Keywords: Natural extracts. Propolis. Antimicrobial activity. Cytotoxicity. Anaerobic bacteria.

1 INTRODUÇÃO

O autoconsumo, o consumo irresponsável e a má-prescrição de antibióticos têm levado à seleção de micro-organismos resistentes a esses fármacos industrializados. Esses desafios de resistência a antimicrobianos sintéticos abriram novas perspectivas na busca de produtos naturais (Chinsembu, 2016; Afrouzan, 2018). As plantas medicinais são largamente utilizadas desde os tempos primórdios pela humanidade, sendo retiradas da natureza em sua forma bruta sem purificação e usadas como medicamentos. Suas propriedades biológicas são reconhecidas pela sabedoria popular e transmitidas de geração para geração. Já os fitoterápicos são preparações farmacêuticas derivadas de plantas que são reconhecidas por sua eficácia e cuja ação já tenha sido comprovada cientificamente.

Apesar da utilização de plantas medicinais com finalidade terapêutica ser de origem popular, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado o estudo científico dessas plantas, objetivando o conhecimento dos benefícios desses agentes medicinais para o desenvolvimento dos fitoterápicos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) alerta que o uso inadequado de medicamentos naturais pode causar diversas reações como intoxicações, enjoos, irritações, edemas e até a morte, como qualquer outro medicamento. Por isso é tão importante o processo de industrialização, para se evitar contaminações por micro-organismos e substâncias estranhas, além de padronizar a quantidade e a forma certa que deve ser administrada, permitindo uma maior segurança de uso.

A terapia de combinação entre antimicrobianos convencionais e fitoterápicos tem se tornado um tema significativo no estudo das doenças infecciosas. Isso favorece o desenvolvimento de fármacos de origem natural como uma importante alternativa para diversos tratamentos. O Brasil apresenta uma vasta biodiversidade e a grande disponibilidade dessas plantas aliada ao baixo custo para a preparação dos produtos representa mais um fator de incentivo para se pesquisar a ação dos fitoterápicos sobre diversas doenças.

Segundo Carrasco et al. (2016), muitas plantas têm propriedades benéficas, como atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes derivadas de seus componentes bioativos específicos, sendo os extratos de plantas geralmente considerados seguros e eficazes contra certas bactérias. Eles são amplamente

utilizados na alimentação como promotores de saúde, em particular na Ásia, África e nos países da América do Sul e estão gradualmente passando a ser utilizados também nos países desenvolvidos.

Há ainda poucos estudos correlacionando especificamente a própolis e sua ação contra patógenos anaeróbios orais. Koru et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de cinco amostras de própolis, coletadas em quatro diferentes regiões da Turquia e do Brasil, frente a nove cepas anaeróbias – *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus micros*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula* - e todos os micro-organismos se mostraram sensíveis aos extratos, sugerindo que a própolis deve ser utilizada no tratamento de doenças da cavidade oral. Ghuman et al. (2016) avaliando a atividade antimicrobiana de 11 diferentes extratos sobre bactérias associadas a feridas de pele, mostraram que muitos dos extratos apresentaram-se eficazes sobre uma ampla gama de bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, sendo essas últimas as cepas mais susceptíveis. Saxena et al. (2015) analisaram a ação de 5 extratos vegetais (*Propolis*, *Curcuma longa*, *Morinda citrifolia*, *Triphala* e *Azadirachta indica*) sobre *Enterococcus faecalis*, em comparação com hipoclorito de sódio 2,5% e verificaram que a própolis demonstrou a maior área de inibição entre todos os extratos vegetais analisados, sendo próxima ao hipoclorito de sódio, e concluíram que própolis tem potencial antimicrobiano sobre *E. faecalis*, um micro-organismo de grande importância odontológica. Em 2016, Akca et al. compararam a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis com a clorexidina sobre diversos micro-organismos, incluindo *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Os resultados revelaram que a própolis foi mais efetiva na inibição de bactérias Gram-positivas que Gram-negativas na forma plactônica, entretanto, sobre biofilmes as concentrações bactericidas e fungicidas da própolis e clorexidina foram semelhantes para *S. mutans*, *P. gingivalis* e *C. albicans*, sugerindo que o extrato etanólico de própolis pode ser tão efetivo como a clorexidina sobre micro-organismos bucais em biofilme.

A própolis é um produto facilmente acessível que está se tornando cada vez mais popular devido ao seu potencial papel na contribuição para a saúde humana.

É conhecida como um poderoso antibiótico natural, sendo sprays de própolis muito utilizados popularmente para combater dores de garganta. Essa substância extraída da flora regional pelas abelhas é conhecida por ter propriedades biológicas contra inúmeros micro-organismos de interesse clínico (Freires et al., 2016; Cavendish et al., 2015; Mouhoubi-Tafinine et al., 2016). É uma mistura complexa, de aspecto pastoso, modificada por meio das secreções salivares das abelhas. Sua composição está relacionada com a ecologia da região onde é coletada e à espécie de abelha coletora. O Brasil é destaque internacional em sua produção e nele existem vários tipos de própolis, incluindo verde, vermelha e marrom (Tazawa et al., 2016).

Zeighampour et al. (2018) compararam o efeito da própolis como agente antibacteriano natural incorporada ao poli álcool vinílico (PVA) em diferentes formas de nanofibra, microfibra e filme. A manta nanofibrosa apresentou liberação contínua de própolis durante 96 horas, mantendo a atividade antibacteriana total por até 51 h, o que é de grande importância nas feridas por queimaduras. Estes resultados confirmam o desempenho avançado da própolis natural na forma de substrato de nanofibra como curativo.

Afrouzan et al. (2018), estudando as composições químicas e efeitos de quatro amostras de própolis de diferentes áreas do Irã, constataram atividade antimicrobiana das mesmas contra *C. albicans*, *Escherichia coli* e *S. aureus*, talvez devido à presença de flavonóides, ácidos fenólicos e terpenos, como componentes ativos que podem ser usados isoladamente ou em combinação com antibióticos, selecionados para sinergizar o efeito antibiótico, bem como prevenir a resistência microbiana aos antimicrobianos disponíveis.

O extrato etanólico de própolis, especialmente o tipo brasileiro verde é amplamente e principalmente utilizado para fins terapêuticos, apesar da falta de conhecimento sobre seus efeitos e seu modo de ação. Este tipo de própolis é proveniente da coleta, pelas abelhas comuns (*Apis mellifera*), das resinas dos brotos de um arbusto conhecido popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha (*Baccharis dracunculifolia*) (Roberto et al., 2016a, 2016b; Rodrigues et al., 2016). Niedzielska et al. (2016) estudaram a influência do extrato etanólico da própolis verde brasileira na higiene e na microbiota oral de 31 pacientes após fratura de mandíbula, tratados no Hospital de Cirurgia Maxilofacial da Universidade Médica da Silésia. A distribuição de pacientes em dois grupos de estudo foi feita de forma

aleatória: um grupo com 16 pacientes (14 homens e 2 mulheres) usaram um gel dental contendo extrato etanólico de própolis verde brasileira (EEP-B) a 3% para a higiene oral e um grupo controle, com 15 pacientes (10 homens e 5 mulheres) usaram um gel dental sem o EEP-B para a higiene oral (placebo). Os resultados foram examinados nos dias 1, 8, e 22 após a cirurgia. Para efeitos do estudo, foram realizados dois exames clínicos e microbiológicos. O resultado mostrou que o extrato etanólico de própolis verde brasileira em forma de gel a 3%, quando usado para manter a higiene bucal em pacientes com feridas pós-operatórias da mucosa oral apresentou ação bactericida, fungicida e anti-inflamatória importantes no processo de cicatrização de tais feridas.

Camargo Smolarek et al. (2015) avaliaram *in vitro* os efeitos antimicrobianos de cremes dentais comerciais contendo compostos naturais: sorbitol (I), tocoferol (II), menta (III), canela / menta (IV), própolis / melaleuca (V), menta / açai (VI), menta / guaraná (VII), própolis (VIII), sendo suas propriedades antimicrobianas testadas contra patógenos orais como *S. mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. faecalis*. O resultado mostrou que as bactérias responderam de forma diferente às pastas, sendo os resultados, por ordem de eficácia: própolis / melaleuca > menta / guaraná > menta / açai > sorbitol > tocoferol > canela / menta > própolis > menta, confirmando que os cremes dentais com compostos naturais têm potencial terapêutico e precisam de pesquisas mais detalhadas para a aplicação clínica correta.

Franca et al. (2017) testaram três formulações de verniz de quitosana à base de própolis contendo diferentes concentrações (5%, 10% e 15%), produzidas pela dissolução da própolis com quitosana em veículo hidroalcoólico. Dentes bovinos foram utilizados para analisar a adesão das formulações e observar a liberação controlada de própolis associada ao verniz. Foi também avaliada a atividade antimicrobiana do composto *in vitro*. As formulações apresentaram aderência na superfície dentária e foram capazes de formar filmes muito rapidamente na superfície dos dentes bovinos, prevenindo a formação de biofilmes dentários cariogênicos. Além disso, vernizes de quitosana à base de própolis mostraram atividade antimicrobiana semelhante ou melhor do que o verniz de clorexidina contra todas as bactérias patogênicas orais. Todos os microrganismos foram sensíveis ao verniz e à quitosana. Os componentes ativos da própolis foram liberados por mais

de uma semana.

De Luca et al. (2017) investigaram os efeitos anticárie de um verniz de própolis experimental *in vivo*, e testaram ainda sua toxicidade contra fibroblastos. Os resultados mostraram que o verniz de própolis preveniu a cárie do esmalte na superfície lisa dos dentes de ratos e mostrou baixa toxicidade celular, encorajando novos estudos relacionados a estes compostos. Investigando os efeitos de produtos contendo própolis associados à clorexidina em concentrações mais baixas, Santiago et al. (2016) verificaram que essa combinação desempenha um papel anti-inflamatório importante e muito benéfico no tratamento de doenças periodontais. Yoshimasu et al. (2018) observaram a ação bactericida da própolis contra *P. gingivalis*, através do aumento da permeabilidade de sua membrana em 30 minutos, reforçando a aplicabilidade dessa terapêutica no tratamento da periodontite. Estes resultados podem ser significativos para o desenvolvimento de produtos odontológicos com ação antimicrobiana e pode ter implicações mais abrangentes para a indústria farmacêutica.

Diante do exposto, torna-se interessante avaliar a ação antimicrobiana do extrato de própolis verde sobre micro-organismos anaeróbios de importância odontológica, a fim de introduzir e incentivar o uso efetivo e sistemático desse fitoterápico em produtos como dentifrícios, irrigantes dos canais radiculares e de bolsas periodontais e enxaguatórios bucais no combate a cáries e doenças periodontais.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antimicrobiana dos extratos aquoso e glicólico de própolis verde sobre micro-organismos anaeróbios de importância odontológica, bem como a ação citotóxica em queratinócitos humanos, comparadas à clorexidina.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e glicólico de própolis verde sobre cepas-padrão (ATCC) de *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em cultura planctônica, verificando a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima (CIM e CMM);
- b) avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos aquoso e glicólico de própolis verde sobre biofilmes monotípicos de *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* no tempo de contato de 5 min;
- c) avaliar a citotoxicidade dos extratos aquoso e glicólico em queratinócitos humanos (HaCaT) no tempo de contato de 5 min e 24 h.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidos comercialmente o extrato aquoso de própolis 100% verde (Apis Flora – SP / Brasil) e o extrato glicólico de própolis (Mapric – SP / Brasil), ambos com os devidos laudos e especificações (Anexos).

3.1 Avaliação da Atividade antimicrobiana dos extratos

A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada sobre cepas de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de bactérias anaeróbias: *F. nucleatum* (ATCC 25586), *P. micra* (ATCC 23195), *P. endodontalis* (ATCC 35406), *P. gingivalis* (ATCC 33277), e *P. intermedia* (ATCC 33563), provenientes do Laboratório de Endodontia da faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

As cepas foram reativadas em caldo Brucella enriquecido (BBE) (BD-Heidelberg, Alemanha) com 1% de hemina e 1% de vitamina K (menadiona), após foram semeadas em ágar Brucella enriquecido, com incubação de 48 h, em câmara de anaerobiose (Whitley DG250 Workstation, UK).

3.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Para a determinação da CIM, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, norma M11-A7 (2012).

Para o teste foram preparados inóculos em solução salina a 0,9%, a partir de culturas com 48 h de incubação, padronizados em 0,5 na escala Mac Farland. Após foi iniciado o preparo da diluição dos extratos em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça). Para isso, foram adicionados 100 µL do caldo Brucella (Himedia, Índia)

enriquecido em 10 poços/grupo. A diluição se iniciou adicionando 100 µL dos extratos, apenas no primeiro poço da microplaca, de onde partiram uma série de 10 diluições.

Após o preparo das diluições de cada extrato, foram adicionados os inóculos padronizados de cada micro-organismo em seus respectivos grupos, adicionando o volume de 10 µL. A placa foi incubada por 48 h em estufa de anaerobiose a 37°C, passado este período a CIM de cada grupo foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turvação, indicadora de crescimento bacteriano.

Para a determinação da CMM foram semeados 10 µL da CIM, bem como 10 µL de uma concentração acima e de uma concentração abaixo dela em ágar Brucella enriquecido com sangue. Após 48 h de incubação, as placas em que não foi observado o crescimento de colônias corresponderam à CMM para cada micro-organismo.

3.1.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos sobre biofilmes

Foi avaliada a ação do extrato de própolis sobre biofilmes monotípicos de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. micra*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*.

Para a montagem dos biofilmes foram preparadas, em solução salina a 0,9%, suspensões microbianas padronizadas em 0,5 na escala Mac Farland. Em seguida, a suspensão padronizada foi dispensada em placas de microtitulação de 96 poços (TPP), no volume de 100 µL, em conjunto foram adicionados 100 µL do caldo Brucella. A placa foi incubada por 168 horas (7 dias), com substituição do meio de cultura a cada 48 h, para a manutenção do biofilme.

Passado o período de formação de cada biofilme, o mesmo foi encaminhado para a aplicação dos tratamentos. Foi realizado a aplicação dos extratos pelo período de 5 min, nas concentrações de 200, 100 e 50 mg/mL. Como controle negativo foi utilizada a solução de clorexidina 0,12% e solução salina estéril foi utilizada como controle positivo.

Após aplicação dos tratamentos, o biofilme foi lavado com solução fisiológica estéril, para a retirada de células mortas pela ação dos tratamentos. Em seguida, as

placas foram destinadas aos testes de mensuração do biofilme, pela verificação da biomassa pelo teste de Cristal violeta, e verificação da atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT.

Foram realizados 3 experimentos independentes, com 4 repetições cada, totalizando n=12 para cada grupo experimental. Os grupos experimentais estão expostos no quadro 1.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais para análise da atividade antimicrobiana do extrato sobre diferentes biofilmes

	PROP aquoso	PROP glicólico	CLX	CONTR
Pg	n=12	n=12	n=12	n=12
Pe	n=12	n=12	n=12	n=12
Pm	n=12	n=12	n=12	n=12
Fn	n=12	n=12	n=12	n=12
Pi	n=12	n=12	n=12	n=12

Legenda: PROP: extrato de própolis; CLX: clorexidina 0,12%; CONT: controle – solução fisiológica
Pg: *P. gingivalis*, Pe: *P. endodontalis*, Pm: *P. micra*, Fn: *F. nucleatum* e Pi: *P. intermedia*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.2.1 Avaliação da Biomassa pelo teste do Cristal Violeta

Após aplicação dos tratamentos, foram adicionados 200 µL/ poço de metanol por 20 min para fixação do biofilme. Em seguida, o metanol foi retirado e a placa foi incubada a 37°C por 24 h, para secagem. Após incubação foram adicionados 200 µL/ poço de cristal violeta a 1% (V/V) por 5 min, o corante foi retirado, e lavagens com solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e com ácido acético a 33% (V/V) foram realizadas. Após isso, a placa foi lida em leitora de microplaca e as densidades ópticas convertidas na biomassa do biofilme, por meio da fórmula:

% redução biomassa = (DO Grupo Tratado x 100) / Média DO Grupo Controle)

3.1.2.2 Viabilidade celular dos micro-organismos pelo teste de MTT

Após submetido aos respectivos tratamentos, preparou-se o biofilme para o teste de MTT. A solução de MTT foi preparada a partir da suspensão de 0,5 mg do pó de MTT (Sigma Aldrich Co., Alemanha) em 1 mL de Phosphate Buffer Saline (PBS) (Cultilab, Brasil) estéril. Para o teste foram adicionados 100 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 h em câmara de anaerobiose a 37°C; passado o período de incubação foi retirada a solução de MTT e adicionado 100 µL de Dimetilsufóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada a 37°C em estufa por 10 min e colocada no agitador constante por mais 10 min. Após isso, a placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm e as densidades ópticas obtidas foram convertidas, por meio da fórmula abaixo, em percentual de viabilidade das células do micro-organismo:

% Viabilidade = (DO Grupo Tratado x 100) / Média DO Grupo Controle)

3.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos em queratinócitos humanos

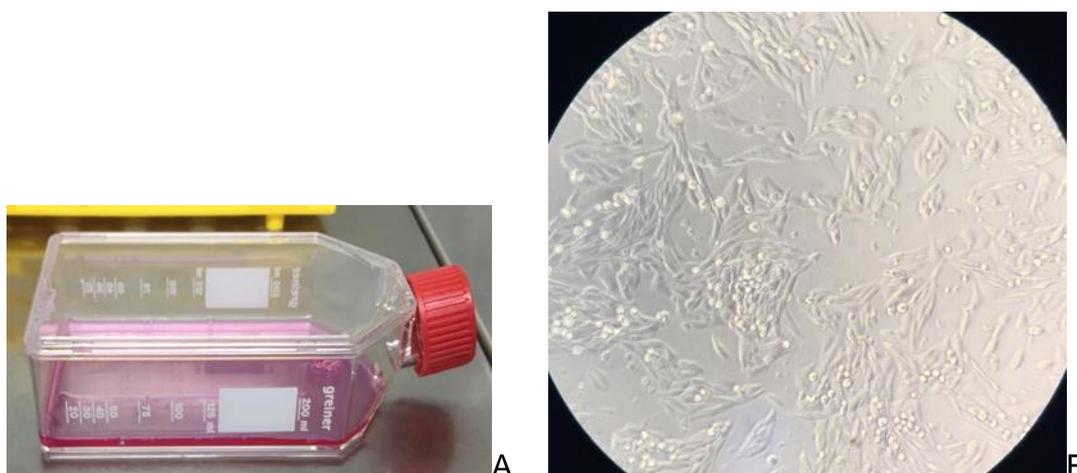
3.2.1 Cultivo Celular dos queratinócitos humanos

A cultura de Queratinócitos Humanos (HaCaT), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ), foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantida em frascos de cultivo celular (TPP, Suíça),

incubada em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica, com 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 h e ao atingir o estado de subconfluência das células (Figura 1), caracterizado pela ocupação de mais de 70% do frasco, as mesmas foram utilizadas nos testes. Para tanto, a monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultura com auxílio da tripsina (Invitrogen, Nova York, EUA). As células suspensas foram centrifugadas por 5 min a 3000 rpm. Foi realizado o teste de exclusão pelo azul de Trypan, e o número de células viáveis foi quantificado pela contagem em câmara de Neubauer.

Figura 1 - Cultivo celular da linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT)



Legenda: A -Frasco contendo a cultura celular B- Queratinócitos visualizados no microscópio com aumento de 200 vezes.

Fonte: Elaborado pelo autor.

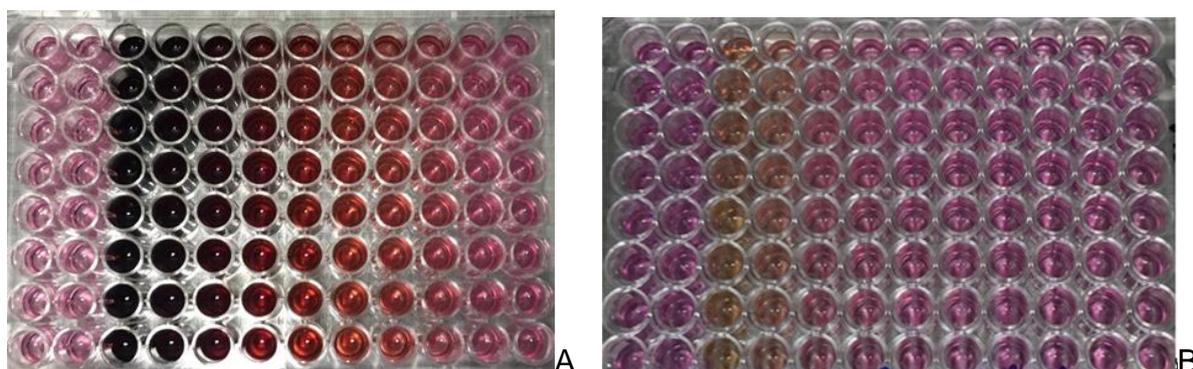
3.2.2 Viabilidade dos queratinócitos humanos pelo teste de MTT

A avaliação da citotoxicidade dos extratos de Própolis foi realizada por meio do teste colorimétrico MTT, analisando a atividade metabólica celular, após contato com os extratos por 5 min e 24 h. Para tanto, foram utilizadas culturas de queratinócitos humanos (HaCaT).

Em microplacas de 96 poços (TPP) foram adicionados 200 µL de meio DMEM + 10% SFB contendo 4×10^4 células viáveis. Estas placas foram incubadas (37°C,

com 5% de CO₂) por 24 h para a aderência celular. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram expostas a 10 diferentes concentrações de ambos os extratos (Figura 2 e Quadro 2).

Figura 2 - Aplicação de 10 diferentes concentrações dos extratos Aquoso (A) e Glicólico (B) de Própolis



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2 - Concentrações aplicadas sobre os queratinócitos humanos (HaCaT)

Extrato/tempo	Concentrações aplicadas									
	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
Aquoso/5 min	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
Aquoso/24 h	150	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
Glicólico/5 min	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39
Glicólico/24 h	150	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39

Legenda: Valores expressos em mg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como grupos controles foram utilizados a aplicação de meio DMEM suplementado com 10% SFB ou PBS para o tratamento por 5 min. Foi utilizado n=8 para todos os grupos. Após isso, os tratamentos foram descartados e os poços foram lavados com PBS para a retirada de células mortas.

Em seguida, as placas foram encaminhadas para verificação da atividade metabólica da cultura, pelo método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazina. Foram adicionados 100 µL/poço da

solução de MTT, seguido pela incubação das placas (37°C, com 5% de CO₂) por 4 h, ao abrigo da luz. Posteriormente a solução foi descartada e adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) para expor os cristais de formazina produzidos. Após incubação de 10 min e agitação em *shaker*, por igual período, a absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

3.3 Análise estatística

Os dados obtiveram distribuição normal e foram avaliados pelo método ANOVA complementado pelo Teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADO

4.1 Análise antimicrobiana dos extratos em cultura planctônica

As cepas de micro-organismos utilizadas obtiveram CIM com o extrato aquoso de própolis com a concentração de 55 mg/mL. O extrato aquoso de própolis obteve CMM para as cepas de *F. nucleatum* e *P. micra* com 27,5 mg/mL. A cepa de *P. intermedia* obteve CMM com 55 mg/mL. Já *P. gingivalis* e *P. endodontalis* não obtiveram concentrações microbicidas frente ao extrato aquoso de própolis. Os resultados antimicrobianos obtidos pelo teste de microdiluição em caldo estão expressos na tabela 1.

O extrato glicólico de própolis promoveu CIM para as cepas de *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *P. endodontalis* com a concentração de 100 mg/mL, porém não foi capaz de promover concentrações microbicidas (CMM) para as cepas de micro-organismos testadas.

Tabela 1 - Valores de CIM e CMM promovidos pelos extratos aquoso e glicólico de própolis

Micro-organismo	Extrato aquoso		Extrato glicólico	
	CIM	CMM	CIM	CMM
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	55 mg/mL	27,5mg/mL	100 mg/mL	ausente
<i>Parvimonas micra</i>	55 mg/mL	27,5mg/mL	100 mg/mL	Ausente
<i>Prevotella intermedia</i>	55 mg/mL	55 mg/mL	100 mg/mL	Ausente
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	55 mg/mL	ausente	100 mg/mL	Ausente
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	55 mg/mL	ausente	100 mg/mL	ausente

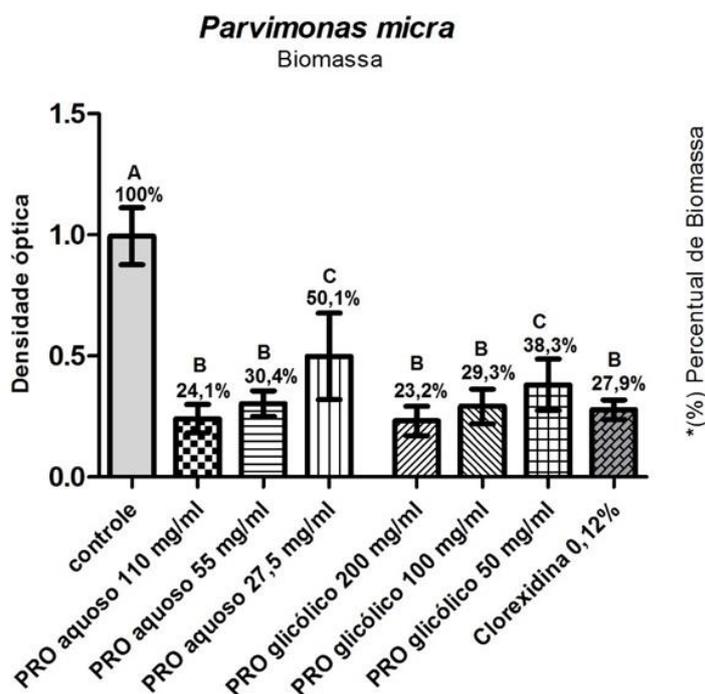
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Análise antimicrobiana dos extratos sobre biofilmes

4.2.1 Análise da biomassa pelo Cristal Violeta

A biomassa pelo teste do Cristal Violeta de *P. micra* foi reduzida para 24,1% com a concentração de 110 mg/mL do extrato aquoso de própolis. Já o extrato glicólico promoveu reduções para 23,2% após as aplicações de 200 mg/mL do extrato. Ambas as reduções promovidas na biomassa são estatisticamente significantes ($p < 0.05\%$) comparadas ao grupo controle de crescimento, como pode ser verificado na figura 4.

Figura 4: Redução da biomassa de *P. micra* após 5 min de contato com os extratos

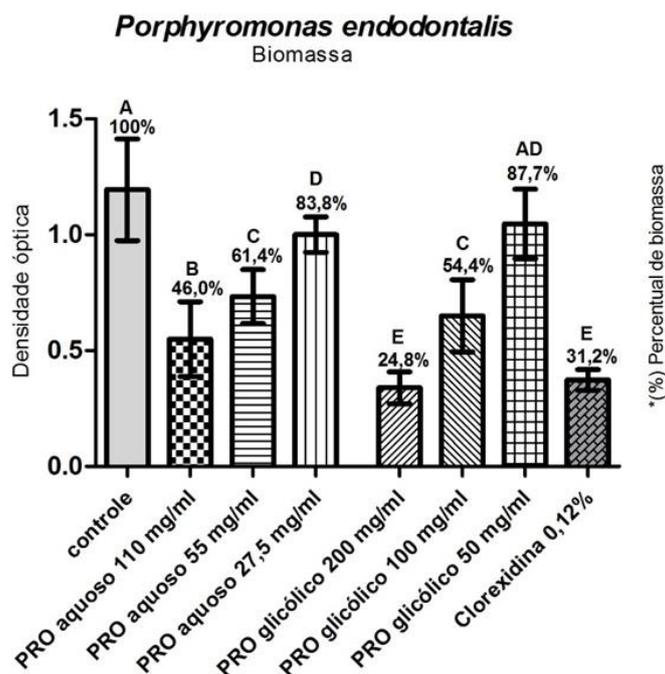


Fonte: Elaborado pelo autor.

A cepa de *P. endodontalis* sofreu reduções para 46% após a aplicação das

concentrações de 110 mg/mL do extrato aquoso de própolis. Já o extrato glicólico promoveu reduções para 24,8% com 200 mg/mL. Os resultados podem ser observados na figura 5.

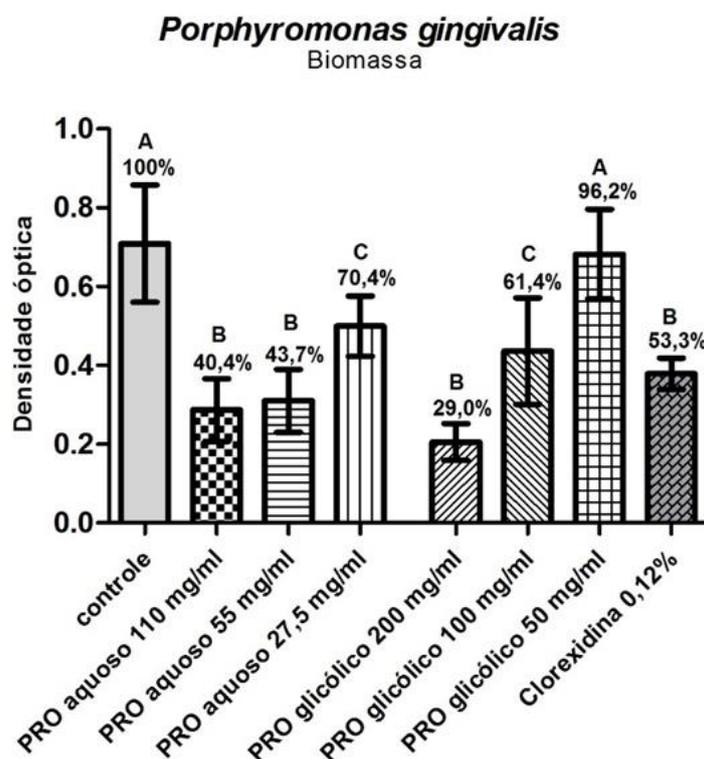
Figura 5 - Redução da biomassa de *P. endodontalis* após 5 min de contato com os extratos



Fonte: Elaborado pelo autor.

P. gingivalis obteve reduções de biomassa após a aplicação do extrato glicólico de própolis, com valores de 29%. O extrato de própolis aquoso promoveu reduções para 40,4% e 43,7%. Os resultados podem ser observados na figura 6.

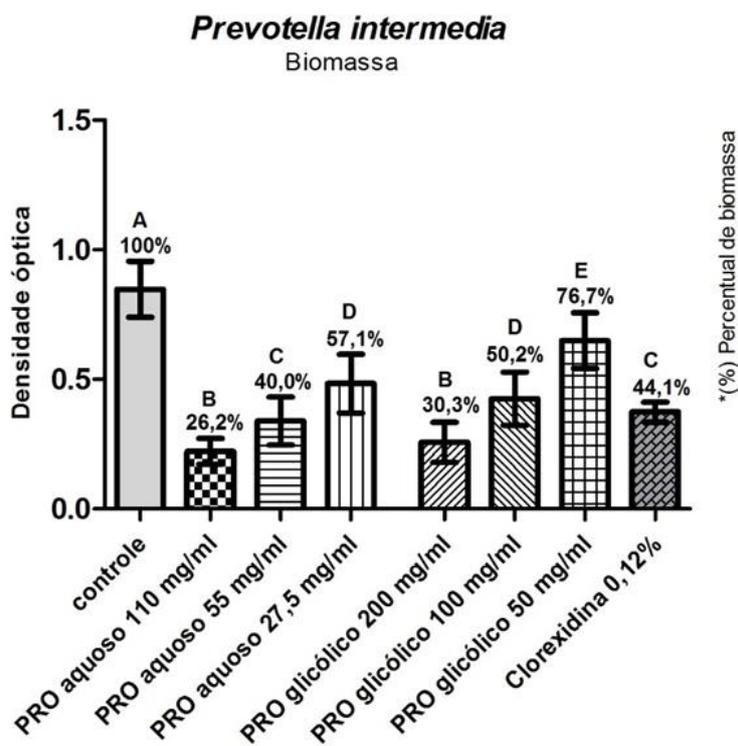
Figura 6 - Redução da biomassa de *P. gingivalis* após 5 min de contato com os extratos



Fonte: Elaborado pelo autor.

A cepa de *P. intermedia* obteve reduções na biomassa para 26,2% e 40% variando as concentrações do extrato aquoso de própolis em 110 mg/mL e 55 mg/mL. O extrato glicólico promoveu reduções para 30,3% com a concentração de 200 mg/mL, todas significantes estatisticamente ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle. Os resultados podem ser observados na figura 7.

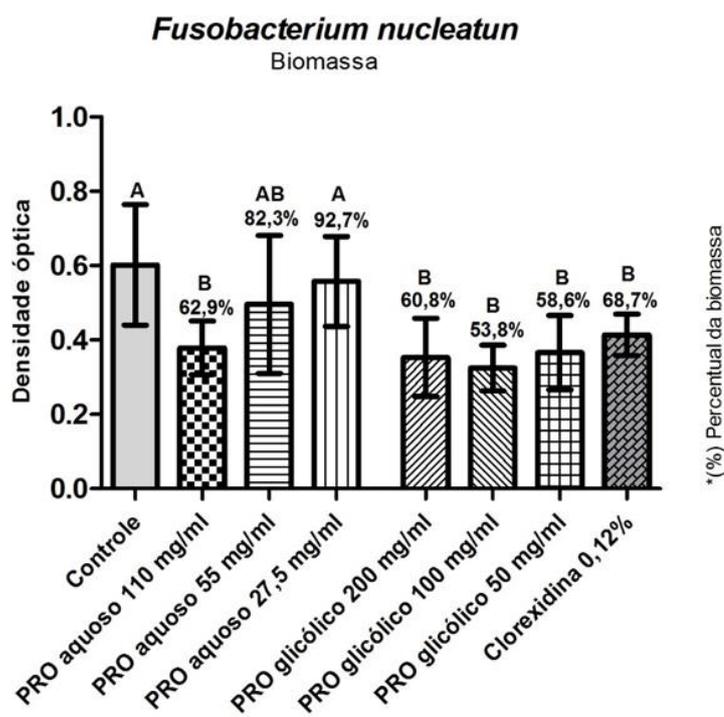
Figura 7 - Redução da biomassa de *P. intermedia* após 5 min de contato com os extratos



Fonte: Elaborado pelo autor.

A cepa de *F. nucleatum* apresentou as reduções para 62,9% após contato por 5 min com o extrato aquoso de própolis a 110 mg/mL. Já o extrato glicólico promoveu reduções para 60,8%, 53,8% e 58,6%. Os resultados podem ser observados a seguir na figura 8.

Figura 8 - Redução da biomassa de *F. nucleatum* após 5 min de contato com os extratos

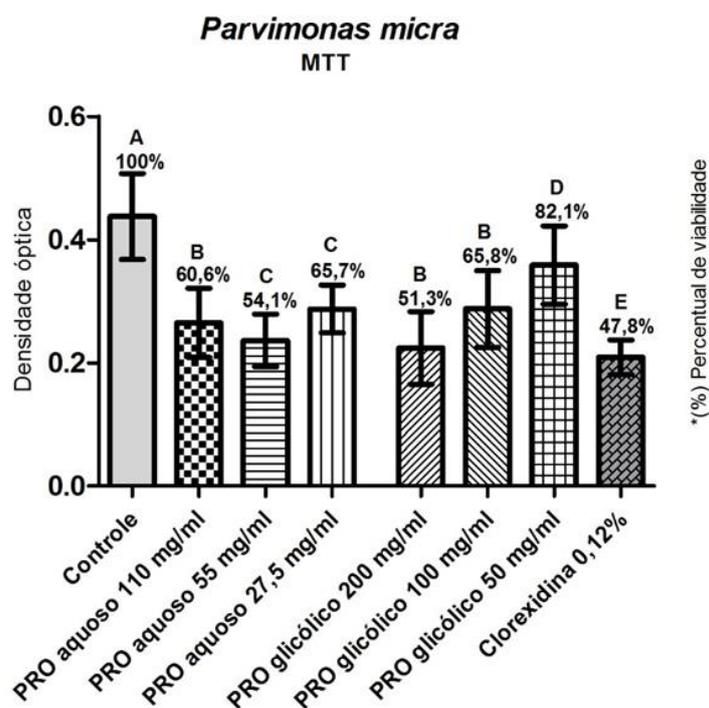


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Análise da viabilidade celular dos micro-organismos pelo MTT

A viabilidade celular pelo teste de MTT de *P. micra* sofreu uma redução para 54,1% quando em contato com o extrato de própolis aquoso a 55 mg/mL e para 51,3% com o extrato glicólico de própolis a 200 mg/mL, significantes estatisticamente quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05\%$), como pode ser observado na figura 9.

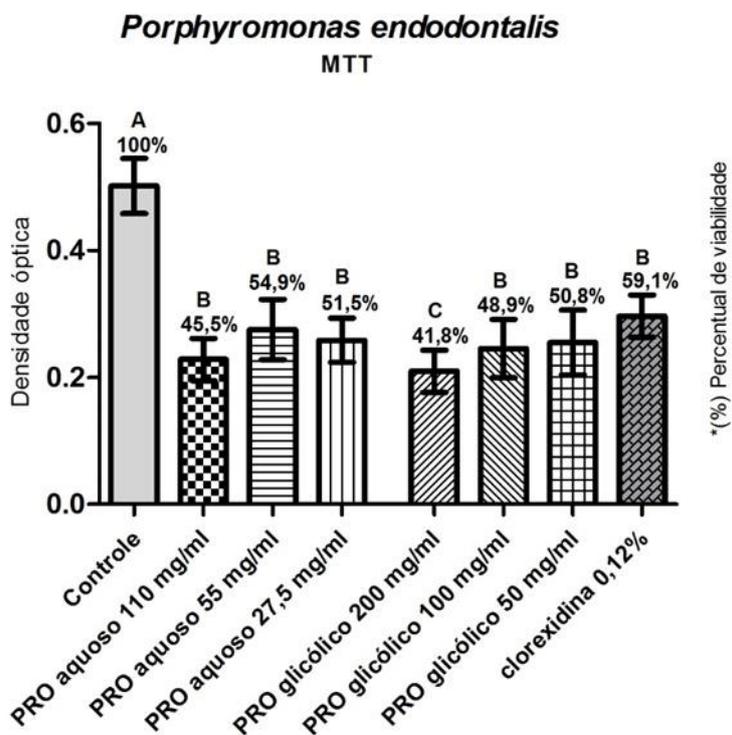
Figura 9 - Redução da viabilidade celular de *P. micra* após 5 min de contato com os extratos



Fonte: Elaborado pelo autor.

A viabilidade de *P. endodontalis* sofreu redução para 45,5%, 54,9% e 51,5% quando em contato com o extrato aquoso a 110 mg/mL 55 mg/mL e 27,5 mg/mL e redução para 41,8%, 48,9% e 50,8% diante das concentrações de 200 mg/mL, 100 mg/mL e 50 mg/mL de própolis glicólico, respectivamente. Todos as reduções foram estatisticamente significantes em relação ao grupo controle ($p < 0,05\%$), como pode ser observado na figura 10.

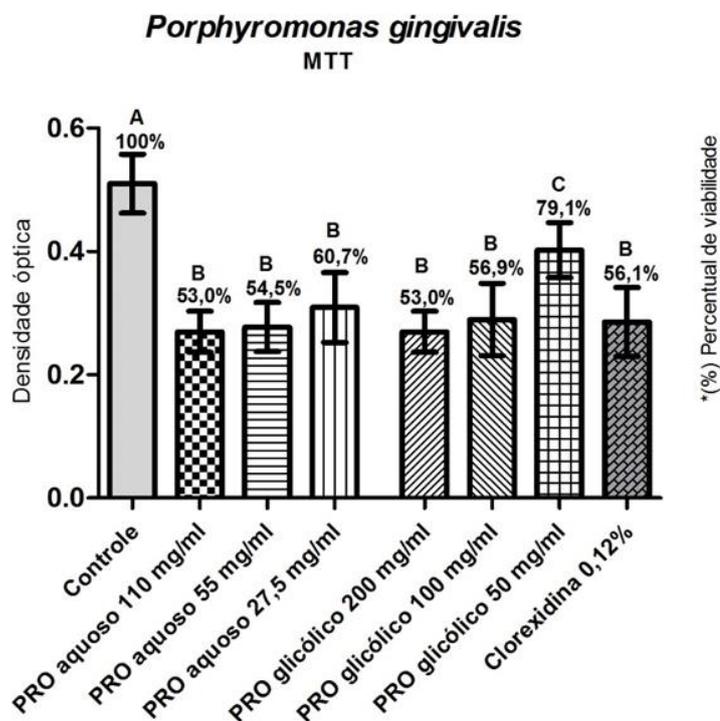
Figura 10 - Redução da viabilidade celular de *P. endodontalis* após 5 min de contato com os extratos



Fonte: Elaborado pelo autor.

A viabilidade de *P. gingivalis* sofreu redução para 53% a 54,5% após contato com o extrato aquoso a 110 mg/mL e 55 mg/mL e redução para 53% diante do extrato glicólico na concentração de 200 mg/mL, Todas as reduções foram estatisticamente significantes em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), como pode ser observado na figura 11.

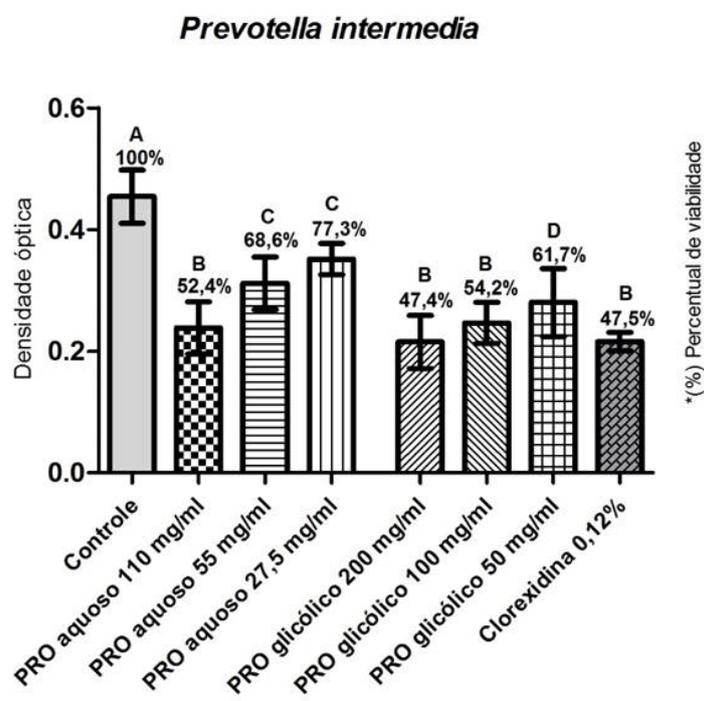
Figura 11 - Redução da viabilidade celular de *P. gingivalis* após 5 min de contato com os extratos



Fonte: Elaborado pelo autor.

A viabilidade da *P. intermedia* foi reduzida para 52,4% após contato com o extrato aquoso de própolis a 110 mg/mL e para 47,4% após aplicação de própolis glicólico a uma concentração de 200 mg/mL, estatisticamente significantes em relação ao grupo controle ($p < 0.05\%$), conforme mostra a figura 12.

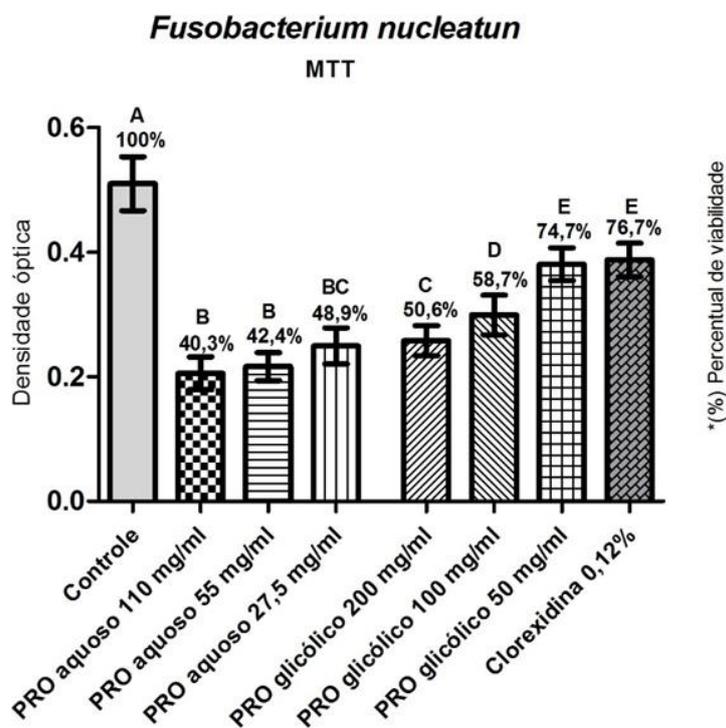
Figura 12 - Redução da viabilidade de *P. intermedia* após contato de 5 min com os extratos



Fonte: Elaborado pelo autor.

A viabilidade do *F. nucleatum* sofreu redução para 40,3%, 42,4% e 48,9% após contato com o extrato de própolis aquoso por 5 min. Já o extrato glicólico promoveu redução para 50,6%, 58,7% e 74,7%, estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle ($p < 0.05$), conforme mostrado na figura 13.

Figura 13 - Redução da viabilidade de *F. nucleatum* após contato com os extratos por 5 min

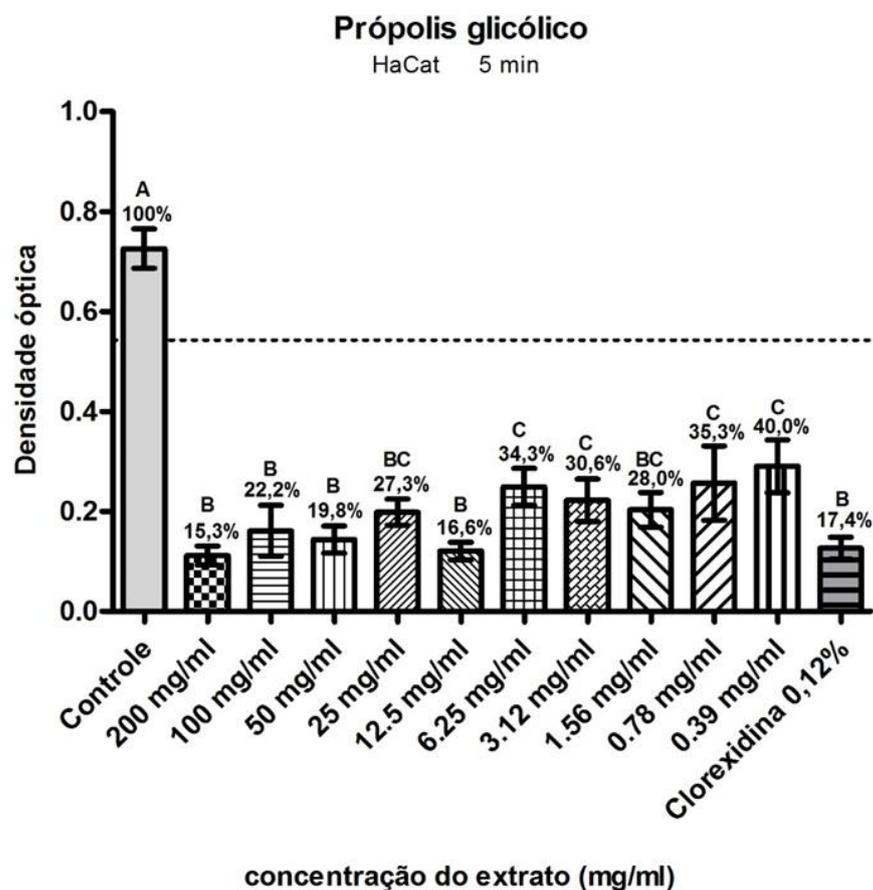


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Análise da citotoxicidade dos extratos sobre os queratinócitos humanos

O extrato de própolis glicólico se mostrou citotóxico após aplicação de 5 min sobre a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT), obtendo viabilidade celular variando de 15,3 a 40%, mostrando-se mais satisfatório que a Clorexidina em algumas concentrações, conforme mostra a figura 14.

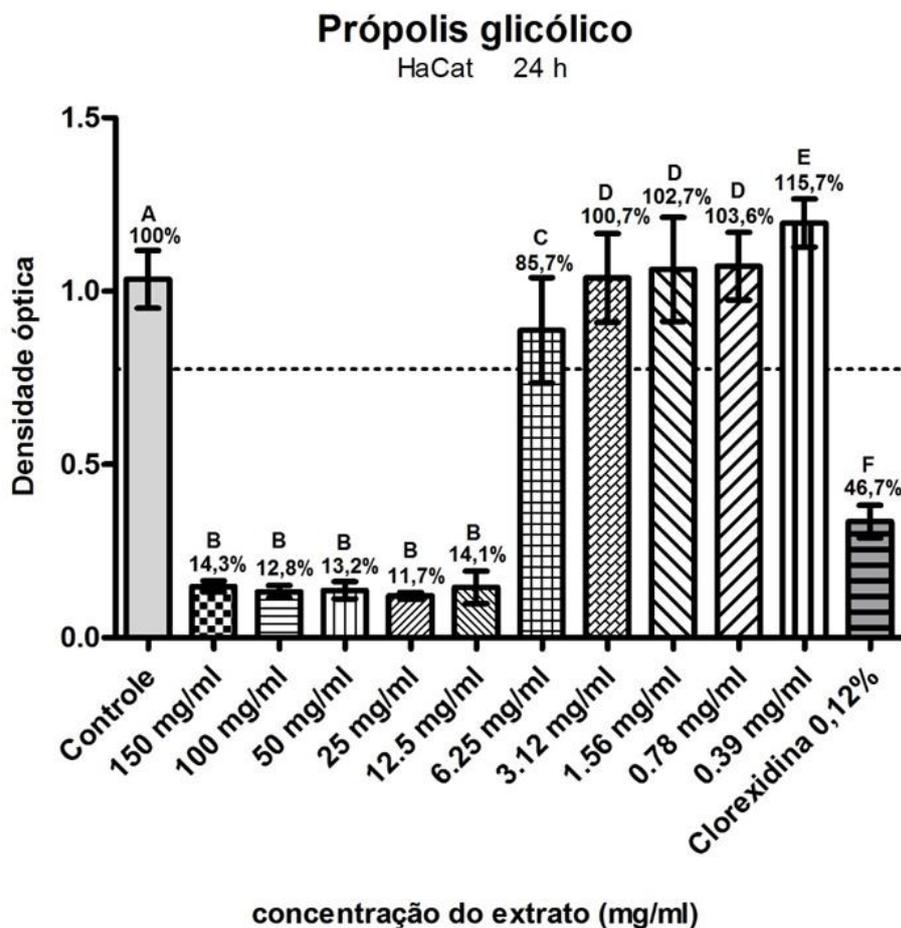
Figura 14 - Viabilidade celular após aplicação do extrato glicólico de própolis por 5 min



Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato glicólico de própolis se mostrou citotóxico em contato por 24 h sobre a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) até a concentração 12,5 mg/mL, no entanto, as demais concentrações (6,25 a 0,39 mg/mL) não foram citotóxicas, conforme mostra a figura 15.

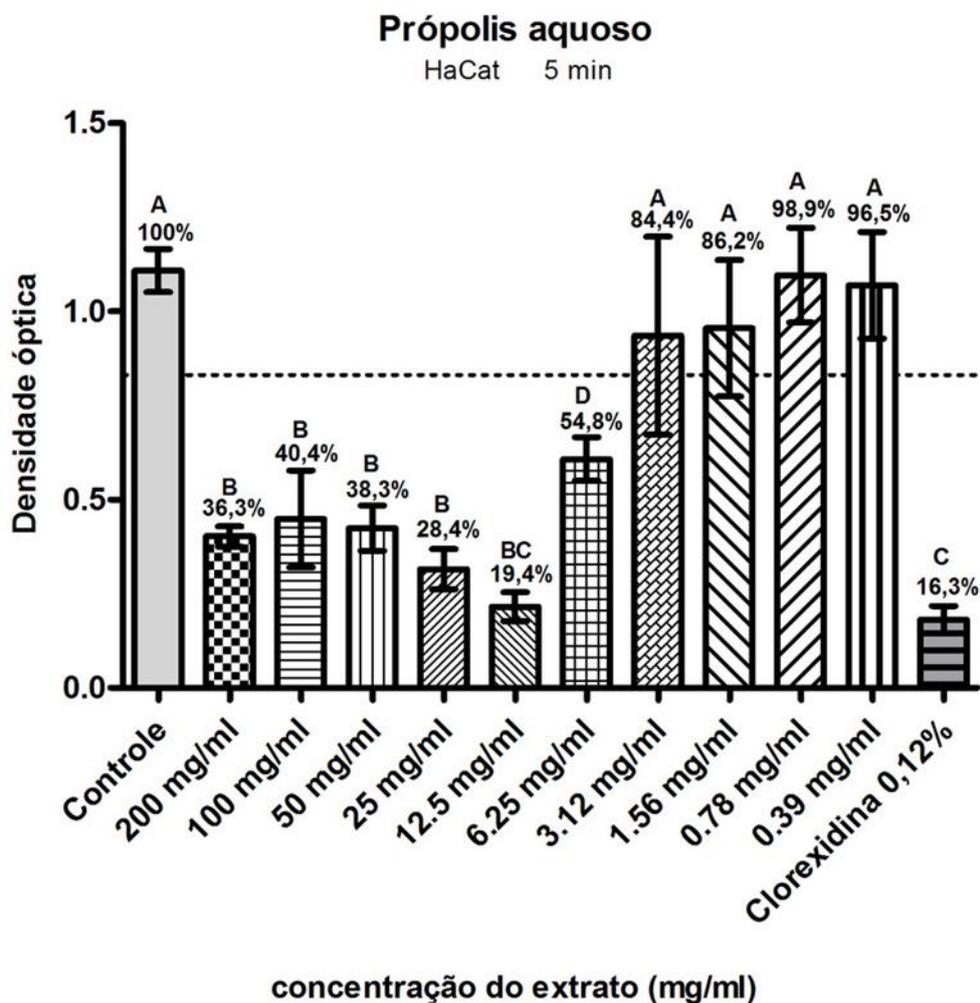
Figura 15 - Viabilidade celular após aplicação do extrato glicólico de própolis por 24h



Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato de própolis aquoso se mostrou citotóxico até a concentração 6,25 mg/mL após aplicação de 5 min sobre a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT), obtendo viabilidade celular variando de 36,3 a 54,8%, conforme mostra a figura 16. As demais concentrações (3,12 a 0,39 mg/mL) não foram citotóxicas.

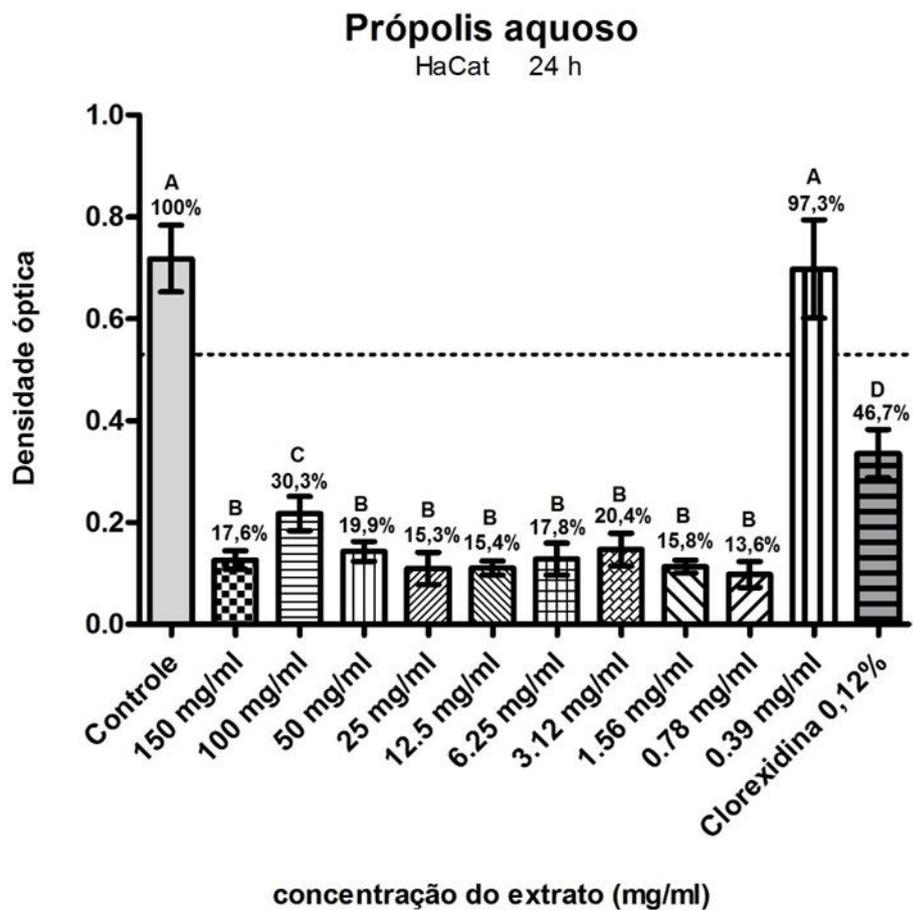
Figura 16 - Viabilidade celular após aplicação do extrato aquoso de própolis por 5 min



Fonte: Elaborado pelo autor.

O extrato aquoso de própolis se mostrou citotóxico após aplicação de 24 h sobre a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT), obtendo viabilidade celular variando de 17,6 a 97,3%, conforme mostra a figura 17.

Figura 17 - Viabilidade celular após aplicação do extrato aquoso de própolis por 24 h



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de Cristal Violeta e MTT mostraram redução significativa da biomassa e da viabilidade celular dos micro-organismos anaeróbios estudados, demonstrando a ação antimicrobiana dos extratos aquoso e glicólico de própolis. Os testes com o Cristal Violeta encontraram maior redução da biomassa de *P. intermedia* e *P. micra*, enquanto a *P. endodontalis*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* se mostraram um pouco mais resistentes à ação dos extratos, embora também tenham apresentado significativa redução em comparação ao grupo controle. Já nos testes de MTT que verificaram a viabilidade celular por meio de sua atividade metabólica, dos micro-organismos submetidos à ação dos extratos de própolis, o *F. nucleatum* foi um pouco mais resistente, a *P. intermedia* sofreu maior ação antimicrobiana pelo extrato glicólico; já a *P. gingivalis*, a *P. endodontalis* e a *P. micra* reagiram mais uniformemente frente aos dois extratos.

Eick et al. (2014) demonstraram a redução do biofilme gengival de *P. gingivalis* utilizando um composto de mel e própolis (mel de Manuka). O composto inibiu a formação de biofilme de espécies únicas de *P. gingivalis*. Seis horas após o início dos experimentos, nenhuma diferença foi visível. Após 24 h, o composto reduziu a concentração do número de bactérias viáveis. Quando a concentração do composto maior de 10% foi utilizada, o número de bactérias no biofilme (média de todas as cepas) foi significativamente menor (cada $p < 0,05$) do que nos controles sem adição do composto mel e própolis, comprovando a ação antimicrobiana da própolis contra *P. gingivalis*, assim como encontrado no presente trabalho.

Sawaya et al. (2011) testaram o extrato etanólico de própolis do sul do Brasil contra patógenos endodônticos (*Prevotella nigrescens*, *F. nucleatum*, *Actinomyces israelenses*, *Clostridium perfringens*) e contra *E. faecalis* por macro diluição. Como resultado, *P. nigrescens* foi o mais suscetível, *F. nucleatum* e *C. perfringens* tiveram resultados intermediários e *A. israeli* e *E. faecalis* foram os mais resistentes – resultados esses que se assemelham aos encontrados neste trabalho, em que se observou redução intermediária de biomassa e atividade metabólica do patógeno *F. nucleatum* quando submetido ao contato com os extratos glicólico e aquoso de própolis.

Vanni et al. (2015) estudaram as atividades antibacterianas do creme dental e do enxaguatório bucal à base de própolis contra biofilme composto por 6 espécies de bactérias supragengivais cultivadas anaerobicamente e observaram redução significativa nas UFC de 80 a 88%, concluindo que dentifrícios de própolis são efetivos, apresentando inibição do crescimento bacteriano deste tipo de biofilme. Apesar de utilizar metodologia distinta do presente trabalho, os resultados da ação antimicrobiana da própolis foram semelhantes à redução dos biofilmes.

Outro trabalho que utilizou diferente metodologia, porém encontrou resultado semelhante foi o de Shabbir et al. (2016) que avaliaram os efeitos antimicrobianos da própolis do Paquistão em 35 isolados clínicos de patógenos periodontais anaeróbios pigmentados, sendo eles *Porphyromonas asaccharolytica*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *Prevotella melaninogenica*, por meio de ensaio de difusão em ágar, e observaram que todas as cepas foram significativamente sensíveis ao extrato etanólico de própolis; resultados estes que indicam que a própolis dessa região possui potente atividade antimicrobiana contra tais patógenos, assim como também foi apontado nos resultados da própolis contra *P. gingivalis* e *P. intermedia* no presente trabalho.

Nakajima et al. (2016) num experimento em camundongos, mostrou, através de análise histológica, que a própolis administrada suprimiu a esteatose hepática induzida por *P. gingivalis*. Além disso, a própolis inibiu a elevação dos níveis séricos de endotoxina induzida pela administração de *P. gingivalis*, sugerindo que a administração de própolis pode ser eficaz na supressão de alterações metabólicas induzidas por bactérias periodontopáticas que aumentam o risco de várias doenças sistêmicas.

Considerando-se a crescente resistência antibiótica em bactérias anaeróbias, essa atividade antimicrobiana efetiva da própolis traz grande expectativa no tratamento de doenças da cavidade oral, confirmando seu potencial terapêutico e incentivando seu uso efetivo em produtos odontológicos como dentifrícios no combate às cáries, irrigantes dos canais radiculares e enxaguatórios bucais para tratamento de doenças periodontais.

Quanto à citotoxicidade dos extratos de própolis sobre os queratinócitos humanos, foram realizados testes com os dois extratos – aquoso e glicólico – em contato com as células por tempos diferentes: 5 min e 24 h. Observou-se que o

extrato glicólico, quando em contato por 5 min mostrou-se citotóxico, porém, quando comparado à ação da clorexidina, apresentou-se mais satisfatório em muitas concentrações. Esse mesmo extrato glicólico, quando mantido em contato com as células por 24 h, apresentou-se citotóxico apenas a partir de uma determinada concentração, o que sugere sua eficácia, desde que dentro de concentrações seguras. Já o extrato aquoso mostrou-se mais citotóxico, especialmente no tempo de contato de 24 h, apresentando valores que sugerem mais estudos em relação às concentrações ideais de aplicabilidade de sua utilização em produtos de uso odontológico.

Sonmez et al. (2005) , estudando o efeito da própolis sobre patógenos orais e fibroblastos gengivais humanos, observaram que as diluições efetivas de seis amostras de própolis contra micro-organismos periodontopatogênicos foram citotóxicas, porém ainda assim seguras para fibroblastos gengivais humanos, afirmando que a própolis pode ter um papel promissor num futuro medicamento, se soluções apropriadas puderem ser preparadas, desde que sejam fortemente antibacterianas e não citotóxicas.

Num estudo que avaliou a genotoxicidade e a mutagenicidade induzida por dois extratos de própolis em cultura de células mamárias, Roberto et al. (2016) não observaram efeitos genotóxicos e mutagênicos pelos extratos. Após avaliarem a exposição das células a cada extrato com um mutagênico reconhecido, simultaneamente, os resultados mostraram uma redução significativa no dano ao DNA. O experimento realizado com um período de pré-incubação foi mais eficaz do que sem teste de incubação, mostrando que os extratos testados foram capazes de inativar o mutagênico antes que ele pudesse reagir com o DNA. Esse estudo sugeriu que o uso de extratos de própolis pode ser seguro em células de tecido humano, assim como mostrado neste trabalho, em que, frente aos queratinócitos, a própolis se assemelhou muito à clorexidina, que também é citotóxica e sabidamente promove ação antimicrobiana.

Kim et al. (2016), usaram a própolis com objetivo de mostrar seu efeito protetor contra a apoptose induzida por UVA de células HaCaT de queratinócitos humanos. A própolis mostrou o efeito protetor contra perda de potencial de membrana mitocondrial induzida pela irradiação UVA em células HaCaT. Para investigar o papel de ROS (espécies reativas de oxigênio) na apoptose induzida por

UVA e proteção por própolis, a geração de ROS foi determinada em células. Os resultados mostraram que a geração de ROS foi marcadamente reduzida em células pré-tratadas com própolis. Conseqüentemente, a própolis protegeu as células HaCaT de queratinócitos humanos contra a apoptose induzida por UVA, o que pode estar relacionado com a redução da geração de ROS pela irradiação UVA, mostrando que a própolis diminui o estresse oxidativo das células, prevenindo assim, danos teciduais importantes, contrapondo assim o suposto risco do extrato de própolis em células HaCaT sugerido pelos resultados de citotoxicidade do presente trabalho.

Assim como a própolis verde, a própolis vermelha é popularmente consumida no Brasil, pois melhora a saúde, e é considerada um nutracêutico, ou seja, um produto que contém ingrediente biologicamente ativo, isolado ou purificado de alimentos ou plantas medicinais e utilizado para suplementar a dieta. Com o objetivo de observar o efeito de 8 amostras de própolis vermelha do Brasil e Cuba, Lopez et al. (2015) testaram sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, juntamente com um estudo de sua atividade citotóxica contra linhagens celulares não tumorais, a fim de avaliar em quais concentrações ela poderia ser usada com segurança. Apesar de todas as 8 amostras apresentarem atividade antimicrobiana, todas revelaram um efeito citotóxico inerente contra queratinócitos humanos HaCaT, como encontrado neste trabalho.

Isso indica que, em conjunto com a avaliação da atividade antimicrobiana, a avaliação da segurança de produtos naturais bioativos deve sempre ser considerada, para se definir as concentrações abaixo dos valores citotóxicos, as quais permitirão o uso da substância de forma eficaz e segura, como apontado nos resultados do presente trabalho, que contribui para a literatura científica no que se refere a terapias odontológicas, trazendo resultados promissores para a aplicação clínica dos extratos comerciais aquoso e glicólico de própolis em produtos de uso odontológico no combate a cáries, infecções endodônticas e periodontais.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, é possível concluir que os extratos aquoso e glicólico de própolis verde apresentam ação antimicrobiana contra as suspensões planctônicas e os biofilmes monotípicos dos patógenos anaeróbios orais *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia*, comprovada através dos testes de biomassa (CV) e atividade metabólica (MTT), que indicaram redução média dos biofilmes dos micro-organismos para 30% (biomassa) e 45% (viabilidade celular), após 5 min de contato.

Quanto à citotoxicidade dos extratos, pode-se afirmar que foram citotóxicos após aplicação de 5 min sobre a linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT), mostrando-se porém semelhantes ou melhores que a Clorexidina. Quando em contato por 24 h sobre a linhagem celular humana apresentaram citotoxicidade acima da concentração de 6,25 mg/mL, reduzindo bastante a viabilidade celular, embora tenham tido ação semelhante à Clorexidina, apresentando-se como um método alternativo de tratamento. Novos testes podem ser realizados para se definir a concentração ideal para sua aplicabilidade nas terapias odontológicas.

Com isto conclui-se que os extratos comerciais aquoso e glicólico de própolis verde apresentam ação antimicrobiana contra os micro-organismos estudados no presente trabalho e podem ser utilizados nos tratamentos contra os referidos patógenos, já que no que se refere à citotoxicidade, se comportaram de forma semelhante à Clorexidina, cujo uso é conhecidamente seguro e eficaz.

REFERÊNCIAS*

Afrouzan H, Tahghighi A, Zakeri S, Es-haghi A. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis. *Iran Biomed J.* 2018 Jan 1;22(1):50-65. Epub 2017 May 31. PubMed PMID: 28558440; PubMed Central PMCID: PMC5712385.

Akca AE, Akca G, Topçu FT, Macit E, Pıkdöken L, Özgen IŞ. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *Biomed Res Int.* 2016;2016:3627463. doi: 10.1155/2016/3627463. Epub 2016 Feb 2. PubMed PMID: 26949701; PubMed Central PMCID: PMC4754468.

Chinsembu KC. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Trop.* 2016 Feb;154:6-18. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.10.019. Epub 2015 Oct 29. Review. PubMed PMID: 26522671.

de Camargo Smolarek P, Esmerino LA, Chibinski AC, Bortoluzzi MC, Dos Santos EB, Kozłowski VA Jr. In vitro antimicrobial evaluation of toothpastes with natural compounds. *Eur J Dent.* 2015 Oct-Dec;9(4):580-6. doi: 10.4103/1305-7456.172632. PubMed PMID: 26929699; PubMed Central PMCID: PMC4745242.

De Luca MP, Freires IA, Gala-García A, Santos VR, Vale MP, Alencar SM, et al. The anti-caries activity and toxicity of an experimental propolis-containing varnish. *Braz Oral Res.* 2017 Jun 5;31:e45. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0045. PubMed PMID: 28591241.

Diaz Carrasco JM, Redondo LM, Redondo EA, Dominguez JE, Chacana AP, Fernandez, Miyakawa ME. Use of Plant Extracts as an Effective Manner to Control *Clostridium perfringens* Induced Necrotic Enteritis in Poultry. *Biomed Res Int.* 2016;2016:3278359. Epub 2016 Sep 25. Review. PubMed PMID: 27747227; PubMed Central PMCID: PMC5055920.

Eick S, Schäfer G, Kwieceński J, Atrott J, Henle T, Pfister W. Honey – a potential agent against *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2014 Mar 25;14:24. doi: 10.1186/1472-6831-14-24. PubMed PMID: 24666777; PubMed Central PMCID: PMC3987683.

Franca JR, De Luca MP, Ribeiro TG, Castilho RO, Moreira AN, Santos VR, et al. Propolis--based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complement Altern Med.* 2014 Dec 12;14:478. doi: 10.1186/1472-6882-14-478. PubMed PMID: 25495921; PubMed Central PMCID: PMC4295328.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Freires IA, Queiroz VCPP, Furletti VF, Ikegaki M, de Alencar SM, Duarte MCT, et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J Mycol Med*. 2016 Jun;26(2):122-132. doi:10.1016/j.mycmed.2016.01.003. Epub 2016 Feb 23. PubMed PMID: 26916845.

Ghuman S, Ncube B, Finnie JF, McGaw LJ, Coopoosamy RM, Van Staden J. Antimicrobial Activity, Phenolic Content, and Cytotoxicity of Medicinal Plant Extracts Used for Treating Dermatological Diseases and Wound Healing in KwaZulu-Natal, South Africa. *Front Pharmacol*. 2016 Sep 30;7:320. eCollection 2016. PubMed PMID: 27746731; PubMed Central PMCID: PMC5043017.

Kim HB, Yoo BS. Propolis Inhibits UVA-Induced Apoptosis of Human Keratinocyte HaCaT Cells by Scavenging ROS. *Toxicol Res*. 2016 Oct;32(4):345-351. Epub 2016 Oct 30. PubMed PMID: 27818737; PubMed Central PMCID: PMC5080852.

Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunca YM, Baysallar M, Uskudar Guclu A, Akca E, Ozkok Tuylu A, Sorkun K, Tanyuksel M, Salih B. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*. 2007 Jun-Aug;13(3-4):140-5. Epub 2007 Mar 7. PubMed PMID: 17475517.

Lima Cavendish R, de Souza Santos J, Belo Neto R, Oliveira Paixão A, Valéria Oliveira J, Divino de Araujo E, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2015 Sep 15;173:127-33. doi: 10.1016/j.jep.2015.07.022. Epub 2015 Jul 17. PubMed PMID: 26192808.

Lopez BG, de Lourenço CC, Alves DA, Machado D, Lancellotti M, Sawaya AC. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. *J Appl Microbiol*. 2015 Sep;119(3):677-87. doi: 10.1111/jam.12874. Epub 2015 Aug 2. PubMed PMID: 26086953.

Mouhoubi-Tafinine Z, Ouchemoukh S, Tameendjari A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products* 2016; 88:85-90. doi: <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.033>.

Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Matsuda Y, Sato K, Takahashi N, et al. Brazilian propolis mitigates impaired glucose and lipid metabolism in experimental periodontitis in mice. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Aug 30;16(1):329. doi: 10.1186/s12906-016-1305-8. PubMed PMID: 27576340; PubMed Central PMCID: PMC5006533.

Niedzielska I, Puszczewicz Z, Mertas A, Niedzielski D, Rózanowski B, Baron S, et al. The Influence of Ethanol Extract of Brazilian Green Propolis Gel on Hygiene and Oral Microbiota in Patients after Mandible Fractures. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9190814. doi: 10.1155/2016/9190814. Epub 2016 Aug 10. PubMed PMID: 27595110; PubMed Central PMCID: PMC4995337.

Roberto MM, Matsumoto ST, Jamal CM, Malaspina O, Marin-Morales MA. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. *Toxicol In Vitro*. 2016 Jun;33:9-15. doi: 10.1016/j.tiv.2016.02.005. Epub 2016 Feb 16. PubMed PMID: 26891814.

Rodrigues CR, Plentz LC, Marcucci MC, Dihl RR, Lehmann M. In vivo evaluation of mutagenic and recombinagenic activities of Brazilian propolis. *Food Chem Toxicol*. 2016 Oct;96:117-21. doi: 10.1016/j.fct.2016.07.037. Epub 2016 Jul 30. PubMed PMID: 27484244.

Santiago KB, Conti BJ, Cardoso EO, Golim MA, Sforcin JM. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. *Pathog Dis*. 2016 Nov;74(8). pii: ftw081. Epub 2016 Aug 26. PubMed PMID: 27566297.

Sawaya AC, Barbosa da Silva Cunha I, Marcucci MC. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem Cent J*. 2011 Jun 1;5(1):27. doi: 10.1186/1752-153X-5-27. PubMed PMID: 21631940; PubMed Central PMCID: PMC3123264.

Shabbir A, Rashid M, Tipu HN. Propolis, A Hope for the Future in Treating Resistant Periodontal Pathogens. *Cureus*. 2016 Jul 12;8(7):e682. doi: 10.7759/cureus.682. PubMed PMID: 27563508; PubMed Central PMCID: PMC4985230.

Saxena D, Saha SG, Saha MK, Dubey S, Khatri M. An in vitro evaluation of antimicrobial activity of five herbal extracts and comparison of their activity with 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. *Indian J Dent Res*. 2015 Sep-Oct;26(5):524-7. doi: 10.4103/0970-9290.172080. PubMed PMID: 26672425.

Sonmez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yücel B, Yilmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *J Ethnopharmacol*. 2005 Dec 1;102(3):371-6. Epub 2005 Aug 3. PubMed PMID: 16084044.

Tazawa S, Arai Y, Hotta S, Mitsui T, Nozaki H, Ichihara K. Discovery of a Novel Diterpene in Brown Propolis from the State of Parana, Brazil. *Nat Prod Commun*. 2016 Feb;11(2):201-5. PubMed PMID: 27032202.

Vanni R, Waldner-Tomic NM, Belibasakis GN, Attin T, Schmidlin PR, Thurnheer T. Antibacterial Efficacy of a Propolis Toothpaste and Mouthrinse Against a Supragingival Multispecies Biofilm. *Oral Health Prev Dent*. 2015;13(6):531-5. doi: 10.3290/j.ohpd.a34372. PubMed PMID: 26106649.

Yoshimasu Y, Ikeda T, Sakai N, Yagi A, Hirayama S, Morinaga Y, et al. Rapid Bactericidal Action of Propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*. 2018 Jul;97(8):928-936. doi: 10.1177/0022034518758034. Epub 2018 Mar 1. PubMed PMID: 29494308.

Zeighampour F, Alihosseini F, Morshed M, Rahimi A A. Comparison of prolonged antibacterial activity and release profile of propolis-incorporated PVA nanofibrous mat, microfibrinous mat, and film. *Journal of Applied Polymer Science* 2018;135(6):45794. doi: 10.1002/app.45794

ANEXO A - Laudo do extrato aquoso de própolis – Apis Flora**PROPOMAX® – EXTRATO DE PRÓPOLIS SEM ÁLCOOL 30 ML**

PROPOMAX® é produzido com extrato de própolis 100%, com antibiótico natural, obtido com tecnologia exclusiva da Apis Flora, que mantém a alta concentração dos bioativos em um produto sem álcool. O processamento deste extrato resulta de uma avançada tecnologia multiplataforma desenvolvida cientificamente pela Apis Flora com os principais centros de pesquisa do país, de forma a purificar o extrato de própolis, retirando as substâncias inertes do produto, tornando-o totalmente solúvel em água e, por isso, cristalino quando dissolvido na água.

- não contém álcool
- não contém glúten
- não contém aromatizantes e adoçantes artificiais

Ingredientes: água purificada e extrato de própolis (extrato seco mínimo: 11% p/v)

Informação Nutricional: Porção de 1ml*(aprox.1 colher de café). Não contém quantidade significativa de valor calórico, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar e sódio.

ANEXO B - Laudo do Extrato Glicólico de Própolis – Mapric

EXTRATO GLICÓLICO DE PRÓPOLIS (HG)

Nome Científico: Propolis Wax

INCI: Propolis Extract

Nº CAS: 85665-41-4

Parte Utilizada: Substância resinosa

Fórmula Molecular: N.A

Peso Molecular: N.A

GENERALIDADES

Produto extraído de uma substância resinosa, produzida pelas abelhas.

A Própolis é constituído principalmente de: resinas; bálsamos (55%); cera (30%); óleos voláteis (10%); pólen (5%), flavonóides (galangina); ésteres de ácido benzóico e cinâmico.

PROPRIEDADES E EMPREGOS TERAPÊUTICOS

O Extrato Glicólico de Própolis tem ação: cicatrizante, antiinflamatória, bactericida, protetora e regeneradora de tecidos, calmante de irritações da pele.

Poderá ser incorporado em cremes, loções cremosas, hidroalcoólicas ou tônicas, em shampoos, géis, loção de limpeza, produtos pós-barba, pós-depilação, para picadas de inseto, máscaras faciais, sabonetes e outros produtos cosméticos. Indicado somente para uso externo em concentração de até 10%.

Atenção: O Extrato Glicólico de Própolis deve ser adicionado no final da preparação cosmética, com o produto em temperatura abaixo de 45° C.

ESTOCAGEM E VALIDADE

Deve ser estocado hermeticamente fechado, ao abrigo da luz solar direta e do calor.

Prazo de validade: 36 meses a partir da data de fabricação.