

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA PRÓPOLIS VERDE, MARROM E VERMELHA NANOENCAPSULADAS PARA POTENCIAL APLICABILIDADE NA ÁREA ODONTOLÓGICA

Wesley Soares Holanda Silva¹; Natanael de Lemos Albuquerque²; Rafael Inácio de Almeida³; Gyulia Machado Lisboa Rabelo⁴; Regianne Umeko Kamiya⁵; Ticiano Gomes do Nascimento⁶.

¹Universidade Federal de Alagoas (FOUFAL-UFAL), Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/5649318430586574>;

²Universidade Federal de Alagoas (FOUFAL-UFAL), Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/6384549967356849>;

³Universidade Federal de Alagoas (FANUT-UFAL), Maceió, Alagoas. <https://lattes.cnpq.br/3092918267542695>;

⁴Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/9092642011380180>;

⁵Universidade Federal de Alagoas (ICBS-UFAL), Maceió, Alagoas. <https://lattes.cnpq.br/2211101374412036>;

⁶Universidade Federal de Alagoas (ICBS-UFAL), Maceió, Alagoas. <http://lattes.cnpq.br/6296388037177344>

DOI: 10.47094/IVCNNESP.2023/RE.85

PALAVRAS-CHAVE: Concentração. Inibição. Terapia.

ÁREA TEMÁTICA: Outros.

INTRODUÇÃO

Extratos de própolis podem apresentar propriedades antitumorais, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e, sobretudo, propriedades antimicrobianas com efeito bacteriolítico sobre a degradação da parede celular microbiana e/ou efeito bacteriostático, por inativação da RNA-polimerase (Franchi et.al, 2012). Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de 1 extrato de própolis verde, marrom ou vermelha sobre 10 cepas de espécies microbianas padrões de importância odontológica, visando a identificação de extratos com potencial aplicabilidade em produtos para terapia e prevenção de doenças bucais como a cárie, lesões endodônticas, mucosites, faringites e amigdalites estreptocócicas.

OBJETIVO

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de amostras de extrato de própolis verde, marrom e vermelha sobre as bactérias Gram-positivas (*Streptococcus gordonii*; *S. salivarius*; *S. mutans*; *Lactobacillus acidophilus*; *Enterococcus faecalis*; *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) e espécies fúngicas (*Candida albicans*) relacionadas com enfermidades bucais, a fim de identificar extratos para aplicabilidade terapêutica e preventiva no tratamento de enfermidades bucais como: cárie dental, infecções endodônticas, mucosites e faringites.

METODOLOGIA

Esse estudo trata-se de uma pesquisa experimental *in vitro* para determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) de extratos de própolis verde, marrom e vermelha capazes de inibir 100% do crescimento microbiano de células planctônicas (livres). Em adição, avaliou-se a atividade antibiofilme dos extratos, por determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) capaz de inibir mais de 90% de células organizadas em biofilmes maduros monoespécie.

1) Determinação da Concentração Microbicida sobre células planctônicas:

Foram selecionadas 10 cepas padrões tipo ATCC como: *S. gordonii* (DL1); *S. salivarius* (ATCC 27875); *S. mutans* (CCT 3440); *L. acidophilus* (ATCC 4356); *E. faecalis* (ATCC 25212); *P. aeruginosa* (ATCC 25619); *C. albicans* (ATCC 36802); *C. albicans* (SC); *S. pyogenes* (ATCC 19615); *S. aureus* (ATCC 27664). As cepas foram reativadas, nos respectivos meios semisseletivos, e colônias isoladas foram utilizadas para a padronização do inóculo inicial, usando o método de turbimetria com a escala Mac Farland 0,5 (CLSI, 2020).

Cerca de 10^6 UFC mL⁻¹ e 10^7 UFC mL⁻¹ de bactérias e de fungos planctônicos, respectivamente, foram inoculadas em 180 µL do meio BHI dispostos em microplacas de poliestireno com 96 poços (diluição 1:10) contendo entre 46, 93, 187, 375, 750, 1500 ou 3000 µg/mL do extrato de própolis verde, marrom ou vermelha. Previamente à inclusão das cepas microbianas, nos micropoços, os extratos foram diluídos serialmente, em duplicata. As microplacas foram incubadas à 37°C por 24 horas, em microaerofilia, e as células viáveis (crescimento positivo) foram evidenciadas com resazurina a 0,1% e incubação por 20 min à 37°C. A CMM foi definida como a menor faixa de concentração do extrato capaz de inibir 100% do crescimento planctônico, em relação ao controle positivo (meio de cultura, microrganismos e veículo controle, sem os extratos (Hakimiha et al. 2014; Lima et al, 2014; Azizi et al, 2018).

2) Determinação da Concentração Inibitória Mínima sobre células em biofilmes monoespécies:

Biofilmes monoespécie cultivados em meio YD (1% de ext. de lev. + 1% de glicose) para *P. aeruginosa* e YPD (2% pep. + 1% de ext. de lev. + 1% de glc.) para as demais cepas, com 48 horas de crescimento, foram submetidos aos tratamentos com os extratos de própolis nas concentrações de 1500, 3000, 7500 e 15000 µg/mL. Com o biofilme pré-formado, o sobrenadante foi substituído por suspensões de extratos nas concentrações anteriormente indicadas, azul de toluidina à 0,01% ou veículo controle. As microplacas foram então reincubadas por 24 h, à 37° C, em microaerofilia. Células do biofilme pré-formado expostas aos extratos e aos controles foram removidas assepticamente e diluídas serialmente (diluição de 10 em salina estéril), plaqueadas nos respectivos meios semisseletivos e quantificadas (UFCmL⁻¹) após 24-48 horas de incubação. Realizou-se a

contagem de células de biofilmes viáveis após os tratamentos, e a CIM sobre biofilmes foi definida como a menor faixa de concentração do extrato capaz de inibir em mais de 90% células do biofilme pré-formado, em relação ao veículo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 1: Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos de própolis verde, marrom e vermelho sobre células planctônicas, pelo método colorimétrico da resazurina.

Espécies de Micro-organismos	Extrato de Própolis Marrom	Extrato de Própolis Verde	Extrato de Própolis Vermelha
<i>Streptococcus mutans</i> CCT3440	1500-3000	375-750	>3000
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 27875	1500-3000	>3000	1500-3000
<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC DL1	1500-3000	>3000	1500-3000
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	1500-3000	>3000	1500-3000
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1500-3000	>3000	1500-3000
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	1500-3000	>3000	>3000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664	1500-3000	>3000	1500-3000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	>3000	>3000	>3000
<i>Candida albicans</i> ATCC 36802	>3000	>3000	>3000
<i>Candida albicans</i> SC 5314	>3000	>3000	>3000

Fonte: Laboratório de Biologia e Microbiologia Celular – ICBS/UFAL (2022)

Os extratos de própolis marrom e vermelho apresentaram na faixa de concentração entre 1500 – 3000 µg/mL atividade inibitória do crescimento microbiano, tornando-se eficientes dentre as cepas testadas, se comparado com o extrato verde que precisa de concentrações acima de 3000 µg/mL pra que possa ter algum efeito. Analisando as cepas microbianas do *P. aeruginosa* e fúngicas, nota-se que a maior concentração (3000) não foi suficiente, havendo necessidade de se ampliar a concentração para avaliação da concentração inibitória mínima no teste de antibiofilme.

Figura 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do azul de toluidina e diferentes extratos de própolis sobre células organizadas em biofilmes monoespécie (48 horas em microaerofilia), após 24 horas de exposição ao antimicrobiano.

Espécies de Micro-organismos	Azul de Toluidina %	Própolis marrom µg/mL	Própolis verde µg/mL	Própolis vermelha µg/mL
<i>Streptococcus mutans</i> CCT3440	> 0.01%	3000	> 3000	> 3000
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 27875	> 0.01%	1500	1500	1500
<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC DL1	> 0.01%	3000	> 3000	> 3000
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	> 0.01%	1500	3000	1500
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	> 0.01%	1500	3000	1500
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	0.01%	1500	1500	1500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664	> 0.01%	1500	3000	> 3000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	> 0.01%	7500	7500	7500
<i>Candida albicans</i> ATCC 36802	> 0.01%	7500	7500	7500
<i>Candida albicans</i> SC 5314	> 0.01%	7500	7500	7500

Fonte: Laboratório de Biologia e Microbiologia Celular - ICBS/UFAL (2022)

Em Nenhum dos biofilmes com alta densidade celular 10^7 a 10^{10} UFC/mL foi evidenciado efeito 100% inibitório dos extratos testados. Porém, na nova concentração 7500 – 15000 µg/mL dos extratos para *P. aeruginosa* e cepas fúngicas, encontrou-se concentração com atividade inibitória para algumas cepas, exceto no uso do controle azul de toluidina na concentração de 0,01%, o qual somente apresentou algum resultado inibitório contra *L. acidophilus*.

De modo geral, os extratos de própolis marrom e vermelho apresentaram maiores atividades antimicrobianas sobre as espécies testadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados *in vitro* ressaltam que o produto pode ter potencial de aplicação clínica como curativo de demora em tratamentos endodônticos associados à limpeza mecânica e desinfecção prévias de canais endodônticos, podendo potencializar o efeito antimicrobiano da formulação proposta, trazendo, além destes, benefícios no tratamento de doenças como a cárie dental, mucosites, lesões endodônticas, faringites e amigdalites estreptocócicas. Por fim, os autores concordam que pela publicação não obterão nenhum ganho, senão a divulgação científica e profissional dos trabalhos.

PRINCIPAIS REFERÊNCIAS

- AZIZI, Arash et al. **Comparison of the antimicrobial efficacy of photodynamic therapy with two mediators Against *Lactobacillus acidophilus in vitro***. Photodyn Ther, 2018;
- FRANCHI, Gilberto et al. **Comparison of effects of the etanolic extracts of brazilian própolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay**. Hidawi Publishing Corporation, 2012;
- Hakimiha, Neda et al. **The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources**. J Appl Oral Sci, 2014.
- LIMA, Bruna et al. **Halistanol sulfate A and rodriguesines A and B are antimicrobial and antibiofilm agentes against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans***. Rev. Bras. De Farmacognosia, 2014.