

1.06.99 - Química.

ENXAGUANTES BUCAIS À BASE DE EXTRATO DE PRÓPOLIS PARA AÇÃO ANTI-CÁRIE NA PROMOÇÃO DA SAÚDE: ANÁLISE QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DESTES PRODUTOS

Larissa dos Santos Fávoro^{1*}, Mariana Inocência Manzano¹, José Eduardo Gonçalves²

1. Estudante de IC da UNICESUMAR

2. UNICESUMAR – Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas e Programa de Pós-graduação em Promoção da Saúde. Pesquisador do ICETI da UNICESUMAR/ Orientador

Resumo:

A própolis possui diversas propriedades biológicas, sendo empregada em fitoterápicos, como enxaguantes bucais. Estes atuam como adjuvantes às técnicas de higienização removendo o biofilme, o que é essencial à manutenção da saúde bucal.

Neste trabalho foram desenvolvidos enxaguantes bucais à base de extrato etanólico de própolis, a partir de amostras que foram analisadas química e microbiologicamente, verificando quais apresentavam o melhor potencial terapêutico para serem empregadas na formulação dos enxaguantes.

Na análise quantitativa de fenóis totais, pelo método de Follin-Ciocalteu, e no teste da atividade antioxidante dos extratos, pelo método fotolorimétrico do radical livre DPPH, foram observados, respectivamente, nas amostras de Ilha Grande, São Jorge do Patrocínio e Porto Camargo 0,03%, 0,02% e 0,02% (m/m) de teor de fenóis totais, e 5,23 µg/mL, 10,35 µg/mL e 6,25 µg/mL de atividade antioxidante, o que sugere que as amostras apresentam um bom potencial antioxidante.

Palavras-chave: Fitoterápicos; Pesquisa em Odontologia; Antissépticos bucais.

Apoio financeiro: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da UniCesumar (PROBIC).

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UNICESUMAR.

Introdução:

O biofilme é considerado o principal fator etiológico que leva ao desenvolvimento de doenças orais, como cáries. A prevenção e o tratamento se dão por meio da inibição da formação do biofilme e da sua remoção mecânica sobre a superfície dental (Thosar, Dharmadhikari, Baliga & Rathi, 2015).

A remoção da placa por meio de agentes mecânicos é um método simples e eficaz, porém sua efetividade é influenciada pela habilidade e motivação do indivíduo (Franco Neto et al., 2008). Apenas a utilização do método mecânico não é suficiente para remover os microrganismos, fazendo-se necessária a utilização de agentes antimicrobianos em forma de enxaguatórios bucais como adjuvantes na eliminação destes microrganismos patogênicos (Eto et al., 2003; Marinho & Araújo, 2007).

Na odontologia atual, que está mais voltada para a prevenção das doenças bucais, produtos à base de extratos de plantas medicinais vêm sendo empregados com propósito terapêutico *in vivo* (Pereira, Seixas & Aquino Neto, 2002). Dentre esses a própolis tem se destacado por apresentar atividade anticariogênica, sendo seu uso estimulado pelos resultados promissores obtidos em alguns estudos (Koo et al., 2002a). Assim, vem sendo utilizada como princípio ativo na formulação de dentifrícios e enxaguantes bucais, atuando na supressão do crescimento bacteriano, inibindo a síntese de glucano por inibir a glicosiltransferases (GTFS) de estreptococos cariogênicos, e reduzindo significativamente a concentração de placas dentárias após o tratamento (Marinho & Araújo, 2007; Simões, Araújo & Araújo, 2008). Demonstrando desempenho clínico e microbiológico semelhante à solução de bochecho a base de clorexidina, tornou o uso de extratos etanólicos de própolis (EEPs) como agente químico terapêutico no campo da Cariologia uma realidade (Almeida et al., 2006).

A utilização de fitoterápicos apresenta como vantagens o fato de ter um custo

acessível à população e aos serviços de saúde, ser eficientes e ter aceitação popular, o que leva a boas perspectivas no mercado (Francisco, 2010). Assim, neste trabalho foram desenvolvidos enxaguantes bucais à base de extrato etanólico de própolis, a partir de amostras obtidas anteriormente de apicultores do estado do Paraná, as quais foram analisadas química e microbiologicamente, verificando quais apresentavam o melhor potencial terapêutico para serem empregadas na formulação de enxaguantes bucais, os quais poderão ser empregados em escolares no intuito de reduzir a incidência de doenças orais.

Metodologia:

Foram utilizados três extratos etanólico de própolis (EEPs) provenientes das cidades de Porto Camargo, São Jorge do Patrocínio e Ilha Grande no estado do Paraná, cuja preparação havia sido anteriormente desenvolvida por Fávaro, Manzano e Gonçalves (2015).

DESENVOLVIMENTO DO ENXAGUANTE BUCAL A BASE DE PRÓPOLIS

Foi formulado utilizando uma combinação dos EEPs à 8%, lauril sulfato de sódio, essência de menta, mentol pulverizado, eucaliptol, metilparabeno, sacarina sódica, glicerina, corante e água destilada (q.s.p). Foi necessário adicionar o agente tensoativo Tween (Polissorbat 80), que não interferiu no sabor final dos enxaguatórios.

Após o seu desenvolvimento, realizou-se o controle de qualidade do produto desenvolvido, avaliando-se: aspecto, sabor, cor, odor e pH. Também realizou-se o estudo de estabilidade acelerada, onde amostras do produto foram armazenadas em estufa (40°C), geladeira (5°C) e temperatura ambiente durante 90 dias, sendo avaliadas nos tempos zero, 24 horas e após 7, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias quanto aos mesmos itens avaliados no controle de qualidade, segundo o Guia de Estabilidade da Anvisa (Brasil, 2004).

ANÁLISE QUANTITATIVA DE FENÓIS TOTAIS

Utilizou-se o método de Follin-Ciocalteau, onde pesou-se 0,1 g do EEP, dilui em metanol, transferiu para um balão volumétrico de 100 mL, e completou-se o volume com metanol. Transferiu-se uma alíquota de 7,5 mL desta solução para um balão volumétrico de 50 mL, completando o volume com metanol. Transferiu-se uma alíquota de 100 µL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 500 µL do reagente Folin-Ciocalteau e 6 mL de

água destilada, agitou-se a solução por 1 min. Em seguida, acrescentou-se 2 mL da solução de Carbonato de Sódio a 15%, agitou a solução por 30 segundos e completou-se o volume com água destilada. Após 2 horas, realizou-se a leitura das amostras, em triplicata, em espectrofotômetro em 750 nm. O teor de fenóis totais foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (100 a 350 µg/ml) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Utilizou-se o método fotocolorimétrico *in vitro* do radical livre de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), onde os EEPs foram diluídos em metanol nas concentrações de 80; 50; 25; 1; e 0,5 µg/mL para própolis. Um volume de 400 µL de DPPH à 0,87 mM foi adicionado à 3 mL da solução de 80 µg/mL, e realizado nas demais concentrações em intervalos de 2 minutos. Na calibração do espectrofotômetro utilizou-se metanol, e como controle negativo, utilizou-se 400 µL de DPPH em 3 mL de metanol. Após 30 minutos da adição de DPPH, realizou-se a leitura das amostras, em triplicata, em espectrofotômetro em 518 nm. Com a média dos dados obtidos foi calculada a capacidade de sequestrar o radical livre, expressa em percentuais, segundo a expressão abaixo:

$$\% \text{sequestro} = \frac{\text{Abs. do controle negativo} - \text{Abs. da amostra}}{\text{Abs. do controle negativo}} \times 100$$

A partir das atividades antioxidantes percentuais e da concentração de cada extrato foi realizada uma regressão linear, chegando-se à concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado de 100% (CE50).

Resultados e Discussão:

No estudo de estabilidade dos enxaguantes preparados a partir de EEPs provenientes de Ilha Grande, Porto Camargo e São Jorge do Patrocínio, foram avaliados os seguintes parâmetros: aspecto, sabor, cor, odor e pH e foi realizado o estudo de estabilidade acelerada, que serve como auxiliar na determinação da estabilidade da amostra, bem como seu tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (Brasil, 2004).

Observou-se que os enxaguantes analisados não apresentaram alteração quanto a cor, odor e sabor, o que sugere estabilidade das amostras. Através destes resultados foi possível evidenciar que os valores de pH não apresentaram variações significativas entre si nos diferentes ambientes aos quais os

enxaguantes foram submetidos, não sofrendo alteração maior que 10%, com exceção das amostra de Ilha Grande e Porto Camargo que foram submetidas a temperatura ambiente e que no dia 90 apresentaram uma variação de $\pm 12\%$, que pode ter sido ocasionada pelo tempo de análise, pelo envelhecimento do produto poder alterar as características organolépticas, físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas deste (Brasil, 2004).

Quanto ao aspecto, observou-se que os enxaguantes de Ilha Grande e Porto Camargo submetidos à estufa e temperatura ambiente foram os que apresentaram maior estabilidade, por não apresentar formação de precipitado e turvação da amostra, ao contrário da amostra de São Jorge do Patrocínio que se apresentou ligeiramente turva e com ligeira formação de precipitado, provavelmente devido ao seu teor de cera, e ao fato de que elevadas temperaturas aceleram reações físico-químicas, podendo ocasionar alterações no aspecto da amostra, bem como na sua cor, odor e atividade de seus componentes. Todas as amostras submetidas à geladeira apresentaram formação de precipitado e turvação, pois as baixas temperaturas favorecer alterações como precipitação, turvação e cristalização, por diminuir a solubilidade dos componentes da amostra, e estes tipos de alterações durante o estresse térmico (baixas e elevadas temperaturas) é indicativo de instabilidade da amostra (Brasil, 2004, Isaac et al., 2008).

Os resultados apresentados a seguir (Tabela 1), mostram o perfil do teor de fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos de própolis analisados em ensaios espectrofotométricos.

Tabela 4 – Análise espectrofotométrica do perfil do Teor de Fenóis Totais e Atividade Antioxidante dos EEP de Ilha Grande, São Jorge do Patrocínio e Porto Camargo

	Teor de Fenóis Totais (% m/m)	Atividade Antioxidante (CE ₅₀ µg/mL)
Ilha Grande	0,03 ± 0,0015	5,23
São Jorge do Patrocínio	0,02 ± 0,0005	10,35
Porto Camargo	0,02 ± 0,0010	6,25

Observou-se que a média do teor de fenóis totais encontrado nas amostras de Ilha Grande, São Jorge do Patrocínio e Porto Camargo foram, respectivamente, 0,03%, 0,02% e 0,02% (m/m), não atendendo ao

requisito mínimo do Ministério da Agricultura, da Pecuária e Abastecimento (MAPA) que é de 0,50% (m/m) de fenóis totais para extratos de própolis comerciais (Brasil, 2001), no entanto, a amostra que apresentou o maior teor de fenóis totais foi a de Ilha Grande.

A Figura 1 traz a curva padrão de ácido gálico, com sua respectiva equação da reta correspondente aos teores de fenóis totais, onde o valor do coeficiente de regressão (R^2) acima de 99% reflete um alto grau de confiabilidade da curva padrão para inferência dos teores de fenóis e ensaios espectrofotométricos para ácido gálico.

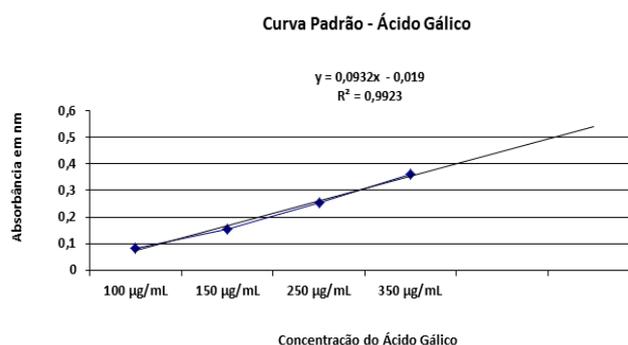
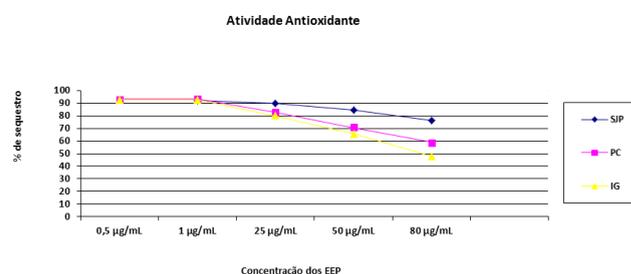


Figura 1 – Curva padrão do Ácido Gálico, com sua respectiva equação de reta, para a determinação do Teor de Fenóis Totais

A capacidade antioxidante (CA) foi determinada pelo método fotocolorimétrico in vitro do radical livre de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) que se baseia em uma reação de óxido-redução. A Figura 2 descrevem os resultados obtidos para a determinação da capacidade antioxidante.

Figura 2 – Determinação da capacidade antioxidante pelo método fotocolorimétrico in vitro do radical livre de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) dos EEP de Ilha Grande, São Jorge do Patrocínio e Porto Camargo



A atividade antioxidante necessária para decrescer a concentração de DPPH em 50% é denominada concentração efetiva (CE₅₀), onde quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (Nunes et al., 2012). A análise mostra (Tabela 1) que a CE₅₀ das amostras de Ilha Grande, São Jorge do Patrocínio e Porto Camargo foram, respectivamente, 5,23 µg/mL, 10,35 µg/mL e 6,25 µg/mL, o que indica uma ótima

atividade antioxidante, apresentando a Ilha Grande a menor CE 50, ou seja, a melhor capacidade de sequestrar radicais livres.

Conclusões:

As amostras não estão dentro dos padrões mínimos requisitados pelo MAPA quanto ao teor de fenóis totais, sugerindo baixas concentrações de ácidos fenólicos, à quem se atribui as propriedades antibacteriana e antioxidante da própolis, porém apresentaram uma boa atividade antioxidante.

A amostra de Ilha Grande apresentou o melhor potencial terapêutico para ser empregado na formulação de enxaguantes bucais, por apresentar o maior teor de fenóis totais, a maior atividade antioxidante (CE50) frente ao radical DPPH, além de um bom perfil de estabilidade, sofrendo poucas alterações quanto aos parâmetros analisados.

Referências bibliográficas

Almeida, R. V. D., Castro, R. D., Pereira, M. S. V., Paulo, M. Q., Santos, J. P., & Padilha, W. W. N. (2006). Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, 6(1), 87-92.

BRASIL (2001). Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>> Acesso em: 15 set. 2016.

BRASIL (2004). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de Cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília, 2004.

Eto, F. S., Raslan, S. A., & Cortelli, J.R. (2003). Características microbianas na saúde e doença periodontal. **Revista Biociências**, 9(2), 45-51.

Fávaro, L. S., Manzano, M. I., & Gonçalves, J. E. (2015). Análise química de própolis e extrato de própolis visando a produção de enxaguantes bucais. **IX EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar**, 9, 4-8.

Francisco, K. M.S. (2010). Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista**

Saúde, 4(1),18-24.

Isaac, V. L. B, Cefali, L. C., Chiari, B. G., Oliveira, C. C. L. G., Salgado, H. R. N., & Corrêa, M. A. (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 29(1), 81-96.

Koo, H., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Ambrosano, G. M. B., Ikegaki, M., & Park, Y. K. (2002a). Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. **Caries Research**, 36(6), 445-448.

Marinho, B. V. S., & Araujo, A. C. S. (2007). O uso de enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **International Journal Of Dentistry**, 6(4), 124-131.

Nunes, C. F., Finger, P. F., Fischer, G., Castro, C. C., Hübner, S. O., Paulino, N., ... Vargas, G. D. (2012). Padronização de uma Amostra de Extrato Etanólico de Própolis Verde. **Revista Fitos**, 7(1), 67-72.

Pereira, A. S., Seixas, F. R. M. S., & Aquino Neto, F. R. (2002). Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, 25(2), 321-326.

Simões, C. C., Araújo, D. B., & Araújo, R. P. C. (2008). Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(1), 84-89.

Thosar, N., Dharmadhikari, P., Baliga, S., & Rathi, N. (2015). Changing trends in oral hygiene and plaque control in children. **Journal Of Dentistry And Oral Care**, 2(1), 1-5.