

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Odontologia Restauradora

LUCAS LADEIRA VIEIRA

**Capacidade antimicrobiana de vernizes experimentais a base de
quitosana/própolis**

RIBEIRÃO PRETO
2023

LUCAS LADEIRA VIEIRA

**Capacidade antimicrobiana de vernizes experimentais a base de
quitosana/própolis**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Cirurgião(ã)-Dentista.

ORIENTADOR: PROF(A). DR(A). REGINA GUENKA PALMA DIBB

RIBEIRÃO PRETO
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida, por todos os dias dessa caminhada que ele me proporcionou vivenciar, com experiências que eu nem imaginava.

Em seguida agradecer a meus pais, os quais sempre estiveram do meu lado, me dando amor e apoiando imensamente em todas as minhas decisões, dando todo o suporte do mundo para que eu alcançasse meus objetivos.

À toda a minha família, que acompanhou toda a minha jornada, sempre torcendo por mim, em especial às minhas irmãs, que estão sempre ao meu lado, torcendo de perto por mim, e me ajudando no que for preciso.

Aos meus amigos que dividiram essa jornada comigo, compartilhando os melhores momentos da minha vida, os quais sou muito grato a Deus por ter conhecido, vocês se tornaram minha família durante esses anos.

À minha orientadora, por todas as oportunidades que me concedeu, por todo o apoio e confiança que sempre teve em mim, me ensinando um pouco da vida seguindo a carreira acadêmica, agradeço pela sua dedicação, paciência e esforços em me ajudar nos diversos momentos da graduação, será sempre para mim um exemplo de professora.

Agradeço também a todos os professores e funcionários desta faculdade, que de alguma forma contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

RESUMO

VIEIRA, L.L. **Capacidade antimicrobiana de vernizes experimentais a base de quitosana/própolis**. 2023. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de vernizes experimentais a base de quitosana/própolis sobre o *S. mutans* e *S. sobrinus*. Foram testadas 7 soluções sendo 6 experimentais e 1 comercial. Inicialmente, foi manipulado um gel de quitosana (QT) a 1,5%. A esse gel, foi adicionado gel de quitosana nanoparticulada (QT-NP) associada ou não à própolis, e própolis nas concentrações de 5% e 10%. Foram testados os seguintes vernizes: V1 - Gel de QT, V2- gel de QT + QT-NP; V3 - gel de QT + QT-NP com própolis verde + 5% própolis verde; V4 - gel de QT + QT-NP com própolis verde + 10% própolis verde; V5 - gel de QT + QT-NP com própolis vermelho + 5% própolis vermelho; V6 - gel de QT + QT-NP com própolis vermelho + 10% própolis vermelho; V7 - Gel de clorexidina. Foi realizada a análise quantitativa/qualitativa de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), baseada no método qualitativo de halo de inibição, testando a atividade antimicrobiana dos vernizes. Pode-se observar que o gel de clorexidina que formou o maior halo de inibição a ambos os *Streptococcus* estudados, e que o efeito dos vernizes experimentais foi mais intenso no *S. mutans* do que o *S. sobrinus*. Conclui-se que ambos extratos de própolis (verde e vermelho) apresentam significativa capacidade antimicrobiana, ressaltando o fato de ser de maneira mais expressiva a ação antimicrobiana do própolis vermelho em relação ao própolis verde. O emprego de própolis em vernizes odontológicos associado a quitosana demonstrou ser viável e produziu um halo de inibição considerável dos microrganismos testados.

Palavras-chave: verniz, própolis, quitosana, cárie, streptococcus.

ABSTRACT

VIEIRA, L.L. **Antimicrobial capacity of experimental chitosan/propolis-based varnishes**. 2023. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

The present study aims to evaluate the antimicrobial action of experimental varnishes based on chitosan/propolis/nanoparticles on microorganisms that cause caries. Initially, a 1.5% chitosan (QT) gel was made. A nanoparticulate chitosan gel (QT-NP) was added to this gel, associated or not with propolis, at concentrations of 5% and 10%. The following varnishes have been tested: V1 - (QT + nanoparticles) + 10% (QT-NP + green propolis); V2 - (QT + nanoparticles) + 10% (QT-NP + red propolis); V3 - (QT + nanoparticles) + 5% (QT-NP + green propolis); V4-(QT + nanoparticles) + 5% (QT-NP + red propolis); V5-(QT + nanoparticles) + 10% QT-NP; V6-(QT + nanoparticles) + 5% QT-NP; V7- Control - Duraphat® and V8 - Chlorhexidine gel. The analysis was based on the qualitative method of inhibition halo, testing the antimicrobial activity of varnishes against oral microorganisms that cause caries disease (.S. mutans and S. sobrinus). It can be seen that the chlorhexidine gel formed the greatest halo of inhibition for both Streptococci studies, and that the effect of the experimental varnishes was more intense on S. mutans than S. sobrinus. It is concluded that both propolis extracts (green and red) have significant antimicrobial capacity, emphasizing the fact that the antimicrobial action of red propolis is more expressive in relation to green propolis. The use of propolis in dental varnishes associated with chitosan proved to be viable and produced a considerable inhibition zone for the microorganisms tested.

keywords: varnishes, propolis, chitosan, caries, streptococcus

Sumário

Introdução	8
Proposição	12
Materiais e métodos	13
Resultados	17
Discussão	19
Conclusão	22
Referências	23

Introdução

A cárie dentária é uma doença multifatorial, a qual necessita de múltiplas intervenções, sendo, dessa forma, proposto pela OMS programas de prevenção associados a programas educacionais e políticas de saúde pública (1), indo além da realização isolada do tratamento restaurador. É um problema de saúde pública generalizado que atinge todas as faixas etárias, e que apresenta alta prevalência e amplo impacto social. Tal doença é resultado da desmineralização de tecidos dentais duros acelulares, ocasionada através da degradação da estrutura dental, decorrente da liberação de ácidos produzidos por bactérias acidogênicas e acidófilas que se encontram aderidas ao biofilme dental estabelecido (2).

O biofilme dental é uma estrutura formada por comunidades microbianas específicas, coordenadas, complexas, metabolicamente integradas e espacialmente organizadas (3,6). Essas comunidades microbianas apresentam uma alta diversidade em sua composição (5), diferenciando-as entre os diferentes sítios microbiológicos dentro do mesmo hospedeiro, bem como entre outros indivíduos.

Apesar do biofilme ser composto por diversos microrganismos, o *Streptococcus mutans* age como microrganismo principal no desenvolvimento das lesões cáries (7). Isso ocorre devido, principalmente, a alta produção de ácidos e a sua tolerância a baixos pH, tendo em vista a fermentação dos carboidratos consumidos na dieta, cujo processo diminui o pH bucal, intensificando o processo de desmineralização do esmalte e da dentina (5-8).

Em estágios iniciais, o processo de desmineralização da estrutura dental pode ser reversível através da remineralização dessa estrutura, resultando na captura de cálcio, fosfato e fluoreto através do mecanismo de reparo natural do dente (9). A remineralização consiste na difusão de minerais presentes na saliva para os poros da estrutura desmineralizada (9). Esse é o principal objetivo dos tratamentos preventivos, preservar a estrutura sadia, prevenindo a desmineralização da estrutura do esmalte, auxiliando na promoção natural do processo de remineralização (1).

Buscando auxiliar esse processo, tratamentos conservativos, como a aplicação superficial de fluoretos (9), estão sendo preconizados a fim de prevenir o desenvolvimento de lesões de cárie, paralisando as lesões incipientes.

Para que o processo de remineralização possa suceder, o sítio da lesão deve apresentar condições mínimas de suporte e com ausência de biofilme. A estrutura do biofilme protege as bactérias contra os agentes antimicrobianos (1), proporcionando um ambiente propício para a progressão da doença. Sendo assim, visto a adesão dos microrganismos sobre a estrutura dental pela película adquirida, é importante proporcionar um ambiente livre de microrganismos para que o processo remineralizador aconteça. Portanto, é desejável que o tratamento preventivo das lesões cariosas aja não apenas na deposição mineral sobre a estrutura dental, mas também opere na inativação de microrganismos presentes na área afetada.

Os vernizes são materiais amplamente empregados na odontologia para a prevenção de cárie dentária há anos, e pode-se incorporar princípios ativos nessas formulações para promover e prolongar o efeito anti-cárie, como por exemplo fluoreto (com ação remineralizante) e clorexidina (ação antimicrobiana) (10). Eles têm capacidade de formar uma película sob a superfície do dente com intuito de protegê-la e promover uma liberação do princípio ativo, e mais recentemente introduziu o uso de verniz com própolis devido a baixa toxicidade e propriedade antimicrobiana (6).

Alguns produtos naturais contêm princípios bioativos, com potencial antimicrobiano, principalmente para o grupo *S. mutans*, como ocorre com o própolis. O própolis possui excelentes propriedades biológicas, como ação anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, entre outras (6,10). Além disso, certos tipos de própolis apresentam maior potencial antimicrobiano e forte efeito antibacteriano, o que auxilia na prevenção, desenvolvimento e progressão de lesões cariosas (11).

O mecanismo de ação preventivo do própolis está associado com a inibição da glicosiltransferase e regulação negativa/feedback negativo (downregulation) de genes associados à sobrevivência e tolerância ao estresse do *S. mutans*. Além de reduzir o acúmulo de placa dental sobre a estrutura dental (12). Ademais, outras substâncias contidas no própolis (flavonóides, terpenóides, isoflavonas entre outros ácidos fenólicos) podem diminuir a produção e tolerância ácida pelo *S. mutans*.

(6,8,11). Em estudo recente (13), observou clinicamente que verniz de própolis vermelho a 2,5% foi eficiente no controle da formação de colônias de *S. mutans* na cavidade bucal de crianças com idade de 36 a 71 meses.

Há uma grande diversidade de tipos de própolis e suas composições químicas, consequentemente suas interações com outros substratos, podem variar dependendo da região geográfica de origem devido a origens botânicas distintas (14). Sua diferença baseia-se na quantidade de flavonóides e de derivados como do ácido cinâmico, como o éster fenetílico do ácido cafeico e o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepillin C). A própolis verde brasileira contém uma grande quantidade de artepillin C. A artepillin C tem uma ampla variedade de efeitos biológicos, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antivirais e antitumorais (15). O emprego da própolis verde selvagem como solução de bochecho sobre o biofilme dental foi avaliado por Cardoso et al. e que observaram uma ação antimicrobiana contra *S. mutans* (16), contudo, ainda esse tipo de própolis não foi avaliado na forma de verniz odontológico.

Outra substância amplamente encontrada na natureza é a quitina extraída da casca de crustáceos, insetos e outros seres vivos e que através da acetilização parcial obtém-se a quitosana. A quitosana é uma macromolécula formada pela repetição de monômeros de D-glucosamina amplamente utilizada no desenvolvimento de biomateriais com aplicações biomédicas e odontológicas (17). É um composto abundante na natureza, destacando-se por sua biocompatibilidade, propriedades antibacteriana e antifúngica, mucoadesão, não citotoxicidade e biodegradabilidade, possibilitando sua incorporação e conferindo melhora nas propriedades de materiais já disponíveis no mercado e desenvolvimento de novos (18).

Por apresentar excelentes propriedades, a quitosana é um biomaterial de extremo interesse na área de materiais dentários, garantindo ação bactericida e bacteriostática aos materiais devido à sua adesão à parede celular das bactérias, além de não ter relação com resistência antibacteriana (19). A quitosana pode ser empregada na forma de gel ou de nanopartículas carregadas ou não com outros princípios ativos. Recentemente foi estudado o emprego de nanopartículas de quitosana com própolis sobre microrganismos de canal radicular e apresentou propriedades antibacterianas satisfatórias (20). Além disso, o emprego de um verniz de quitosana com própolis também apresentou atividade antimicrobiana com baixa

toxicidade ao organismo (6). Contudo, há ausência de estudo sobre a comparação entre os diferentes tipos de própolis e sua associação com a quitosana, bem como, o efeito das concentrações sobre as propriedades antimicrobianas.

Buscando propostas sustentáveis, novos materiais à base de produtos naturais estão sendo desenvolvidos com o intuito de paralisar a progressão do processo desmineralizador, bem como auxiliar no processo natural da remineralização. Um estudo dentro do presente grupo de pesquisa testou a ação de um verniz à base de própolis, quitosana e outros compostos mineralizantes (estágio de patente) frente a desmineralização da estrutura dental, mostrando-o eficaz na paralisação da evolução das lesões cariosas (21). Sendo assim, se faz necessária a avaliação da ação antimicrobiana dessa classe de materiais frente ao agente responsável pela progressão da desmineralização dos tecidos dentais duros.

Proposição

O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana de vernizes experimentais a base de quitosana/própolis sobre os microrganismos *S. mutans* e *S. sobrinus*. Foram testados os dois principais e mais importantes tipos de própolis produzidos no Brasil, o vermelho e o verde.

Materiais e métodos

Este estudo foi fatorial com 1 fator em 8 níveis, sendo 6 experimentais (6 vernizes a base de quitosana carregada com minerais, na qual foram incorporadas diferentes concentrações de dois distintos extratos de própolis (5% e 10% dos extratos de própolis verde e vermelho) e com adição de nanopartículas de quitosana carregada com o extrato em estudo e 1 comercial (gel de clorexidina). Para a análise quantitativa/qualitativa empregou-se os testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

Inicialmente, foram preparados os vernizes experimentais carregados com própolis, quitosana e minerais, seguindo um protocolo definido em estudo prévio (processo BR 10 2021.008804.4).

Formulação do verniz

Gel à base de quitosana - A quitosana foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético a 1%vol/vol em uma concentração de 1,5% peso/volume e misturada por 24 horas em agitador magnético. Em seguida foram adicionados os minerais (Ca e PO₄) na solução, a qual foi agitada por mais 2 horas, para então ser adicionada o extrato de própolis (verde ou vermelho) na concentração de 5% ou 10% da solução comercial disponível (apis flora – Tabela 1). e agitou para obtenção da formulação final (processo BR 10 2021.008804.4).

Além da base da quitosana foram adicionadas nanopartículas de quitosana carregadas com os extratos de própolis a serem testados (Tabela 1). A solução foi preparada usando o protocolo empregado por Shi et al. (2006) (23). Para isso foi preparada a quitosana nanoparticulada (QT NP) usando o método de gelificação iônica. Então, na solução de própolis foi adicionado 1 ml de extrato de própolis para 14 ml de gel de quitosana sob agitação (1000 rpm), para a formação das nanopartículas enriquecidas com própolis. As nanopartículas foram adicionadas no gel base de quitosana na proporção de 10%p/v.

Tabela 1. Materiais empregados no presente estudo

Material	Composição	Concentração
Quitosana Sigma-aldrich	Quitosana em pó de baixo peso molecular	-----
Extrato de Própolis vermelho (Apis Flora)	Própolis, álcool neutro e água.	Extrato seco mínimo: 11% p/v
Extrato de Própolis verde (Apis Flora)	Própolis verde, álcool neutro e água.	Extrato seco mínimo: 11% p/v
Clorexidina Clorexoral Gel 2% - Biodinâmica	Digluconato de Clorexidina (2%), Metilparabeno, Hidroxietilcelulose e Água Deionizada.	Digluconato de Clorexidina (2%),

Assim, ao final obteve-se 6 vernizes experimentais:

V1 - Verniz experimental de quitosana sem própolis e sem gel de nano quitosana

V2 - Verniz experimental de quitosana sem própolis e com 10% de gel de nano quitosana (sem própolis)

V3- Verniz experimental de quitosana com 5% de própolis vermelho e 10% de gel de nano quitosana com própolis vermelho.

V4 - Verniz experimental de quitosana com 10% de própolis vermelho e 10% de gel de nano quitosana com própolis vermelho.

V5 - Verniz experimental de quitosana com 5% de própolis verde e 10% de gel de nano quitosana com própolis verde.

V6 - Verniz experimental de quitosana com 10% de própolis verde e 10% de gel de nano quitosana com própolis verde.

Adicionalmente, empregou-se dois produtos comerciais amplamente utilizados no dia-a-dia clínico dos cirurgiões-dentistas e sabidamente efetivos para os efeitos testados e comparados com os vernizes experimentais. O controle foi o V7 - Gel de Clorexidina.

Avaliação da ação antimicrobiana

Primeiramente, foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) empregando microplacas de cultura de tecidos (96 poços) contendo 100 µL/poço de meio Brain Heart Infusion (BHI). Após serem transferidos para o primeiro poço, foram realizadas diluições seriadas para obtenção de concentrações variadas (gradativamente). Clorexidina a 0,12% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada como controle positivo e BHI como controle negativo. O inóculo bacteriano (1×10^6 CFU/mL) foi adicionado em todos os poços e as placas foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ por 24 horas.

A CIM foi definida como a menor concentração do verniz de própolis que inibiu o crescimento visível do microrganismo indicado pela resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), uma alíquota de cada poço incubado com concentrações superiores a CIM foi sub-cultivada em novo meio BHI sobre as placas de petri e incubadas novamente. O CBM foi definido como a menor concentração do verniz de própolis que não permitirá crescimento visível no meio de teste.

Foi realizada também a sensibilidade bacteriana ou resistência aos vernizes pelo ensaio de difusão em disco, também conhecido como método de Kirby-Bauer. Alíquotas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* contendo $1,0 \times 10^8$ UFC/ mL foram sub cultivados em ágar Mueller-Hinton (Difco, Trenton, EUA), suplementado com 5% de dextrose para *Streptococcus* spp. Papéis de filtro estéreis embebidos com 20 µL de cada verniz de própolis foram colocados no ágar. Os controles foram o verniz branco, apenas com quitosana (V1), o Duraphat (V7) e o gel de clorexidina (V8). O diâmetro da zona de inibição ao redor do papel de filtro, formado após 24 e 48 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, foi medido em mm com auxílio de paquímetro digital e registrado ($M \pm SD$).

Tanto os testes com os extratos de própolis puro (concentração do fabricante) como os vernizes experimentais e comerciais foram realizados em triplicata.

Análise dos Dados

A análise realizada foi baseada no método quantitativo de halo de inibição (o qual era mensurado com auxílio de paquímetro digital em fundo preto), testando a atividade antimicrobiana dos vernizes, bem como, definindo a CIM e CBM.

Os dados foram analisados quanto à sua distribuição. Para o halo de inibição do *Streptococcus mutans* os dados não foram normais e realizou-se o teste de Kruskal-Wallis e Tukey e para o halo do *Streptococcus sobrinus* os dados foram normais e homogêneos e realizou o teste ANOVA e Tukey. Ambos os testes foram a nível de significância a 5%. A análise de CIM foi qualitativa, determinada se ocorreu inibição do microrganismo ou não.

Resultados

Na análise da concentração inibitória mínima do microrganismo *Streptococcus mutans* e do microrganismo *Streptococcus sobrinus* pelos diferentes tipos de própolis nas diferentes concentrações, observou-se que ambos microrganismos foram inibidos pelo própolis vermelho em concentração igual ou superior 6,25% (considerando a diluição do extrato de própolis em água). Por sua vez, o própolis verde só apresentou inibição em concentrações superiores a 12,5%. (Tabela 2). Pode-se observar que os extratos de própolis puros, na formulação e concentração produzida pelo próprio fabricante (Apis Flora), ambos os própolis (verde e vermelho) apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos avaliados, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, não permitindo o desenvolvimento desses microrganismos no meio, evidenciando a capacidade antibacteriana deste produto natural, o qual apresenta propriedades bactericidas e bacteriostáticas.

Tabela 2. Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) para os dois extratos de própolis em dois tipos de microrganismos

Material	Própolis Verde		Própolis Vermelho	
	Microrganismo		Microrganismo	
Concentração	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>
100%	não	não	não	Não
50%	não	não	não	Não
37,5%	não	não	não	Não
25%	não	não	não	Não
12,5%	não	sim	não	Não
6,25%	sim	sim	não	Não
3,125%	sim	sim	sim	Sim
Meio estéril	não	não	não	Não
Clorexidina 0,12%	não	não	não	Não

Na tabela 3 observa-se os halos de inibição aos microrganismos pelos diferentes grupos, tendo a água como controle negativo e a clorexidina em gel como

positivo. Observa-se que o gel de clorexidina que formou o maior halo de inibição a ambos os *Streptococcus* estudados. Além disso, pode-se observar que o efeito dos vernizes experimentais foi mais intenso no *S mutans* do que o *S sobrinus* (Tabela 3).

Tabela 3. Halo de inibição em mm dos diferentes vernizes testados e soluções. Para o *Streptococcus mutans* têm-se os valores Mediana e Percentis, e no *Streptococcus Sobrinus* em média e desvio padrão.

	S mutans	S. sobrinus
Água	0 (0) c	0 (0) c
Clorexidina 2%	37,47 (35,85 - 38,80) a	32,22(1,66) a
V1 - Quitosana	0 (0) c	0 (0) c
V2 - Nanoquitosana	0 (0) c	0 (0) c
V3 - Verniz P Verm 5%	20,12 (19,95 - 20,88) b	15,89 (0,55) b
V4 - Verniz P Verm 10%	20,47 (19,79 - 20,60) b	16,36 (0,95) b
V5 - Verniz P. Verde 5%	20,24 (19,92 - 20,64) b	16,76 (0,46) b
V6 - Verniz P. Verde 10%	22,60 (22,13 - 23,25) ab	16,07 (0,76) b

Comparação na coluna – mesma letra similaridade estatística.

Discussão

O presente estudo apresentou o objetivo de verificar a capacidade antimicrobiana dos diferentes tipos de extrato de própolis, verde e vermelho, sobre os diferentes microrganismos considerados os principais agentes relacionados ao desenvolvimento da doença cárie, o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*, e observa-se que proporcionaram uma inibição do crescimento microbiano dos dois grupos de bactérias empregadas, com relação à utilização dos dois extratos de própolis (verde e vermelho), sendo que em concentrações menores houve o vermelho apresentou um efeito mais intenso.

Os resultados obtidos foram similares aos encontrados na literatura (7,8,9,12,13,14) em que observaram reduções significativas na concentração microbiana quando com o emprego de extratos de própolis em diversas formas/produtos. Alguns estudos apresentavam formulações de vernizes à base de própolis, associados ou não com fluoretos (27), ou demais substâncias naturais; em contrapartida, outros estudos (8,23,24,25,26) apresentaram o uso de extrato de própolis para o desenvolvimento de diversos tipos de materiais/produtos, odontológicos ou não, como goma de mascar (8), primer (24), resina acrílica (25), resina composta (26), dentre outros, porém sempre com a finalidade de reduzir o contingente bacteriano.

Miranda et al. (14) empregou o extrato de própolis vermelho a fim de reduzir os microrganismos periodontopatogênicos em biofilmes multiespécies, e obteve resultados positivos, em que a Concentração Inibitória Mínima com o extrato de própolis vermelho, com até 800 microgramas por ml, apresentou significativa redução na atividade metabólica do biofilme, resultados semelhantes aos encontrados pela presente pesquisa.

Martins et al. (29) desenvolveram enxaguatórios bucais à base de própolis vermelho, com a adição de fluoreto de sódio ou não em sua composição, e utilizaram um enxaguatório à base de clorexidina como grupo controle para avaliar o efeito inibitório destes enxaguatórios sobre os microrganismos *Streptococcus ssp.* e

Lactobacillus casei. Os resultados do estudo foram favoráveis, dos quais os enxaguatórios à base de extrato de própolis vermelho apresentaram capacidade antimicrobiana, citotoxicidade e efeito anti-biofilme similares ao enxaguatório à base de clorexidina, e ainda concluem que devido aos efeitos indesejáveis no uso de enxaguatório de clorexidina (principalmente à longo prazo), enxaguatórios à base de extrato de própolis vermelho combinado ou não com fluoreto de sódio podem ser utilizados como uma alternativa natural de tratamento. Apesar do presente estudo empregar em forma de verniz, observa-se efeito inibitório da própolis vermelho similar a este projeto.

Esse efeito positivo da própolis também foi observado por Tulsani et al. (8) em que realizaram ensaio clínico com gomas de mascar à base de própolis e xilitol para avaliar a redução do número de *Streptococcus mutans* (contingente bacteriano) em crianças em idade escolar, e observaram que contagem de microrganismos comparativamente com a contagem inicial nas salivas das crianças, em todos os grupos apresentou uma significativa redução no contingente bacteriano quando comparado com os valores iniciais, evidenciando a capacidade antimicrobiana do própolis. .

Outro estudo, Wang et al. (23), empregou própolis em uma formulação distinta para avaliar sua capacidade de inibir as bactérias causadoras da doença cárie; neste estudo foi empregado uma microemulsão de óleo essencial de própolis, e o estudo evidenciou a significativa capacidade antibacteriana e anti biofilme dessa formulação denominada PEOME (propolis essential oil microemulsion); sendo assim, este estudo obteve resultados similares com os obtidos no presente estudo.

Em estudo *in vivo* Imani et al. (24) empregaram nanopartículas de própolis em distintas concentrações, para fins comparativos de concentração inibitória mínima, em um primer ortodôntico desenvolvido com a finalidade de avaliar a atividade antimicrobiana da própolis. Os diferentes primers continham nanopartículas de própolis nas concentrações de 1, 5 e 10% apresentaram significativa inibição do número de colônias de *Streptococcus mutans* em 24 horas de incubação em comparação com o grupo controle (0% de própolis).

Assim, pode-se evidenciar a capacidade antimicrobiana de vernizes dentais à base de própolis, independentemente do tipo de extrato a ser empregado, o que justifica seu emprego na odontologia, haja vista que os mesmos apresentaram satisfatórias atividades antimicrobianas contra os microrganismos que atuam no

desenvolvimento e manutenção da doença cárie, além de apresentar baixa citotoxicidade (6),sendo mais biocompatível que muitas substâncias empregadas hodiernamente, justificando o desenvolvimento de novos materiais odontológicos com extratos naturais o que assegurará um emprego seguro e eficiente na odontologia.

Conclusão

Em suma, conclui-se que ambos extratos de própolis (verde e vermelho) apresentam significativa capacidade antimicrobiana (de forma mais específica contra o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*, os quais foram testados) apresentando tanto efeito bactericida quanto bacteriostático, ressaltando o fato de ser de maneira mais expressiva a ação antimicrobiana do própolis vermelho em relação ao própolis verde.

O emprego de própolis em vernizes odontológicos associado a quitosana demonstrou ser viável e produziu um halo de inibição considerável dos microrganismos causadores da doença cárie, o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*.

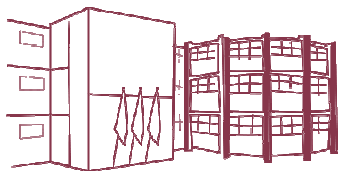
Referências

1. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. Dental caries. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17030.
2. Das Gupta S, Killenberger M, Tanner T, Rieppo L, Saarakkala S, Heikkilä J, Anttonen V, Finnilä MAJ. Mineralization of dental tissues and caries lesions detailed with Raman microspectroscopic imaging. Analyst. 2021;146(5):1705-1713.
3. Darveau RP, Curtis MA. Oral biofilms revisited: A novel host tissue of bacteriological origin. Periodontol 2000. 2021;86(1):8-13.
4. Borisy GG, Valm AM. Spatial scale in analysis of the dental plaque microbiome. Periodontol 2000. 2021;86(1):97-112.
5. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. Chin J Dent Res. 2011;14(2):87-94.
6. DE Luca MP, Freires IA, Gala-García A, Santos VR, Vale MP, Alencar SM, Rosalen PL. 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. PMID: 28591241.
7. Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. J Adv Res. 2017 Jul;8(4):387-392. doi: 10.1016/j.jare.2017.05.006. Epub 2017 May 17. PMID: 28560054; PMCID: PMC5443966.
8. Tulsani SG, Chikkanarasaiah N, Siddaiah SB, Krishnamurthy NH. The effect of Propolis and Xylitol chewing gums on salivary *Streptococcus mutans* count: a clinical trial. Indian J Dent Res. 2014 Nov-Dec;25(6):737-41. doi: 10.4103/0970-9290.152182. PMID: 25728105.
9. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. Pol J Microbiol. 2014;63(2):127-35.

10. Kripal K, Chandrasekaran K, Chandrasekaran S, Kumar VR, Chavan SKD, Dileep A. Treatment of dentinal hypersensitivity using propolis varnish: A scanning electron microscope study. *Indian J Dent Res.* 2019;30(2):249-253.
11. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res.* 1991;25(5):347-51.
12. Close H, Koo, J.A, Cury, P.L, Rosalen, G.M, Ambrosano, M, Ikegaki, Y.K, Park. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Res.* 2002;445-448.
13. De Luca MP, Franca JR, Macedo FA, Grenho L, Cortes ME, Faraco AA, Moreira AN, Santos VR. Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. *Biomed Res Int.* 2014;2014:348647.
14. Miranda SLF, Damasceno JT, Faveri M, Figueiredo L, da Silva HD, Alencar SMA, Rosalen PL, Feres M, Bueno-Silva B. Brazilian red propolis reduces orange-complex periodontopathogens growing in multispecies biofilms. *Biofouling.* 2019 Mar;35(3):308-319. doi: 10.1080/08927014.2019.1598976. Epub 2019 Apr 24. PMID: 31014106.
15. Ding J, Matsumiya T, Hayakari R, Shiba Y, Kawaguchi S, Seya K, Ueno K, Imaizumi T. Daily Brazilian green propolis intake elevates blood artemisinin levels in humans. *J Sci Food Agric.* 2021 Aug 30;101(11):4855-4861. doi: 10.1002/jsfa.11132. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33543484.
16. Cardoso JG, Iorio NL, Rodrigues LF, Couri ML, Farah A, Maia LC, Antonio AG. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans*' count in dental biofilm. *Arch Oral Biol.* 2016 May;65:77-81. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.02.001. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26871983.
17. Cicciù M, Fiorillo L, Cervino G. Chitosan Use in Dentistry: A Systematic Review of Recent Clinical Studies. *Mar Drugs.* 2019;17(7):417.
18. Fakhri E, Eslami H, Maroufi P, Pakdel F, Taghizadeh S, Ganbarov K, Yousefi M, Tanomand A, Yousefi B, Mahmoudi S, Kafil HS. Chitosan biomaterials application in dentistry. *Int J Biol Macromol.* 2020;162:956-974.
19. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Davamani F, Pau A. Effectiveness of chitosan-propolis nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilms in the

- root canal. BMC Oral Health. 2020 Nov 25;20(1):339. doi: 10.1186/s12903-020-01330-0. PMID: 33238961; PMCID: PMC7690148.
20. da Silva ER. Eficácia de um verniz de própolis/quitosana na prevenção da desmineralização do esmalte de dentes decíduos. Estudo in vitro [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo; 2021.
21. Salatino A, Salatino MLF, Negri G. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis? *Apidologie*. 2021;52(6):1075-1097.
22. Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Wang W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*. 2006 Apr;27(11):2440-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.036. Epub 2005 Dec 9.
23. Wang F, Yuan J, Wang X, Xuan H. Antibacterial and antibiofilm activities of Chinese propolis essential oil microemulsion against *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol*. 2023 Mar 1;134(3):lxad056. doi: 10.1093/jambio/lxad056. PMID: 36931893.
24. Imani Z, Sodagar A, Pourhajibagher M, Hosseinpour Nader A, Bahador A. Evaluation of antibacterial effect of the orthodontic composite containing propolis nanoparticles in rat as an animal model. *Folia Med (Plovdiv)*. 2023 Feb 28;65(1):131-139. doi: 10.3897/folmed.65.e67782. PMID: 36855985.
25. Arab S, Bahador A, Sodagar A, Pourhajibagher M, Akhavan A, Hafith AN, Pornamazeh T. Antimicrobial Properties of Acrylic Resin Incorporated with Propolis Nanoparticles. *Front Dent*. 2021 Jul 26;18:29. doi: 10.18502/fid.v18i29.6939. PMID: 35965714; PMCID: PMC9355898.
26. Oliveira JMDS, Cavalcanti TFS, Leite IF, Dos Santos DMRC, Porto ICCM, de Aquino FLT, Sonsin AF, Lins RML, Vitti RP, de Freitas JD, Barreto EO, de Souza ST, Kamiya RU, do Nascimento TG, Tonholo J. Propolis in Oral Healthcare: Antibacterial Activity of a Composite Resin Enriched With Brazilian Red Propolis. *Front Pharmacol*. 2021 Nov 29;12:787633. doi: 10.3389/fphar.2021.787633. PMID: 34912230; PMCID: PMC8667603.
27. Martins ML, Monteiro ASN, Guimarães JEC, Guimarães MBCT, da Silva RF, Cabral LM, Farah A, dePaula J, Romanos MTV, Maia LC, Cavalcanti YW, Fonseca-Gonçalves A. Cytotoxic and antibacterial effect of a red propolis mouthwash, with or without fluoride, on the growth of a cariogenic biofilm.

Arch Oral Biol. 2019 Nov;107:104512. doi:
10.1016/j.archoralbio.2019.104512. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31382160.



Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 531ª Reunião Ordinária, realizada em 03 de junho de 2024, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador), conforme menção constante no trabalho e documentação existente no Serviço de Graduação da FORP.

Ribeirão Preto, 03 de junho de 2024.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP