

# Ação da Própolis de *Apis mellifera* Associada ao Fluoreto de Sódio Sobre o Biofilme Dental: Ensaio Clínico Duplo Cego Randomizado

The Effect of *Apis mellifera* Propolis Associated With Sodium Fluoride on Dental Biofilm: Randomized Double-Blind Clinical Trial

Alessandro D. DE-CARLI<sup>1</sup>, Paulo ZÁRATE-PEREIRA<sup>1</sup>, Grasiela DE-CARLI<sup>2</sup>, Edilson J. ZAFALON<sup>3</sup>, Cibele B. R. ZÁRATE<sup>3</sup>, Luis M. YASSUMOTO<sup>4</sup>

1- Doutor, Departamento de Odontologia Comunitária e Especial, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

2- Mestre, Ministério da Defesa - Porto Alegre/RS

3- Mestre, Departamento de Odontologia Comunitária e Especial, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

4- Mestre, Departamento de Prótese e Odontologia Restauradora, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a ação do Extrato Etanólico de Própolis 5% isoladamente e combinado ao fluoreto de sódio sobre o acúmulo do biofilme dental, e conseqüentemente, sobre a atividade de cárie. **Material e Método:** Nesse ensaio clínico duplo cego randomizado, participaram 97 escolares, os quais foram aleatoriamente divididos em Grupo I e Grupo II, sendo submetidos, respectivamente, à aplicação tópica do Gel A (Própolis 5% + NaF 0,05%) e do Gel B (Própolis 5%). A contagem dos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, o acúmulo de biofilme (IHO-S) e a quantificação das manchas brancas ativas foram analisados antes e após a aplicação dos géis experimentais. **Resultados:** Am-

bos os géis suprimiram as contagens salivares de *Streptococcus mutans* e o acúmulo do biofilme dental, sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, enquanto somente o Gel A fora capaz de inativar significativamente as manchas brancas. **Conclusão:** A própolis associada ao fluoreto de sódio foi eficiente na redução do acúmulo de biofilme e dos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, tendo destacada ação na remineralização de manchas brancas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Própolis, fluoreto de sódio, biofilme dental, manchas brancas

## INTRODUÇÃO

O acúmulo do biofilme bacteriano é considerado fator crítico para o desenvolvimento da cárie em humanos<sup>1</sup>. Quando o controle mecânico é falho e os sítios de estagnação do biofilme dental não são desorganizados, a formação de um biofilme potencialmente cariogênico é favorecida e as espécies microbianas como os *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* são ecologicamente selecionadas, passando a dominar o microambiente bucal<sup>2</sup>, fato que expõe o indivíduo a uma situação de risco de cárie exacerbado, implicando o surgimento de manchas brancas ativas na superfície do esmalte, as quais são o primeiro sinal clínico visível da doença, cujo controle e inativação são exequíveis<sup>3,4</sup>.

Diante disso, indica-se o controle químico (adjuvante) do biofilme dental, a fim de auxiliar o paciente na realização de uma higienização bucal compatível com níveis clínicos salutaros<sup>5</sup>.

Como o biofilme dental compreende uma comunidade microbiana complexa, a utilização de um único composto como meio de controle químico pode se revelar insuficiente, tornando necessária a combinação de duas ou mais substâncias, obtendo-se um efeito sinérgico entre estas e reduzindo efeitos adversos oriundos de produtos químicos utilizados prolongadamente<sup>6-8</sup>.

As variadas propriedades farmacológicas da própolis despertaram o interesse da Odontologia em utilizá-la, principalmente

como antimicrobiano<sup>9-11</sup>, sendo sua utilização como método terapêutico à cárie dentária comprovada<sup>12</sup>. Estudos evidenciaram a efetividade da ação antibacteriana da própolis sobre *Streptococcus mutans*, bem como seu efeito positivo na diminuição dos níveis salivares desse microrganismo, que é considerado crítico na etiopatogenia da cárie dentária<sup>13-15</sup>.

A associação da própolis ao fluoreto aumentou as propriedades anticárie do flúor através de sinergismo químico, reduzindo a formação do biofilme e a virulência de *Streptococcus mutans*, sem alterar a microflora residente<sup>16-20</sup>.

O objetivo deste estudo foi de verificar a ação de dois géis experimentais, um contendo própolis associada ao fluoreto e outro composto somente por própolis, sobre as contagens salivares de *Streptococcus mutans*, na inativação de manchas brancas e no acúmulo do biofilme dental, em crianças de alto status de risco à cárie, através de um ensaio clínico duplo-cego randomizado.

## MATERIAL E MÉTODO

### Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocolo 731/2006), sendo o Termo de Consentimento Livre Esclarecido

lido e assinado pelos pais ou responsáveis legais pelas crianças que participaram do estudo.

#### Obtenção Do Extrato Etanólico De Própolis (EEP)

Foi utilizada própolis oriunda do Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, sendo o EEP constituído de 30% de própolis e 70% de álcool (massa/massa). Realizou-se a análise química do EEP através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. O teor de flavonóides observado na amostra analisada foi de 37,5 mg/g de EEP. A quantidade de flavonóides encontrada atende os requisitos do Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil para sua utilização, e corresponde à quantidade relatada nos estudos sobre própolis em Odontologia.

A obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) do EEP deu-se através do método da diluição em meio de cultura Tryptone Soja contendo cepas de *Streptococcus mutans* (GS-5). Na concentração de 1%, houve inibição do crescimento bacteriano, sendo estipulado para utilização no estudo um valor 5 vezes superior a este, devido às condições inerentes ao meio bucal, ou seja, a concentração utilizada foi de 5%.

#### Preparação Dos Géis Experimentais

A partir do EEP a 5% e através da adição de carboximetilcelulose, dois géis (A/B) foram obtidos, um contendo Própolis 5%, e outro contendo Própolis 5% + NaF 0,05%, ambos com a mesma aparência física, mesmo odor e mesmo sabor, acondicionados em tubos plásticos âmbar e sob refrigeração. O conteúdo de cada gel fora mantido sob a custódia do professor responsável pela elaboração dos mesmos. Assim sendo, tampouco coordenadores e voluntários da pesquisa conheciam a composição dos géis utilizados, caracterizando o estudo duplo-cego.

#### Desenho Experimental

Foram selecionados 97 escolares de ambos os gêneros, entre 6 e 12 anos de idade, nos quais foram realizadas a análise microbiológica inicial dos níveis de *Streptococcus mutans* (SM), a estimativa do Índice de Higiene Oral Simplificado<sup>21</sup> inicial (IHO-S<sub>i</sub>) para verificação do acúmulo de biofilme e a quantificação das manchas brancas ativas presentes ao início do experimento. Estipulou-se como critério de inclusão que todos os voluntários possuíssem níveis salivares de SM de 10<sup>22</sup> UFC/mL de saliva. A amostra (n=97) foi dividida aleatoriamente em GRUPO I (n=49), cujo controle do biofilme foi realizado com o Gel A, e GRUPO II (n=48) no qual foi utilizado o Gel B. Realizou-se 4 aplicações subseqüentes dos géis (uma vez por semana, durante quatro semanas), pois somente a partir de 3 a 4 aplicações tópicas de flúor verifica-se um maior reservatório de flúor disponível para a inibição do processo de desmineralização do esmalte dentário<sup>23</sup>. Passadas 24 h da quarta aplicação obteve-se nova coleta de saliva dos voluntários, para contagem de *Streptococcus mutans*, o que foi repetido 15 dias após, juntamente com a recontagem das manchas brancas ativas presentes. Decorridas 48 horas da última aplicação dos géis experimentais, realizou-se a mensuração do Índice de Higiene Oral Simplificado<sup>21</sup> final (IHO-S<sub>f</sub>).

Para a análise quantitativa dos níveis salivares microbiológicos, foi utilizada a técnica da espátula<sup>24</sup> em ágar mitis salivarius

bacitracina (ágar MSB), seletivo para *Streptococcus mutans*<sup>22</sup>.

#### Análise Estatística

Para a análise estatística dos valores médios das variáveis UFC/mL de saliva e IHO-S, foi aplicado o teste de Wilcoxon e t de Student (Epi Info 3.4.1 /2007 e Bioestat 4.0), respectivamente, no nível de significância de 5%. O teste de Wilcoxon / t de Student foi utilizado para a análise dos grupos nos diferentes períodos (*baseline*-T<sub>0</sub>, 24 horas- T<sub>1</sub>, 48 horas e 15 dias- T<sub>15</sub>) e o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos nos mesmos períodos.

## RESULTADOS

Finalizada a fase experimental, foi revelado que o Gel A correspondia à Própolis 5% + NaF 0,05% (Grupo I), e o Gel B à Própolis 5% (Grupo II).

As médias referentes aos níveis salivares de SM da amostra antes (T<sub>0</sub>), 24 horas (T<sub>1</sub>) e 15 dias (T<sub>15</sub>) após o término das aplicações dos géis A e B são mostrados na Tabela 1.

A Tabela 2 apresenta as diferenças das médias observadas dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* (SM) após a aplicação dos géis experimentais.

**Tabela 1.** Média (± DP) de UFC / mL de saliva de SM dos Grupos I e II, antes e após as aplicações dos Géis A e B (n = 97).

Grupos	Períodos		
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>15</sub>
Grupo I ( n = 49) (Própolis 5% + NaF 0,05%)	97,85 (± 5,29)*	9,32 (± 5,48)*	63,67 (± 22,25)*
Grupo II( n = 48) (Própolis 5%)	98,67 (± 4,44)*	32,42 (± 6,34)*	87,21 (± 17,18)*

\*p< 0,0001; nível descritivo para o teste de Wilcoxon

**Tabela 2.** Diferença entre as médias de UFC/mL de saliva de SM dos Grupos I e II, nos diferentes períodos (n = 97).

Grupos	Períodos		
	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub>	T <sub>0</sub> -T <sub>15</sub>	T <sub>1</sub> -T <sub>15</sub>
Grupo I ( n = 49) (Própolis 5% + NaF 0,05%)	88,53 <sup>ab</sup> *	32,25 <sup>ab</sup> *	56,33 <sup>ab</sup> *
Grupo II( n = 48) (Própolis 5%)	66,28 <sup>ab</sup> *	11,49 <sup>ab</sup> *	54,79 <sup>ab</sup> *
Grupo I x Grupo II	65,48 <sup>ab†</sup>	10,69 <sup>ab†</sup>	77,89 <sup>ab†</sup>

<sup>ab</sup> Letras distintas – estatisticamente significantes (p≤0,05)

<sup>aa,bb</sup> Letras iguais – diferenças não significantes (p>0,05)

\*Wilcoxon

†Mann-Whitney

**Tabela 3.** IHO-S e manchas brancas presentes antes e após a aplicação dos géis experimentais.

Grupos	IHO-S			MB		
	IHO-S <sub>1</sub>	IHO-S <sub>2</sub>	p	T <sub>0</sub> (n=71)	T <sub>15</sub> (n=38)	p
Grupo I (Própolis 5% + NaF 0,05%)	1,80 (±0,51) <sup>a</sup>	1,13 (±0,41) <sup>b</sup>	0,01*	31 <sup>a</sup>	03 <sup>b</sup>	<0,0001 <sup>†</sup>
Grupo II (Própolis 5%)	1,66 (±0,40) <sup>a</sup>	1,06 (±0,27) <sup>b</sup>	0,01*	40 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	<0,0001 <sup>†</sup>

MB: Número de Manchas Brancas

aa/bb – Não significativa

\* - Teste t de Student

† - Teste do  $\chi^2$

Na Tabela 3, observam-se os valores referentes ao IHO-S e às manchas brancas presentes nos Grupos I e II antes e após a fase experimental.

## DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que após a aplicação dos géis experimentais, verificou-se redução significativa da média de UFC de SM, em ambos os grupos, ou seja, tanto nos indivíduos do Grupo I (Própolis 5%+NaF 0,05%), como aqueles do Grupo II (Própolis 5%), o que nos permitiu inferir ser efetiva a ação da própolis, na concentração utilizada, sobre os níveis salivares de SM, fato que vai ao encontro dos resultados obtidos em estudos desenvolvidos *in vivo*<sup>13-15</sup>. Porém, essa redução foi mais acentuada durante as aplicações, visto que 15 dias após a última aplicação, observou-se uma tendência de retomada aos valores iniciais de UFC de SM/mL de saliva.

Considerando-se que ambas as soluções reduziram os níveis salivares de SM, verificou-se que a ação foi significativa em T<sub>1</sub> e T<sub>15</sub>, ao se comparar quantitativamente às UFC SM / mL de saliva de T<sub>0</sub>. Sob essa ótica, observou-se também diferenças significativas entre as médias de UFC de SM / mL de saliva, independente das comparações entre períodos e entre as duas soluções (Tabela 2). A associação da própolis ao fluoreto em baixas concentrações comportou-se de maneira semelhante a outros estudos<sup>18-20</sup>. Desse modo, a Própolis 5% associada ao fluoreto na concentração de 0,05%, atuou reduzindo os níveis de bactérias cariogênicas. Essa ação, de acordo com a literatura, não se observa com o uso de NaF 0,05% isoladamente, o que justifica o controle composto de Própolis 5%, e não de NaF 0,05%.

Em nosso estudo, verificou-se inativação significativa nas manchas brancas presentes nos voluntários do Grupo I, enquanto no Grupo II isso não fora observado. Tal fato poderia ser explicado pela presença do fluoreto no Gel A, tendo em vista sua comprovada capacidade de atuar na remineralização do esmalte dentário, propriedade não atribuída à própolis, o que nos levou à inferência de que a redução ocorrida no Grupo II deu-se graças à inibição do biofilme cariogênico, que quando reduzido, implica diminuição da perda mineral<sup>18</sup>. Em relação a esses resultados, o acompanhamento longitudinal ficaria indicado, para a obtenção de dados mais consistentes.

Independentemente do gel aplicado, observou-se redução do acúmulo do biofilme para ambos os grupos, com diferença significativa entre IHO-S<sub>1</sub> e IHO-S<sub>2</sub> no nível de 1% (p=0,01). Esses valores demonstraram que tanto o Gel A quanto o Gel B atuaram positivamente sobre o acúmulo do biofilme dental no sentido de suprimi-lo, o que seria atribuído à própolis, devido a sua eficaz propriedade antimicrobiana superior a do fluoreto na concentração de 0,05%, resultados que concordam com estudo prévio<sup>19</sup>.

Esse perfil terapêutico da associação proposta corrobora para que em um futuro próximo, essa associação de própolis e fluoreto seja uma possibilidade a mais para a prevenção, controle e tratamento da cárie dentária<sup>16-17</sup>.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que a associação da Própolis 5% ao NaF 0,05% foi eficaz na redução dos níveis salivares de SM, foi eficiente na remineralização de lesões de manchas brancas e reduziu significativamente o acúmulo do biofilme.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento de Ensino, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul (FUNDECT/MS) pelo fomento à pesquisa e os Departamentos de Química e Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

## REFERÊNCIAS

- Löe H. A review of the prevention and control of plaque. In: McHugh W D. Dental plaque. Edinburgh: Livingstone; 1969.
- Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. Proc Finn Dent Soc. 1991;87:515-25.
- Backer-Dirks O. Post-eruptive changes in dental enamel. J Dent Res. 1966;3(Suppl):503-11.
- Maltz M, Barbachan e Silva B, Carvalho DQ, Volkweis A. Results after two years of non-operative treatment of occlusal surface in children with high caries prevalence. Braz Dent J. 2003;14(1):48-54.
- Addy M. Plaque control as a scientific basis for the prevention of dental caries. J R Soc Med Suppl. 1986;79(14):6-10.
- Featherstone JD. Remineralization, the Natural Caries Repair

- Process-The Need for New Approaches . Adv Dent Res. 2009;21:4-7.
07. Ögaard B, Seppa L, Rolla G. Professional topical fluoride applications- clinical efficacy and mechanism of action. Adv Dent Res. 1994;8(2):190-201.
  08. Ten Cate JM. The need for antibacterial approaches to improve caries control. Adv Dent Res. 2009;21:8-12.
  09. Brumfitt W, Hamilton-Miller JMT, Franklin I. Antibiotic activity of natural products: Propolis. Microbios. 1990;62:19-22.
  10. Park YK, Ikegaki M, Contado JL. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. Arq Biol Technol. 1997;40(1):97-106.
  11. Woisky RG, Giesbrecht AM, Salatino A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera*. Rev Farm bioquím Univ S Paulo. 1994;30(1):19-21.
  12. Ikeno K, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res. 1991;25:347-51.
  13. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. Arch Oral Biol. 2006;51:15-22.
  14. Ota C, Valente PHM, Unterkircher CS, Shimizu MT. Atividade da própolis sobre bactérias isoladas da cavidade bucal. Lecta. 1998;16(1):73-7.
  15. Steinberg D, Kaine G, Gedalia I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. Am J Dent. 1996;9(6):236-9.
  16. Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. Adv Dent Res. 2008;20:17-21.
  17. Koo H, Jeon JG. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. Adv Dent Res. 2009;21:63-8.
  18. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH. Effects of apigenin and *tt*-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. Oral Microbiol Immunol. 2003;17:337-43.
  19. Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and *tt*-farnesol with fluoride on *S. mutans* biofilm and dental caries. J Dent Res. 2005;84(11):1016-20.
  20. Koo H, Seils J, Abranches J, Burne RA, Bowen WH, Quivey Jr RG. Influence of apigenin on *gtf* gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(2):542-6.
  21. Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. J Am Dent Assoc. 1964;68:7-13.
  22. Gold OG, Jordan HV, van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 1973;18:1357-64.
  23. Jobim JJ, Pagot MA, Mansan R, Maltz M. Enamel dental caries submitted to different topical fluoride treatments in situ. In: Annual Orca Congress, 52; 2005. Caries Res. 2005;39:318.
  24. Köhler B, Brathall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. J Clin Microbiol. 1979;9(5):584-8.
  25. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microb Rev. 1986;50(4):353-80.

## ABSTRACT

Purpose: the aim of this study was to evaluate the effect of this substance both individually and combined with sodium fluoride on dental biofilm accumulation and consequently on caries activity. Material and Method: Ninety seven pupils participated in this randomized double-blind clinical trial. Subjects were randomly divided into Group I and Group II and submitted to topical applications of Gel A (5% Propolis + 0.05% NaF) and Gel B (5% Propolis), respectively. The salivary count of *Streptococcus mutans*, biofilm accumulation (OHI-S) and the quantification of active white spots were analyzed before and after the applica-

tions of both gels. Results: The two gels suppressed the salivary count of *Streptococcus mutans* and accumulation of dental biofilm, where no statistically significant difference between the groups was observed. However, only Gel A was able to significantly inactivate white spots. Conclusion: Propolis associated with sodium fluoride was efficient in reducing the accumulation of biofilm and the salivary levels of *Streptococcus mutans*, while demonstrating a notable effect on the remineralization of white spots.

KEYWORDS: Propolis, sodium fluoride, dental biofilm, white spots

## ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Alessandro Diogo DE-CARLI  
 Av. Afonso Pena, 8020, 202/C; CEP: 79040-01;  
 Campo Grande - MS, Brasil.  
 E-mail: alessandrodecarli@hotmail.com  
 Telefone: 67. 81236797