

Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas

Nogueira, M.A.^{1*}; Diaz, M.G.²; Tagami, P.M.³; Lorscheide, J.³

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

³Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil.

Recebido 09/01/07 / Aceito 27/07/07

RESUMO

A própolis é uma resina produzida por abelhas a partir de diferentes plantas. Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas e usados durante anos na medicina popular como antimicrobianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade dos extratos etanólicos de própolis oriundos dos Estados do Paraná, Minas Gerais e São Paulo e de óleos essenciais frente às bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* usando o método de difusão em ágar. Os resultados obtidos indicam a própolis do estado de Minas Gerais como a mais ativa de todas, o que leva a crer que a diferença observada na quantidade de própolis produzida e a diversidade dos metabólitos secundários, no produto, podem estar associados com a região de produção e com a estação climática da coleta. Os óleos essenciais mostraram atividades significantes para os microrganismos testados, alguns deles apresentando zona de inibição maior que o do controle positivo.

Palavras-chave: própolis; atividade bactericida; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus casei*; cáries.

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que acometem a cavidade bucal algumas são de origem infecciosa como a cárie que é formada por um processo de descalcificação do esmalte dentário e da dentina por ação de ácidos orgânicos formados por bactérias fermentadoras, principalmente, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, que atuam sobre os carboidratos introduzidos com a dieta alimentar do homem. Acredita-se que *S. mutans* esteja envolvido com o desenvolvimento inicial da cárie, enquanto os lactobacilos sejam os responsáveis pelo comprometimento da lesão (Van Houte, 1993). Três são os fatores essenciais para o início do processo de cárie: o hospedeiro (dente), a microflora (bactérias) e o substrato

(alimentos ingeridos). Também devem ser considerados à dieta ingerida, a condição de mineralização e a resistência do dente (Keyes, 1962).

A microbiologia da placa bacteriana associada à cárie foi estudada extensivamente nas últimas décadas (Bragd et al., 1987; Slots & Listgarten, 1988; Dahlén et al., 1989), sendo que muitos organismos podem participar desse processo; entretanto, algumas bactérias são muito mais ativas que outras. *S. mutans* é um dos microrganismos orais mais relacionados ao desenvolvimento das cáries. O grupo *mutans* adere-se à superfície dos dentes, fermentando carboidratos ingeridos proporcionando a formação de ácidos orgânicos responsáveis pela desmineralização inicial do esmalte dentário, são considerados os mais cariogênicos, pois produzem ácido lático em grande quantidade a partir da sacarose, são acidúricos, mantendo o metabolismo mesmo em pHs baixos e formam polissacarídeos intra e extracelulares de reserva, além do polissacarídeo extracelular insolúvel, responsável pela adesividade da placa bacteriana. Posteriormente, são os lactobacilos, principalmente o *L. casei*, o causador de lesões progressivas, com conseqüente formação de cavidades (Loesche, 1986; Macpherson et al., 1992).

O flúor tem um papel muito importante no combate e redução da cárie, pois no meio bucal, o flúor aumenta a solubilidade do esmalte dentário deixando-o mais resistente perante a presença dos ácidos gerados pelas bactérias cariogênicas; abranda a quebra do esmalte e acelera o processo natural de remineralização. O esmalte dos dentes é sólido e é composto por vários filamentos juntos feitos de minerais. As bactérias presentes na boca formam ácidos no exterior do dente que se infiltram nos filamentos do esmalte. Este processo de desmineralização pode produzir um ponto fraco na superfície do dente, denominado carie, o fluor usado sob diferentes modalidades, como colutórios bucais, vernizes e dentifrícios, tem a finalidade de aumentar a resistência do esmalte (Araújo, 2000). A única preocupação com o dentifrício fluoretado diz respeito a crianças menores de cinco anos que ingerem em média 30% de pasta por escovação. A aplicação de flúor em crianças pode reduzir,

*Autor correspondente: Marisa Alves Nogueira - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal de Viçosa - Av. P. H. Rolfs - CEP: 36570-000 - Viçosa - MG, Brasil. Telefone: + 55-21-31-3899-3041 Fax: + 55-21-31-3899-2374. E-mail: marisanogueira@ufv.br

significativamente, o risco de cárie. Todavia, seu aumento excessivo na corrente sanguínea que pode ocorrer no período de odontogênese, pode ocasionar a fluorose dental, uma doença que ocorre quando há um excesso de ingestão de flúor durante a amelogênese e que afeta grande número de crianças (Kramer et al., 1997; Villena & Corrêa, 1998).

Atualmente, encontram-se no mercado, grande variedade de cremes dentais com diversos sabores e cores a fim de agradar ao público infantil, contendo flúor, que ao mesmo tempo em que é indispensável para o controle da cárie, deve ter sua ingestão rigorosamente controlada. Por esse motivo, a procura por agentes com atividade bactericida eficiente contra microrganismos cariogênicos, que não tragam efeitos indesejáveis é imprescindível no combate à cárie infantil.

A própolis é obtida a partir de uma resina que as abelhas retiram das plantas e utilizam para fechar frestas da colméia, o que evita a entrada de vento frio e insetos, impedindo a ação de fungos e bactérias. Ao ser transportada para as colméias pelas abelhas, a resina se transforma em própolis. Em países de clima temperado são poucas as plantas que produzem essa resina, mas no Brasil há uma grande variedade delas como a própolis verde ou marrom esverdeada, amarela, amarela escura, castanho escuro, castanho claro e mais recentemente a vermelha (Park et al., 2000; Trusheva et al., 2006). As características da própolis variam conforme a espécie vegetal visitada pelas abelhas, bem como o clima predominante; ou seja, sua cor, sabor, odor, consistência, composição química e sua atividade biológica dependem das procedências das espécies vegetais e das estações do ano (Marcucci, 1995).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas e são utilizados para proteção e atração de polinizadores. Quimicamente são derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides. Os terpenóides são os constituintes preponderantes nos óleos essenciais, sendo os mais freqüentes os monoterpenos (cerca de 90%) e os sesquiterpenos. Grandes variações nas composições dos óleos essenciais têm sido observadas, dependendo da origem da planta, do estágio de desenvolvimento e da parte usada para a destilação do óleo (Simões et al., 2002).

A própolis e os óleos essenciais têm sido usados há milhares de anos na medicina popular com várias finalidades, dentre elas, bactericidas, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e como fungicidas (Quiroga et al., 2006; Scazzocchio et al., 2006), porém são poucas as pesquisas desenvolvidas sobre a atividade inibitória em bactérias causadoras da cárie (Koo et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade dos extratos etanólicos de própolis oriundas dos Estados do Paraná, Minas Gerais e São Paulo e de óleos essenciais, frente às bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* usando o método de difusão em ágar, para uma possível incorporação em formulações de pastas dentais infantis.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias utilizadas

Foram utilizados os microrganismos *Streptococcus mutans*, ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* isolado a partir do produto lácteo Yakult 40, utilizando-se o meio MRS (Man, Rogosa and Sharpe).

Plantas utilizadas

Foram coletadas as folhas de citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle), flor e folhas de lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), poejo (*Mentha pulegium* L.), erva cidreira (*Melissa officinalis* L.), guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.), lipia (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown) e hortelã (*Mentha piperita* L.) no herbário da Cooperativa de Cascavel (Copavel); frutos do cravo da índia (*Syzygium aromaticum* L.) e cascas do caule de canela (*Cinnamomum zeylanicum* L.) foram adquiridos em supermercado.

Própolis utilizadas

Foram coletadas três amostras de própolis bruta em apiários localizados na cidade de Cascavel no Estado do Paraná, em São Gotardo, Minas Gerais e São Paulo, SP. A extração foi realizada por maceração, com álcool etílico 96° GL, por um período de quinze dias, em seguida, fez-se à filtração e concentração do macerado em rota evaporador, obtendo-se, assim, os extratos alcoólicos a 25%. Os extratos de própolis obtidos foram acondicionados em frascos de vidro e armazenados em geladeira.

Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos a partir de 150g das folhas secas e moídas de citronela, lavanda, poejo, erva cidreira, guaçatonga, lipia e hortelã, flor de lavanda, fruto do cravo da índia e casca do caule de canela por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por um período de quatro horas. Os óleos essenciais obtidos foram acondicionados em frascos de vidro e armazenados em geladeira.

Padronização das bactérias cariogênicas

Dos *Streptococcus mutans* cultivados em meio ágar Sangue (BHI 5% sangue), retirou-se, com alça de platina, uma colônia isolada da bactéria que foi transferida para um tubo de ensaio contendo ágar Nutriente (meio NA) inclinado, pelo método de estrias contínuas. Para o *Lactobacillus casei*, a partir da placa onde foi adicionado 0,1mL do Yakult, retirou-se uma colônia isolada, com auxílio de uma alça de platina, que foi inoculada em tubo de ensaio contendo meio ágar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) inclinado em ápice, pelo método de estrias contínuas. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C, por

24 horas. Após o crescimento das respectivas bactérias, fez-se a padronização do inóculo para 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais e os extratos de própolis foram submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em ágar de acordo com a metodologia de Zacchino (2001). Foram colocados em discos de papel de filtro com 5mm de diâmetro e aplicados 5,0; 2,5; 1,25; 0,6; e 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dos óleos essenciais e extratos de própolis e 10 μL de solução Digluconato de Clorexidina a 1% como controle antimicrobiano. As placas contendo as bactérias cariogênicas como microrganismos detectores foram incubadas por 24 horas a 37°C para a leitura dos resultados.

RESULTADOS

O bioensaio de difusão em ágar mostrou a ação inibitória dos extratos de própolis e dos óleos essenciais pela formação de halo de inibição em torno da área em que os discos

de papel foram colocados.

Observou-se que a amostra de extrato de própolis proveniente do estado do Paraná não apresentou ação bactericida sobre os microrganismos testados, mesmo nas maiores concentrações ensaiadas.

Os extratos de própolis proveniente das regiões de Minas Gerais e São Paulo mostraram atividade antimicrobiana para o microrganismo *S. mutans* a partir de concentração equivalente à 0,6 $\mu\text{g}/\text{L}$. Entretanto, a própolis de Minas Gerais foi a que se mostrou mais ativa de todas, com a formação de halos de inibição um pouco maior em relação à própolis de São Paulo.

Os óleos essenciais de guaçatonga, erva cidreira, citronela, cravo, lavanda (flor), lavanda (folha) e hortelã apresentaram atividade para o microrganismo *L. casei*, sendo que o óleo essencial de lípia apresentou halo de inibição maior que o do controle (Tabela 1).

Em relação aos óleos essenciais, os óleos de guaçatonga, lípia, citronela, canela, cravo, poejo e hortelã apresentaram atividade para o microrganismo *S. mutans*, sendo que os óleos essenciais de citronela e cravo apresentaram halos de inibição maiores que o controle nas concentrações de 5,0 e 2,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Tabela 2).

Tabela 1 - Atividade bactericida de óleos essenciais e extratos de própolis para o microrganismo *L. casei*.

Amostras	Concentrações ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ^a					Controle ^b
	5,0	2,5	1,25	0,60	0,30	
	Halo de inibição em mm					
Guaçatonga	9,0	7,0	6,0	n/a	n/a	19,0
Erva cidreira	8,0	7,0	n/a	n/a	n/a	19,0
Lípia	18,0	16,0	9,0	7,0	5,0	15,0
Citronela	10,0	9,0	7,0	6,0	n/a	17,0
Canela	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	19,0
Cravo	7,0	n/a	n/a	n/a	n/a	18,0
Lavanda (flor)	12,0	10,0	9,0	8,0	7,0	19,0
Lavanda (folha)	10,0	8,0	7,0	6,0	6,0	19,0
Poejo	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	19,0
Hortelã	15,0	9,0	7,0	7,0	n/a	19,0
Própolis MG	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	19,0
Própolis SP	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	19,0
Própolis PR	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	19,0

^aMédia de três repetições; ^b Clorexidina: concentração do controle = 10 $\mu\text{g}/\text{L}$; n/a = não ativo.

Tabela 2 - Atividade bactericida de óleos essenciais e extratos de própolis para o microrganismo *S. mutans*.

Amostras	Concentrações ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ^a					Controle ^b
	5,0	2,5	1,25	0,60	0,30	
	Halo de inibição em mm					
Guaçatonga	12,0	6,0	n/a	n/a	n/a	18,0
Erva cidreira	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	12,0
Lípia	7,0	5,0	n/a	n/a	n/a	12,0
Citronela	25,0	21,0	n/a	n/a	n/a	16,0
Canela	24,0	19,0	8,0	6,0	n/a	14,0
Cravo	9,0	n/a	n/a	n/a	n/a	14,0
Lavanda (flor)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	13,0
Lavanda (folha)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	13,0
Poejo	9,0	7,0	n/a	n/a	n/a	13,0
Hortelã	7,0	n/a	n/a	n/a	n/a	16,0
Própolis MG	15,0	13,0	12,0	10,0	n/a	10,0
Própolis SP	13,0	12,0	11,0	8,0	n/a	10,0
Própolis PR	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	10,0

^aMédia de três repetições; ^b Clorexidina: concentração do controle = 10 $\mu\text{g}/\text{L}$; n/a = não ativo.

Os óleos essenciais de guaçatonga, lípia, citronela, cravo, e hortelã apresentaram atividade para os dois microrganismos testados em diferentes concentrações (Tabelas 1 e 2).

DISCUSSÃO

O uso de pastas dentais com produtos naturais é recente no mercado nacional e voltado apenas para o público adulto, com algumas marcas apresentando grande aceitação pelos consumidores em geral (Rosell et al., 2004). Estudos preliminares relatam que algumas plantas têm ação anti-séptica e bactericida, sendo eficientes na promoção da saúde bucal e no controle de doenças bucais podendo ser utilizados na rotina profilática (Mullally et al., 1995).

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que o extrato de própolis proveniente do Estado de Minas Gerais apresentou maior atividade bactericida para *S. mutans* sendo superior ao do Estado de São Paulo e do Paraná. Esses resultados são um indicativo das diferenças na produção e diversidade de metabólitos secundários da própolis associadas com as regiões e as estações em que foram produzidas. Muitos trabalhos relatam a atividade antibactericida de extratos de própolis sobre bactérias que causam doenças periodontais associados principalmente a *S. mutans* mas não ao *L. casei* (Gebara et al., 2002; Leitão et al., 2004).

Os óleos essenciais analisados também apresentaram atividade biológica significativa para os microrganismos *L. casei* e *S. mutans* sendo que os óleos essenciais de citronela e canela foram os que apresentaram maior atividade em relação ao controle.

De acordo com resultados observados os extratos de própolis não apresentam atividade para *L. casei*, portando para uma formulação dental mais efetiva que combata as causas primárias da cárie, estes extratos deverão ser utilizados em associação aos óleos essenciais que apresentaram atividade para os dois microrganismos, podendo desta forma ser uma excelente promessa como agente anticárie e antiplaca na rotina profilática em crianças de zero a cinco anos. Entretanto novos testes *in vitro* deverão ser realizados para a determinação da concentração mais efetiva e *in vivo* para comprovação da eficácia das formulações.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Celso Vataru Nakamura, do Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais, Universidade Estadual de Maringá.

ABSTRACT

Antimicrobial activity of essential oils and propolis against oral pathogens

Propolis is a natural composite balsam, produced by honey bees (*Apis mellifera*) from the gum of various

plants. Essential oils and their components are products of the secondary metabolism of plants, used for many years in folk medicine, principally, as antimicrobial. The aim of the present work was to analyze the differences in the antimicrobial activity of propolis obtained from three different regions of Brazil (Minas Gerais, Parana and São Paulo States) and of essential oils, using agar diffusion methods to test them against cariogenic microorganisms *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*. The results showed that the propolis from Minas Gerais State was more active than that from the others, and implied that the existing differences in the amount of propolis produced and diversity of secondary metabolites in the product may be associated with the region of production and the climatic season of collection. The essential oils displayed significant inhibitory activity against the microorganisms tested, showing larger inhibition zones than the positive control.

Keywords: propolis; antibacterial activity; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus casei*; caries.

REFERÊNCIAS

- Araújo IC. Odontologia como promoção de saúde. In: Rocha MPC. *Odontologia reabilitadora: noções básicas para o clínico*. São Paulo: Santos; 2000. p.150-70.
- Bragd L, Dahlén G, Wikström M, Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Periodontol* 1987; 14:95-9.
- Dahlén G, Manji F, Baelum V, Ferjerskov O. Black-pigmented bacteroides species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. *J Clin Periodontol* 1989; 16:305-10.
- Gebara ECE, Lima LA, Mayer MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz J Microbiol* 2002; 33:365-9.
- Keyes PH. Recent advances in dental caries research Bacteriology. *Int Dent J* 1962; 12(4):443-64.
- Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45:141-8.
- Kramer PF, Feldens CA, Romano AR. *Promoção de saúde bucal em odontopediatria*. São Paulo: Artes médicas; 1997. 130p.
- Leitão DPS, Silva-Filho AA, Polizello ACM, Bastos JK, Spadaro ACC. Comparative evaluation of *in-vitro* effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *streptococcus mutans*. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(11):1834-9.

- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986; 50(4):353-80.
- Macpherson LM, Macfarlane TW, Geddes DAM, Stephen KW. Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship to *in vivo* caries experience. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:142-7.
- Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; 26:83-99.
- Mullally BH, James JA, Coulter WA. The efficacy of a herbal based toothpaste on the control of plaque and gingivitis. *J Clin Priodontol* 1995; 229:686-9.
- Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. Classificação das própolis brasileira a partir de suas propriedades físico-químicas e propriedades biológicas Mensagem Doce [on-line periodical] 2000; 58 (4). Disponível na URL: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/msg58.htm> [20 mai 2007]
- Quiroga EM, Sampietro DA, Soberón JR, Sgariglia MA, Vattuone MA. Própolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* 2006; 101:103-10.
- Rosell FL, Valsecki-Júnior A, Silva SRC, Oliveira-Júnior LG. Atividade antimicrobiana de substâncias naturais em dentifrícios. *Saúde Rev* 2004; 6:39-44.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4.ed. Florianópolis: Editora da UFSC; 2002. 821p.
- Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 2006; 161:327-33.
- Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988; 15:85-93.
- Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, da Rocha Pasin FD, Tsvetkova I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006; 3:249-54.
- Van Houte J. Microbiological predictors of caries risk. *Adv Dent Res* 1993; 7:87-96.
- Villena R, Corrêa MSM. Flúor - aplicação tópica in: Corrêa MS. *Odontopediatria na primeira infância*. São Paulo: Ed. Santos; 1998. p.315-42.
- Zacchino S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos; 2001. p.435-79