

# Eficiência de soluções aquosas e hidroalcoólicas da própolis do Vale do Paraíba sobre cepas de *Streptococcus mutans*

## EFFECTIVENESS OF THE PROPOLIS AQUEOUS AND HYDROALCOHOLIC SOLUTIONS FROM PARAÍBA VALLEY AGAINST *STREPTOCOCCUS MUTANS* STRAINS

Fernando Barreto Cardoso Alves  
Lídia Maria Ruv Carelli Barreto  
Antonio Olavo Cardoso Jorge  
Silvana Soléo Ferreira dos Santos  
Instituto Básico de Biociências- Universidade de Taubaté

### RESUMO

Cárie dentária é uma doença multifatorial que tem o hospedeiro, bactérias e dieta como fatores primários. *Streptococcus* do grupo *mutans* são considerados seu principal agente etiológico em superfícies lisas dos dentes. Própolis é uma substância resinosa de diversas origens florais coletadas por abelhas a partir de brotos, botões florais e exsudatos resinosos que apresenta efeitos antivirótico, antimicrobiano, anticancerígeno, antifúngico, anestésico e anticariogênico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de soluções aquosas e hidroalcoólicas de própolis da região do Vale do Paraíba sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Vinte e uma cepas de *S. mutans* foram submetidas à ação da própolis aquosa e hidroalcoólica em diversas concentrações (0,25; 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 30%) pelo método de diluição em ágar Müller-Hinton e a concentração inibitória mínima foi determinada. Embora a própolis aquosa tenha inibido todas as cepas de *S. mutans* até a concentração de 20%, a própolis hidroalcoólica foi significativamente mais eficaz em baixas concentrações.

### PALAVRAS-CHAVE

Concentração inibitória mínima. Própolis aquosa. Própolis hidroalcoólica. *Streptococcus mutans*.

### INTRODUÇÃO

Própolis é uma substância de composição complexa formada por material resinoso, gomoso ou balsâmico, coletado pelas abelhas em resinas e brotos de árvores ou em outras partes do tecido vegetal, modificada na

colméia por adição de secreções salivares e cera (GHISALBERTI, 1979; NIKOLAEV, 1978) onde é empregada pelas abelhas no reparo de frestas ou danos à colméia, no preparo de locais assépticos para a postura da rainha e na mumificação de animais invasores da colméia (BRUMFITT; HAMILTON-MILLER; FRANKLIN, 1990; GOJMERAC, 1980).

Durante a coleta da própolis, as abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 13-glicosidase presente na sua saliva, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados em flavonóides agliconas. As agliconas são moléculas de açúcar solúveis em água, portanto, a partir de extratos aquosos o referido composto poderá ser extraído (BONHEVI; COLE; JORDÁ, 1994).

Cárie dentária é uma doença infecciosa e transmissível dos tecidos calcificados dos dentes, resultando em perda localizada dos tecidos duros. É uma doença multifatorial que depende da interação de três fatores primários: hospedeiro, representado pelos dentes e saliva, microbiota e dieta consumida. *Streptococcus mutans* é o microrganismo mais freqüentemente relacionado ao processo cariogênico. Como característica biológica principal, pode-se citar que ele é altamente acidogênico, alcançando pH final 3,4 em um período de 18 a 24 horas de crescimento em meio de cultura. Este microrganismo tem habilidade em permanecer viável em pH baixo por longo período de tempo (JORGE, 1998).

Estudos da atuação do extrato etanólico de própolis (EEP) de várias regiões do Brasil na inibição da atividade da enzima glicosil-transferase (GTF) e crescimento do *S. mutans* constataram que o extrato de maior destaque foi a própolis do Rio Grande do Sul, que demonstrou

grande inibição da enzima e crescimento da bactéria. Foi encontrada nessa própolis alta concentração de pinocembina e galangina (PARK et al., 1998a).

Koo et al. (1999 a, c) avaliaram o potencial anticárie e antibiofilme dentário da própolis em ratos dessalivados, utilizando dois tipos de extratos etanólicos de própolis (EEP), um do Rio Grande do Sul (RS) e um de Minas Gerais (MG). Os autores concluíram que apenas os animais tratados com EEP do RS demonstraram redução da cárie de superfície lisa e de sulco, bem como menor severidade da cárie de superfície lisa. Assim, o uso da própolis para a prevenção da cárie dentária é bastante promissor, porém seu efeito depende da região de coleta da própolis, uma vez que seus compostos ativos como flavonóides e outros compostos fenólicos, variam em termos quantitativos e qualitativos.

Sforzin et al. (2000) estudaram o efeito das estações do ano na atividade antibacteriana da própolis brasileira, não encontrando diferença significativa no efeito das estações. Os autores obtiveram eficiente ação antimicrobiana, principalmente sobre bactérias Gram-positivas.

Koo et al. (2000b) mostraram que a variedade da própolis do nordeste (Bahia) tem efeito excepcional, *in vitro*, sobre *S. mutans*; ponderando que os efeitos biológicos da própolis provavelmente não sejam apenas os flavonóides e ácidos derivados.

Suzuki (2000) demonstrou que a própolis bruta continha substâncias solúveis em água e que essas substâncias também apresentavam efeitos medicinais já reconhecidos em componentes oleosos da própolis. Pelo método de extração na água, a própolis brasileira produz quase o dobro de extrato em comparação com própolis estrangeiras. Ao lado dessas propriedades, a própolis em solução aquosa apresenta a vantagem de ser mais segura e fácil de ser absorvida pelo corpo humano. Além de não apresentar odor forte, a resina não forma camada, nem fica impregnada no copo quando se toma própolis com a água, facilitando muito sua ingestão.

Koo et al. (2002c) encontraram componentes na própolis que inibem a atividade da glicosiltransferase e o crescimento bacteriano. A apigenina é o novo e potente inibidor da atividade da glicosiltransferase e o TT-fornesol foi descoberto como efetivo agente antibacteriano.

De acordo com Koo et al. (2002a) a incidência de cárie em superfície lisa foi reduzida significativamente pela apigenina com o TT-fornesol (60%), com o fluoreto

(70%) e com a clorexidina (72%) quando comparados ao grupo controle.

Koo et al. (2002b) estudaram o efeito do bochecho com solução de própolis por três dias sobre biofilme dentário acumulado e formação de polissacarídeos. Como resultado do bochecho, a própolis do Rio Grande do Sul foi a mais eficiente, reduzindo a formação de biofilme dentário supragengival e formação de polissacarídeos insolúveis abaixo das condições de acumulação de grandes biofilmes dentários. O bochecho experimental reduziu a concentração do biofilme dentário em 61,7% comparado ao placebo.

A exposição constante da mucosa bucal ao álcool etílico pode predispor ao desenvolvimento de tumores malignos na cavidade bucal, língua e lábios (SOFFRITTI et al., 2002). Reis et al. (2002) observam um aumento na frequência de micronúcleos (porções de cromatina que permanecem próximas ao núcleo, resultantes de mitoses aberrantes após a ação de agentes genotóxicos) em células esfoliadas da língua de indivíduos expostos ao etanol.

De acordo com Khayyal et al. (2003), o extrato de própolis aquoso obteve um sugestivo efeito potencial na terapia de pacientes asmáticos.

Diante do exposto, verificar a sensibilidade *in vitro* de cepas de *Streptococcus mutans* a soluções aquosas em comparação às hidroalcoólicas da própolis da região do Vale do Paraíba amplia o conhecimento e pode gerar alternativas no controle deste microrganismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a verificação da atividade antimicrobiana das soluções aquosas e hidroalcoólicas da própolis, foram utilizadas 21 cepas de *Streptococcus mutans*, sendo 20 cepas pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Taubaté e uma cepa padrão (ATCC 35688).

### Preparo das soluções aquosas e hidroalcoólicas da própolis

Partindo da mistura de própolis bruta produzida nos municípios do Vale do Paraíba, foram elaboradas as soluções de própolis aquosa (300g de própolis bruta para 1 L de água destilada) e hidroalcoólica (600g de própolis bruta para 1 L de álcool de cereais) conforme metodologia preconizada em manipulação farmacológica para própolis (PARK et al., 1998). A partir da solução mãe, de ambos os produtos foram tomados diversos

volumes para produzir concentrações das soluções em 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 30%. Estas misturas foram autoclavadas a 121°C por 10 minutos conforme sugerido por Vizaco; Barreto e Fortes (2001).

## Procedimentos

Cada cepa de *S. mutans* foi reativada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI – DIFCO, Detroit, EUA) e incubada por 24h a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após crescimento, foram semeadas em ágar Mitis Salivarius (DIFCO, Detroit, EUA) Bacitracina (0,2 UI) Sacarose (150mg/mL) e incubadas por 24 h a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após o crescimento, cada cepa de *S. mutans* foi suspensa em 10 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%) esterilizada até atingir aproximadamente 3 x 10<sup>8</sup> células/mL (tubo n° 1 da escala de McFarland). Cada suspensão foi semeada com auxílio do replicador de Steers na superfície de placas contendo ágar Müller-Hinton (DIFCO, Detroit, EUA) adicionado de solução aquosa ou hidroalcoólica de própolis a 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 30%, respectivamente (método de diluição em ágar) e incubadas a 37°C por 24h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. A leitura foi feita pela observação da presença ou ausência de crescimento de colônias na superfície do ágar. A total ausência de crescimento correspondeu à concentração inibitória mínima (CIM) necessária para impedir o crescimento microbiano.

Para controle do experimento as suspensões foram semeadas em ágar Müller-Hinton sem adição de própolis (controle positivo) e em ágar Müller-Hinton adicionado de álcool de cereais a 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 30% (controle do veículo de extração sobre as cepas de *S. mutans*).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as cepas testadas (n=21), incluindo a cepa padrão ATCC 35688 cresceram tanto no controle positivo (meio sem adição de própolis) quanto nos meios adicionados de álcool, em todas as concentrações.

A concentração inibitória mínima (CIM) da solução hidroalcoólica de própolis foi de 0,25% para 80,95% das cepas (n=17) incluindo a cepa padrão ATCC 35688 e 0,5% para 19,05% (n=4) das cepas. Para a solução aquosa de própolis, a concentração inibitória mínima para 66,66% (n=14) das cepas foi de 10%, incluindo a cepa padrão, para 28,58% das cepas (n=6) 20% e para 4,76% (n=1) a CIM foi de 5% (Figura 1).

A ação da solução hidroalcoólica de própolis sobre *S. mutans* foi significativamente superior à solução aquosa com p < 0,01 (Tabela 1).

A composição química da própolis varia de região para região, variando a proporção e tipos de substâncias nela encontrados. Pelo menos duzentos compostos já foram identificados em diferentes amostras de própolis (MARCUCCI et al., 2000). Esta riqueza química tem atraído a atenção dos pesquisadores.

De acordo com Koo et al. (1999 b, c, 2002b), o efeito anticárie da própolis depende da região da coleta uma vez que os compostos ativos são bastante variáveis em termos quantitativos e qualitativos. O presente trabalho procurou verificar a ação *in vitro* da própolis da região do Vale do Paraíba sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Suzuki (2000) demonstrou que a própolis bruta tem substâncias solúveis em água com efeitos medicinais. No presente trabalho, verificou-se que todas as cepas de *S. mutans* foram inibidas até a concentração de 0,5% de solução hidroalcoólica de própolis e para a solução aquosa de própolis a inibição total das cepas foi alcançada na concentração de 20%. Este fato pode estar relacionado a diferentes substâncias extraídas da própolis por diferentes solventes (álcool ou água), ou mesmo a porcentagem da substância antibacteriana extraída.

Alguns compostos extraídos da própolis, responsáveis pela sua atividade antimicrobiana, já foram identificados, entre eles podemos citar a galangina, pinocembrina, benzil-r-cumarato, entre outros (ABREU et al., 1998; ALENCAR et al., 1999; BORRELLI et al., 2002; IKEGAKI, 2001; KOO et al., 2000 a, b e c; KOO et al., 2002 a e c; PARK et al. 1998 a e b).

No presente trabalho 81% das cepas de *S. mutans* testadas foram inibidas pela solução alcoólica de própolis a 0,25%. A concentração inibitória mínima (CIM) para soluções alcoólica de própolis obtidas de amostras do Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR) sobre *S. mutans* variou de 50 a 100 µg/ml, enquanto para amostras de São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ) variam entre 200 a 400 µg/ml (KOO et al., 1999b; PARK et al. 1998 a e b). No trabalho de Ikegaki (2001), a própolis da Bahia (BA) apresentou a maior atividade antimicrobiana (zona de inibição 9,0 mm), seguida da própolis do PR (zona de inibição 0,8 mm); as demais amostras apresentaram inibição mínima ou não apresentaram atividade contra *S. mutans*.

Ikegaki (2001) constatou que numa mesma região foram encontradas própolis com constituições químicas

diferentes devido à diferença genética entre as abelhas.

Koo et al. (2002b) demonstraram efeito positivo na utilização de bochecho com própolis alcoólica por três dias, chegando a reduzir o biofilme dentário em 61,7%.

No presente trabalho a concentração de própolis hidroalcoólica necessária para inibir todas as cepas de *S. mutans* foi significativamente menor do que a de própolis aquosa, resultado semelhante ao encontrado por Nostro et al. (2005), em que as concentrações de extrato alcoólico de própolis necessárias para inibir *Helicobacter pylori* foram 2 a 4 vezes mais baixas do

que com o extrato aquoso. Entretanto, de acordo com Soffritti et al. (2002), a exposição constante da mucosa bucal ao álcool etílico poderia facilitar a formação de tumores malignos na cavidade bucal, língua e lábios.

O interesse do presente trabalho pela ação da própolis de extração aquosa sobre *S. mutans* encontra-se na possibilidade de obtenção de uma substância livre de álcool que possa ser utilizada constantemente no controle do biofilme dentário. Por outro lado, muitos estudos são ainda necessários para a determinação dos componentes extraídos da própolis pela água, bem como seus efeitos sobre os microrganismos da cavidade bucal.

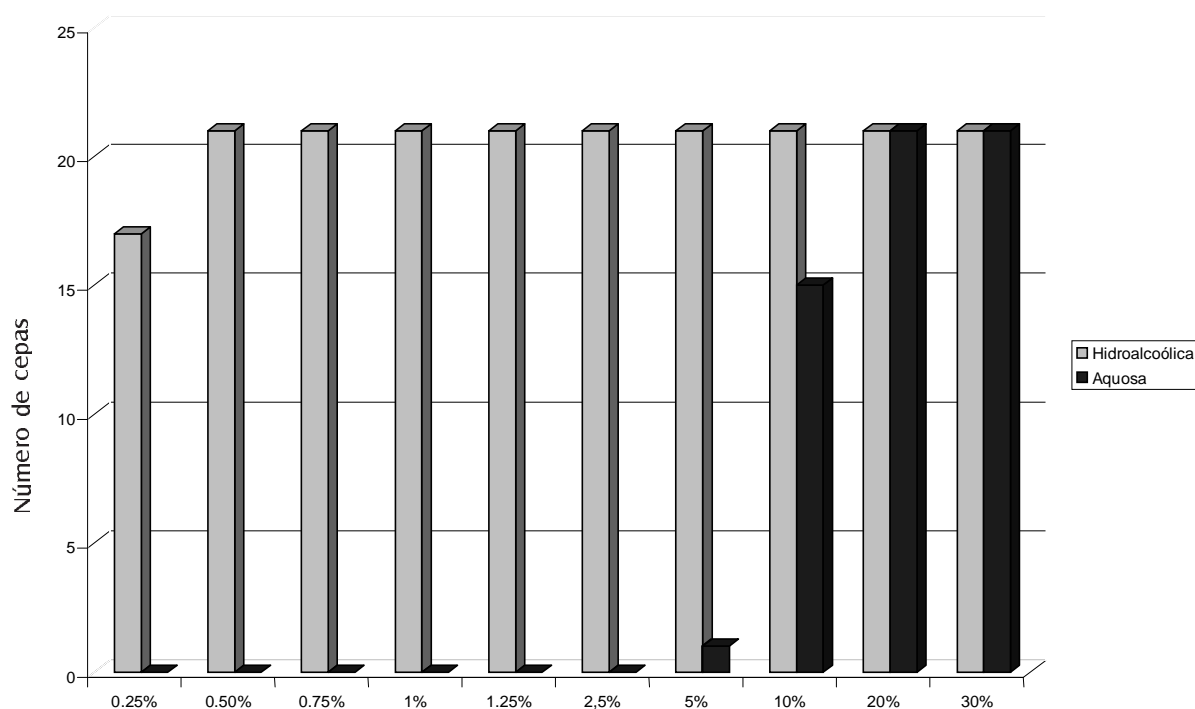


Figura 1- CIMs obtidas com soluções hidroalcoólicas e aquosas de própolis para *S. mutans*

Tabela 1 - Número de cepas de *S. mutans* inibidas nas várias concentrações de própolis hidroalcoólica e aquosa.

Soluções de própolis	Concentrações em porcentagem									
	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25	2.5	5.0	10	20	30
Hidroalcoólica	17	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Aquosa	0	0	0	0	0	0	1	15	21	21

Teste de Kolmogorov-Smirnov (gl = 2, p < 0,01).

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente trabalho, podemos concluir que:

- a) Na concentração de 20%, a própolis aquosa inibiu todas as cepas de *Streptococcus mutans* testadas;
- b) Na concentração de 0,5%, a própolis hidroalcoólica inibiu todas as cepas de *S. mutans* testadas;
- c) A própolis hidroalcoólica foi significativamente mais eficaz ( $p < 0,01$ ) do que a própolis aquosa.

## ABSTRACT

Dental caries is a multifactorial disease which has the host, the bacteria and the diet as its primary factors. *Streptococcus mutans* is considered the main etiological agent on dental surfaces. Propolis is a resinous substance of various floral origin collected from sprouts, flower buds and resinous extracts which shows antiviral, antimicrobial, anti-cancerous, antifungal, anesthetic and anti-decay effects. The objective of this paper was to evaluate the antimicrobial activity of aqueous and hydroalcoholic solutions of the propolis from Vale do Paraíba (São Paulo, Brazil) on strains of *S. mutans*. Twenty one strains of *S. mutans* were submitted to the aqueous and hydroalcoholic propolis in several concentrations (0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 1.25; 2.5; 5.0; 10.0; 20.0 and 30.0%) through the method of dilution in Müller – Hinton agar and its minimal inhibitory concentration was determined. Even though the aqueous propolis had inhibited all the *S. mutans* strains up to the concentration of 20%, the hydroalcoholic propolis was significantly more effective in low concentrations.

## KEY-WORDS

Aqueous propolis. Hydroalcoholic propolis. Minimal inhibitory concentration. *Streptococcus mutans*.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, G. E. et al. Estudio comparativo del efecto del cepillado con una crema dental con propóleos rojos y de un gel con clorofila. *Rev Cubana Estomatol*, v. 35, n. 3, p. 112-118, set./dez., 1998.
- ALENCAR, S. M. et al. Classificação das própolis do nordeste do Brasil e avaliação de algumas de suas propriedades biológicas. *Rev Univ Franca*, v. 7, n. 7, p. 43, 1999. Edição especial.
- BONHEVI, J. S.; COLE, F.V.; JORDÁ, R. E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J Oil Chem Soc*, v.71, p.529-532, 1994.
- BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, v. 73, p. 53-63, nov 2002. Suplemento 1.
- BRUMFITT, W. M.; HAMILTON-MILLER J.T. M.; FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1.propolis. *Microbios*, v. 62, p.19-22, 1990.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, v.60, p.59-84, 1979.
- GOJMERAC, W. L. Bees, beekeeping, honey and pollination. Westport: Avi Publishing Company. 1980. 192 p.
- IKEGAKI, M. *Determinação da qualidade de própolis de Apis mellifera africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis*. 2001, 72f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2001.
- JORGE, A. O. C. *Microbiologia bucal*. São Paulo: Santos, 1998, p. 58-61.
- KHAYYAL, M.T. et al. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundamental Clinical Farmacol*, v. 17, n. 1, p. 93-102, 2003.
- KOO, H. et al. Avaliação do potencial de anticárie e antiplaca da própolis de *Apis mellifera* da região sudeste e sul do Brasil III- efeito sobre glicosiltransferases individuais e purificados. *Rev Univ Franca*, v. 7, n. 7, p. 45- 46, 1999a, Edição especial.

- \_\_\_\_\_. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Research*, v.33, n. 5, p. 393-400, sep./oct. 1999b.
- \_\_\_\_\_. Avaliação do potencial de anticárie e antiplaca da própolis de *Apis mellifera* da região sudeste e sul do Brasil IV- efeito sobre o desenvolvimento de cárie dental em ratos desalivados. *Rev Univ Franca*, v. 7, n. 7, p. 46- 47, 1999c. Edição especial.
- \_\_\_\_\_. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol*, v. 45, n. 2, p. 141-148, feb. 2000a.
- \_\_\_\_\_. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on *mutans streptococci*. *Current Microbiol*, v. 41, n. 3, p. 192-6, sep. 2000b.
- \_\_\_\_\_. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferase in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Research*, v.34, n. 5, p. 418-426, sep./oct. 2000c.
- \_\_\_\_\_. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol*, v.17, n.6, p.337-343, dec. 2002a.
- \_\_\_\_\_. Effects of mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. *Caries Research*, v. 36, n. 6, p. 445-448, nov./dec. 2002b.
- \_\_\_\_\_. Effect of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, n.5, p. 1302-1309, may 2002c.
- MARCUCCI M. C. et al. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Z Naturforsch*, v. 55, p.76-81, jan/feb. 2000.
- NIKOLAEV, A. B. Diffending the bee town, in a remarkable hive product: própolis. *Apimondia Bucarest*, p.10, 1978.
- NOSTRO, A. et al. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res*, v. 19, n. 3, p. 198-202, mar. 2005.
- PARK, Y.K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiol*, v. 36, n.1, p.24-28, jan. 1998a.
- \_\_\_\_\_. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 18, n. 3, 1998. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20611998000300011&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000300011&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 14 abr. 2007.
- REIS, S. R. A. et al. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. *Pesqui Odontol Bras*, v. 16, n. 3, p. 221-225, jul./set. 2002.
- SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*, v. 73, n. 1-2, n. 243-249, nov. 2000.
- SOFFRITTI, M. et al. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of methyl alcohol and ethyl alcohol in rats. *Ann NY Acad Sci*, n. 982, p. 46-69, 2002.
- SUZUKI, I. A própolis de solução aquosa. *Revista Mensagem Doce*, n. 58, p. 10-16, 2000.
- VIZACO, S. F. M., BARRETO, L. M. R. C., FORTES, N. L. P. O uso da própolis no controle *in vitro* e em "casa de vegetação" de três fitopatógenos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Solanaceae. 2001. 35f. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2001.

**Silvana Soléo Ferreira dos Santos**

Profa. Dra. do Instituto Básico de Biotécnicas da Universidade de Taubaté.  
 Rua Victor Barbosa Guisard,35  
 Centro - Taubaté-SP  
 CEP: 12010-660  
 e-mail: silvana.soleo@uol.com.br

**TRAMITAÇÃO**

Artigo recebido em: 27/01/2006  
 Aceito para publicação em: 15/02/2006