

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE UMA SOLUÇÃO A BASE DO EXTRATO DA PRÓPOLIS VERMELHA EM FIOS DE SUTURA ODONTOLÓGICOS

Taysnara Ismaeley de Andrade¹; Danilo de Moraes Castanha¹; Carla Carolina do Nascimento Moura¹; Patrícia Lins Azevedo do Nascimento²

¹ Acadêmicos em odontologia na ASCES-UNITA, Caruaru/PE

² Professor assistente III na ASCES-UNITA, Caruaru/PE

RESUMO

Tratou-se de um estudo laboratorial *in vitro* onde se objetivou avaliar o potencial antimicrobiano de uma solução à base do extrato de própolis vermelha sobre a adesão de biofilmes de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), cultura mista de cavidade oral (CMCO), *Candida albicans* (URM 6547) e *Candida tropicalis* (URM 6947) em fios de sutura do tipo seda. Fragmentos de 1 cm do fio de seda foram mantidos em tubos Falcon inoculados separadamente com duas espécies de bactérias, duas de leveduras e uma cultura mista de cavidade oral e incubados em estufa microbiológica por 96 horas para as bactérias e CMCO e 120 horas para as leveduras a fim de obter a formação dos biofilmes. Preparou-se soluções hidroalcólicas de própolis vermelha nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/ml. Após formação do biofilme, adicionou-se 1ml da solução de própolis nas concentrações supracitadas aos fios de seda que foram transferidos para tubos Falcon esterilizados. Estes foram incubados por 24 (bactérias e CMCO) e 48 horas (leveduras). Decorrido o período de incubação, os fios de sutura tratados com a solução, bem como os grupos não tratados foram colocados em placas de Petri com meio de cultura sólido por mais 24/48 horas para verificar o potencial antimicrobiano da solução. A solução hidroalcólica de própolis vermelha na concentração de 5mg/mL foi a menor concentração testada que inibiu o crescimento dos micro-organismos testados após 24/48 horas de tratamento. A solução de 10mg/mL também inibiu o crescimento de todos os micro-organismos e os fios que não receberam a solução de própolis, apresentaram crescimento microbiano em todos os grupos. Concluiu-se que a solução de própolis vermelha do sertão alagoano mostrou-se eficaz no controle dos micro-organismos testados, sugerindo uma possibilidade da realização de novos estudos. No entanto, os presentes resultados apontam uma alternativa para melhoria na inibição da retenção microbiana nos fios de seda.

Palavras-chave: biofilme dentário; própolis; sutura

INTRODUÇÃO

A cavidade oral é a região que apresenta maior microbiota em relação a outros sítios corporais sendo habitado por inúmeras espécies bacterianas que vivem em harmonia com o hospedeiro e apenas em casos de descontrole dessa microbiota haverá alguma alteração (Brendan et al., 2011; Rafetto; Synan, 2012).

Após procedimentos invasivos como em exodontias complicadas, ocorre alteração dessa microbiota e para coaptação das bordas incisadas, manobras

de síntese são necessárias para uma melhor cicatrização da ferida, controle de hemorragia e infecção no pós-operatório (Brendan et al., 2011). Este ato é efetivado por meio de variados tipos de fios de sutura, associados a manobras específicas para sua realização (Cabral et al., 2012).

Os fios de sutura são classificados de acordo com a sua absorção, origem e número de filamentos, e seu uso ainda é controverso devido as suas características específicas e capacidade de produzir reação inflamatória nos tecidos, além de adesão bacteriana; sendo assim, uma possível fonte de contaminação (Araújo et al., 2009). Essa adesão depende não somente dos micro-organismos presentes na cavidade oral, mas também da composição do material de sutura, onde tal proliferação bacteriana será maior nos fios de sutura multifilamentados (Bucci et al., 2016).

Dentre o arsenal de materiais de sutura disponíveis, os mais utilizados para emprego na cavidade oral são os fios de seda e nylon, devido ao seu baixo custo e ter uma boa aceitabilidade na maioria dos casos (Edmiston et al., 2006; Bucci et al., 2016; Lovino et al., 2017).

Os fios de seda possuem baixo custo, boa resistência à tensão, fixação satisfatória do nó e baixa reação inflamatória. Porém sua estrutura multifilamentar favorece a aderência de resíduos e atua como veículo de condução de material séptico do meio bucal para a ferida cirúrgica. Diferentemente dos fios de nylon que são derivados das poliamidas que é um material de sutura isento de capilaridade e coeficiente de fricção baixa o que promove um menor acúmulo de biofilme em sua estrutura (Gonsales et al., 2006).

Por esse motivo, os profissionais da área da saúde podem lançar mão de artefatos para minimizar o acúmulo de bactérias nos fios de sutura (Cabral et al., 2012). A própolis, devido a sua composição química com flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres possui propriedades antimicrobianas, antivirais e antioxidantes. (Bispo Júnior et al., 2012).

A própolis vermelha do sertão alagoano diferencia-se das demais devido a sua composição química e quando comparada aos extratos norte-americanos possui uma atividade mais eficaz no controle de bactérias gram-positivas, que estão presentes na cavidade oral (Cabral et al., 2012).

Esse estudo teve por finalidade verificar, *in vitro*, se o extrato de própolis vermelha do sertão alagoano diminuiria a aderência de biofilme nos fios de sutura tipo seda em micro-organismos presentes na cavidade oral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo tratou-se de um estudo experimental laboratorial *in vitro*.

Micro-organismos

Os micro-organismos selecionados para esse estudo foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), uma cultura mista isolada de cavidade oral (CMCO), *Candida albicans* (URM 6547) e *Candida tropicalis* (URM 6947).

A cultura mista isolada de cavidade oral foi coletada por meio de esfregaço realizado com *swab* esterilizado nas regiões de língua e assoalho de boca de um voluntário. O *swab* foi dispensado em tubo de ensaio contendo caldo tripton de soja (TSB) e incubado a 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, o inóculo foi pipetado em criotubos contendo 15% de glicerol para que fosse mantido em estoque congelado.

Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos com parecer sob o número 2.810.645 (CAAE: 94407918.4.0000.5203).

Fios de sutura

O fio de sutura do tipo seda 3-0 selecionado para esse estudo foi da marca TecNew® (TecNew, Rio de Janeiro-RJ/Brasil).

Extrato de própolis

Utilizou-se o extrato etanólico de própolis vermelha coletada no Sertão Alagoano nas concentrações de 1mg/ml, 5mg/ml e 10mg/ml. Durante o experimento foi preparada uma solução estoque de 10 mg/ml do extrato com álcool etílico absoluto e água destilada na proporção de 1:1, a partir da qual foram realizadas as diluições das outras concentrações testadas.

Avaliação do potencial antimicrobiano

Os fios de sutura foram divididos em fragmentos de 1 cm, utilizando luvas, tesouras e pinças estéreis, totalizando 63 fragmentos divididos em grupos conforme demonstrado na tabela 1.

Para a formação do biofilme, os inóculos foram diluídos 1:100 em caldo TSB (para as bactérias e CMCO) e Sabourad (para as leveduras) e os fragmentos de fio de sutura depositados nos tubos tipo Falcon com 1 ml dos inóculos diluídos. Estes tubos foram incubados por 24 horas para as bactérias e CMCO e 48 horas para as leveduras, em 37°C. Para as bactérias e CMCO, a troca de meio de cultura líquido foi realizada a cada 24 horas e para as leveduras a cada 48 horas.

Após as trocas dos meios de cultura a cada 24 horas durante 96 horas para as bactérias e CMCO, observou-se a formação de biofilme nos fios de seda. Para as leveduras, as trocas foram realizadas a cada 48 horas e a formação do biofilme foi observada após 120 horas de incubação.

Formado o biofilme, os fios de seda a serem tratados com as soluções de própolis foram colocados em novos tubos Falcon estéreis contendo as concentrações estudadas e ficaram em tratamento por 24 horas para as bactérias e CMCO e 48 horas para as leveduras. Após decorrido o tempo de tratamento com a solução hidroalcolica de própolis vermelha, os fios foram colocados em placas Petri com Agar Müller Hinton para verificar se ainda existiam micro-organismos viáveis. Utilizou-se como controle, fragmentos de fio de sutura sem imersão na solução de própolis. Os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS

Obtidos através de método visual, os resultados mostraram a aderência microbiana dos fios de sutura do tipo seda 3-0 previamente contaminados com cepas de duas bactérias, uma cultura mista de cavidade oral e duas leveduras.

A tabela 2 demonstra os resultados encontrados a partir das três concentrações da solução hidroalcoólica de própolis vermelha frente os micro-organismos testados. Observou-se que os grupos controle GC1, GC2 e GC3 que não possuíam micro-organismos, não apresentaram crescimento microbiano, pois tratavam-se dos meios de cultura estéreis, mostrando que não houve contaminação por outros micro-organismos nos fios de sutura. Os grupos controle GC4 a GC8 no qual foram formados biofilmes nos fios de seda apresentaram crescimento microbiano ao serem inoculados nas placas de Petri contendo Agar Müeller Hinton.

Os grupos testes, após a formação do biofilme, entraram em contato com a solução de própolis para avaliação do potencial antimicrobiano. Os grupos teste onde foi utilizada a menor concentração de própolis testada (1mg/ml) apresentaram crescimento microbiano ao serem inoculados em meio sólido.

Os grupos teste onde foram utilizadas as concentrações hidroalcoólicas de própolis com 5mg/ml e 10mg/ml apresentaram inibição de crescimento microbiano.

DISCUSSÃO

Devido à preocupação com a resistência bacteriana, e os efeitos colaterais causados pelo uso indiscriminado de antibióticos, tem se buscado novos agentes antimicrobianos alternativos (Rufato et al., 2018). Nessa perspectiva, o uso de agentes naturais vem sendo estudado para o controle de micro-organismos patogênicos, como nos trabalhos de Alencar et al. (2007) e Meimand et al. (2008), que analisaram a eficácia da própolis vermelha alagoana frente micro-organismos envolvidos com infecções orais.

Terapias anti-infecciosas complementares foram propostas para se minimizar o acúmulo de placa bacteriana em biomateriais (Gazivoda et al., 2015). Soluções orais como digluconato de clorexidina a 0,12% minimizam a aderência bacteriana em fios de sutura multifilamentares, auxiliando no processo de cicatrização e uma menor reação inflamatória. Outro achado, foi a utilização da própolis vermelha, que é composta por material resinoso contendo compostos químicos que atuam no controle microbiano (Banche et al., 2007). Neste estudo buscou-se observar o potencial antimicrobiano da própolis vermelha em fios de sutura do tipo seda.

O uso de antissépticos para o controle da adesão de micro-organismos aos fios de sutura é uma conduta importante, reduzindo os riscos de bacteremia transitória (Rufato et al., 2018). Nesse trabalho, o uso da solução de própolis vermelha do sertão Alagoano apresentou resultados positivos para a redução na contaminação dos fios de sutura, podendo ser um agente redutor de infecções pós-operatórias.

Segundo De Castro et al. (2015) e Da Cruz et al. (2017), a ação antimicrobiana do extrato etanólico de própolis vermelha com concentração de 1 mg/ml frente *Staphylococcus aureus*, bactéria Gram-positiva com largo espectro de patogenicidade, foi eficaz após 24 horas de tratamento. Esse resultado difere do encontrado nesse estudo onde não foi observado inibição do crescimento de nenhum dos micro-organismos testados na concentração de

1 mg/ml nos fios de sutura expostos ao extrato de própolis vermelha alagoana. Neste estudo identificou-se resultado semelhante para a mesma bactéria apenas nas concentrações de 5 mg/ml e 10 mg/ml. Divergência essa que pode ser justificada pela diferença de compostos fitoquímicos encontrados na própolis relacionada a área geográfica de onde a mesma foi coletada.

Vargas e colaboradores (2004) avaliaram *in vitro* o potencial antimicrobiano do extrato etanólico da própolis vermelha frente *E.coli*, patógeno Gram-negativo pertencente à microbiota do trato gastrointestinal e que pode ser encontrada na cavidade oral, encontraram resistência dessa espécie ao extrato testado. Resultado divergente do estudo de Bankova e colaboradores (1995), onde a solução etanólica de própolis vermelha apresentou inibição de *E.coli* com CIM de 5 mg/ml, corroborando com o que foi encontrado nesse estudo.

A atividade antimicrobiana da própolis vermelha pode se explicada pela presença de compostos químicos como fenólicos e flavonoides, onde quanto mais compostos, maior será o grau de inibição (Cabral et al., 2012). Em relação aos micro-organismos testados, não houve diferença entre as bactérias gram-positivas ou gram-negativas, já que ambas não apresentaram crescimento com a solução de própolis na mesma concentração. Estes resultados mostraram-se divergentes ao estudo de Bispo júnior e colaboradores (2018), onde foram encontradas CIM distintas entre *E. coli* e *S. aureus* sendo menores para os Gram-positivos e com maiores efeitos antimicrobianos (Sena-Lopes et al., 2018; Bispo et al., 2018).

Em relação ao potencial antifúngico no combate de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, Siqueira e colaboradores (2015) em seu estudo, utilizaram extrato acetanólico de própolis vermelha Alagoana e encontraram CIM de 5 mg/ml o que se mostrou equivalente a esse estudo que utilizou extrato etanólico.

Lima e colaboradores (2014) em seu estudo evidenciaram a eficácia da clorexidina 0,12%, utilizada para bochechos pós cirúrgicos, já que trata-se de uma solução bactericida que atua na diminuição da placa bacteriana. Entretanto foram observados efeitos adversos quanto ao uso da clorexidina 0,12% na cavidade oral, como pigmentação e alteração de paladar. Por este motivo, outras substâncias estão sendo testadas como agente antiplaca o que corroboram com o presente estudo, onde a própolis vermelha foi avaliada e demonstrou resultados satisfatórios no fio de seda.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a solução do extrato etanólico de própolis vermelha mostrou-se eficaz no combate aos micro-organismos utilizados neste estudo.

Porém se faz necessário novos estudos que avaliem mecanismos de liberação lenta em fios de sutura contendo a solução de própolis vermelha alagoana *in vivo* para se avaliar o real potencial desse composto em reduzir ao máximo a contaminação do material de síntese, favorecendo a cicatrização das feridas cirúrgicas e redução de infecções pós-operatórias.

REFERÊNCIAS

Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JÁ, et al (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 113(2): 278-83. DOI:10.1016/j.jep.2007.06.005.

Araujo RJ, Oliveira LC, Hanna LM, Corrêa AM, Carvalho AM, Alvares NC (2009). Perceptions and actions of oral care performed by nursing teams in intensive care units. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 21(1):388-44. DOI.org/10.1590/S0103-507X2009000100006.

Banche G, Roana J, Mandras N, Amasio M, Galesio C, Allizond V, et al (2007). Microbial adherence an various intraoral suture materials in patients undergoing dental surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 65(8):1503-7. DOI.org/10.1016/j.joms.2006.10.066.

Bankova V, Christov R, Kujungiev A, Marcucci MC, Popov S (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforsch C* 50(3-4):167-172. DOI:10.1515/znc-1995-3-402.

Bispo Junior W, Miranda EO, Alvino V, Araujo B, Silva DW, Porfirio Z (2012). Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, *Revista Brasileira de Ciências Biológicas e da Saúde* 33(1):03-10. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0367.2012v33n1p3>.

Brendan D, Masini BD, Stinner DJ, Waterman SM, Wenke JC (2010). Bacterial Adherence to Suture Materials. *Journal of Surgical Education*. 2011 mar. 68(2): 101-4. Doi: 10.1016/j.jsurg.2010.09.015. Epub 20.

Bucci M, Borgoonova Um, Bianch A, Zanellato UM, Re D (2016). Microbiological analysis of bacterial plaque on three different theards in oral sugery. *Minerva Stomatologica* 66(1): 28-34. doi: 10.23736/S0926-4970.16.03966-7. Epub 2016 Sep 1.

Cabral ISR, Oldoni TLC, Alencar SM, Rosalen PL, Ikegaki M. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12) (2012). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 48(3): 557- 64. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502012000300023>

Da Cruz Almeida ET, da Silva MCD, Oliveira JMDS, Kamiya RU, Arruda REDS, Vieira DA, et al (2017). Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 7(5):280-287. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.03.004>

De Castro Neto O et al (2015). Oral bacteria adherence to suture threads: *in vitro* study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 19(3):275-80. Doi: 10.1007/s10006-015-0487-4. Epub 25.

Edmiston CE, Seabrook GR, Goheen MP, Krepel CJ, Johnson CP, Lewis BD, et al (2006). Bacterial Adherence to Surgical Sutures: Can Antibacterial-Coated Sutures Reduce the Risk of Microbial Contamination? *American College of Surgeons* 203(4):483-89. DOI:10.1016/j.jamcollsurg.2006.06.026

Gazivoda D, Pelemis D, Vujaskovic G (2015). A clinical study on the influence of suturing material on oral wound healing. *Vojnosanit Pregl* 75(9):765-69. <http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx/ft.aspx?id=0042-84501500064G>

Gonsales, GZ. et al (2006). Antibacterial Activity of Propolis Collected in Different Regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 12(2): 276-274. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992006000200009>.

Lima EF, Lima JB, Alves RL, Rocha MMNP, Rego RD, Pereira SLS (2014). Clinical evaluation of the effect of mouthwashes containing 0.12% Chlorhexidine Digluconate with and without Xilitol on sutures contamination. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde* 16(1): 59-66. DOI 10.1007/s00784-016-1713-7.

Lovino F, et al (2017). Suture thread check test for detection of surgical site contamination: a prospective study. *Journal of Surgical Research* 220: 268-74. Doi: 10.1016/j.jss.2017.07.029.

Rafetto LK, Synan W (2012). Surgical management of third molars. *Atlas of The Oral and Maxillofacial Surgery Clinics and North America* 20(2):197-223. Doi: 10.1016/j.cxom.2012.07.002

Rufatto LC, et al (2018). Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiological Research*. 214: 74-82. doi: 10.1016/j.micres.2018.05.003.

Sena-Lopes A, et al (2018). Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PLoS ONE* 13(2): 191-197. Doi: 10.1371/journal.pone.0191797. eCollection 2018.

Siqueira ABS, et al (2015). Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of periodontitis. *Brazilian Oral Research* 29(1):1-6. Doi: 10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0083.

Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, da Costa MM, Sá e Silva M, Viana LR (2004). Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. *Ciência Rural* 34(1): 159-163. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000100024>

TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais

Grupos controle (GC)	
GC 1	Fio de sutura + Meio de cultura estéril + tratamento SPV 1mg/ml
GC 2	Fio de sutura + Meio de cultura estéril + tratamento SPV 5 mg/ml
GC 3	Fio de sutura + Meio de cultura estéril + tratamento SPV 10 mg/ml
GC 4	Fio de sutura + Inóculo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (sem tratamento SPV)
GC 5	Fio de sutura + Inóculo <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (sem tratamento SPV)
GC 6	Fio de sutura + Inóculo <i>Candida albicans</i> URM 6547 (sem tratamento SPV)
GC 7	Fio de sutura + Inóculo <i>Candida tropicalis</i> URM 6947 (sem tratamento SPV)
GC 8	Fio de sutura + Inóculo CMCO (sem tratamento SPV)
Grupos teste (GT)	
GT1	Fio de sutura + Inóculo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 + tratamento SPV 1mg/ml
GT2	Fio de sutura + Inóculo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 + tratamento SPV 5mg/ml
GT3	Fio de sutura + Inóculo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 + tratamento SPV 10mg/ml
GT4	Fio de sutura + Inóculo <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 + tratamento SPV 1mg/ml
GT5	Fio de sutura + Inóculo <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 + tratamento SPV 5mg/ml
GT6	Fio de sutura + Inóculo <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 + tratamento SPV 10 mg/ml
GT7	Fio de sutura + Inóculo CMCO + tratamento SPV 1mg/ml
GT8	Fio de sutura + Inóculo CMCO + tratamento SPV 5mg/ml
GT9	Fio de sutura + Inóculo CMCO + tratamento SPV 10mg/ml
GT10	Fio de sutura + Inóculo <i>Candida albicans</i> URM 6547 + tratamento SPV 1mg/ml
GT11	Fio de sutura + Inóculo <i>Candida albicans</i> URM 6547 + tratamento SPV 5mg/ml
GT12	Fio de sutura + Inóculo <i>Candida albicans</i> URM 6547 + tratamento SPV 10mg/ml
GT13	Fio de sutura + Inóculo <i>Candida tropicalis</i> URM 6947 + tratamento SPV 1mg/ml
GT14	Fio de sutura + Inóculo <i>Candida tropicalis</i> URM 6947 + tratamento SPV 5mg/ml
GT15	Fio de sutura + Inóculo <i>Candida tropicalis</i> URM 6947 + tratamento SPV 10mg/ml

SPV= solução de própolis vermelha.

Tabela 2: Resultados da solução de própolis vermelha frente os fios de sutura contaminados

Grupo	Crescimento microbiano
GC1	Não
GC2	Não
GC3	Não
GC4	Sim
CG5	Sim
CG6	Sim
CG7	Sim
GC8	Sim
GT1	Sim
GT2	Não
GT3	Não
GT4	Sim
GT5	Não
GT6	Não
GT7	Sim
GT8	Não
GT9	Não
GT10	Sim
GT11	Não
GT12	Não
GT13	Sim
GT14	Não
GT15	Não