



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



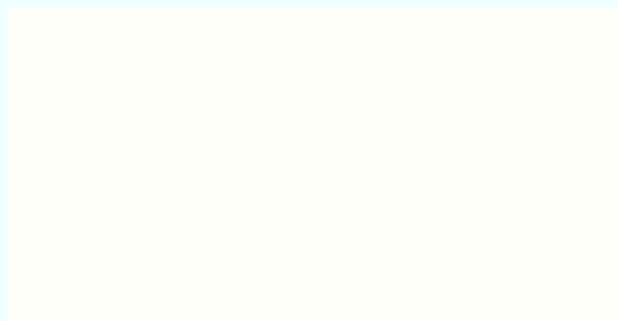
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno: Bruno Bueno Silva

Orientador: Prof. Dr. Pedro L. Rosalen

Ano de Conclusão do Curso: 2005





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



Bruno Bueno Silva

**Atividade biológica da própolis no controle da microbiota
oral - Revisão**

Monografia apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas –
UNICAMP, como Trabalho de
Conclusão do Curso de Graduação
em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro L. Rosalen

TCC 193

Piracicaba
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

Agradecimentos

Agradeço à Deus por ter me dado o dom da vida.

Agradeço a minha família pelo apoio dado em todos os momentos da minha vida

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen pelo apoio, orientação e exemplo de profissionalismo na carreira acadêmica,

Aos funcionários da FOP-Unicamp, especialmente à Eliane, Elisa, José Carlos, Alfredo, Waldomiro, que tanto contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho,

Ao digníssimo diretor da Fop-Unicamp, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho

Sumário

1. Introdução	04
2. Bibliografia	11

1. Introdução:

A cárie dental e a doença periodontal são os principais indicativos que determinam o estado fisiopatológico da cavidade bucal de um ser humano (HOROWITZ, 2004)

Um dos fatores etiológicos mais importantes das doenças cárie e gengivite são os microrganismos de origem bacteriana que formam um biofilme patogênico que se adere sobre a superfície dental, de modo a produzir ácidos e produtos citotóxicos que levam, respectivamente, a desmineralização do esmalte dental e/ou inflamação gengival. O biofilme dental bacteriano que se forma sobre a superfície do dente apresenta uma composição bacteriana e bioquímica variável dependendo de fatores intrínsecos e extrínsecos, podendo mudar de modo a tornar este biofilme patogênico (MARSH, 2005).

Na prevenção das doenças orais, tem sido observado mundialmente um crescente uso de produtos naturais, os quais têm sido grandes instrumentos científicos para decifrar a lógica e as estruturas para a descoberta de novas drogas para uso como agentes inovadores e alternativos na terapêutica de doenças de alta prevalência e morbidade como infecções, câncer, imunodeficiências etc (Clardy & walsh, 2004), devido as suas diversas propriedades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória (PARK et al., 2000), cicatrizante, anestésica (BANKOVA et al., 1989,; GREENWAY et al., 1990), anti-tumoral (Banskota et al., 2000; Kimoto et al., 1998) e anticariogênica (PARK et al. 1998a; PARK et al., 1998b; KOO et al. 1999; KOO et al., 2000^a; KOO et al., 2000b; KOO et al., 2000c; Koo et al., 2002; Koo et al., 2003; Rosalen et al., 2004; Paulino et al., 2003).

O valor dos produtos naturais é claramente reconhecido na descoberta de novos compostos bioativos, uma vez que 28% das novas drogas aprovadas desde 1983 até 1994 pelo Food and Drug Administration (FDA) ou entidade compatível em outros procedem inteiramente de produtos naturais, 39% são derivados de produtos naturais e 33% são drogas de origem sintética (Newman et al., 2003). Entre os produtos naturais, a própolis, uma substância resinosa não tóxica, coletada de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exudatos resinosos por abelhas africanizadas *Apis Mellifera* para proteção de suas colméias, tem sido empregada popularmente como agente terapêutico na medicina alternativa. Entretanto, a própolis está registrada no Brasil como produto de origem animal para consumo alimentar (BRASIL, 1950), classificada como GRAS – Generally Recognized As Safe (FDA, 1988), nos EUA e no Japão é classificada como Alimento funcional (Jetro 2003).

A própolis tem atraído interesse científico devido à descoberta de novas drogas e patentes como o CAPE, Artepelim C, Apigenina, tt-Farmesol e outros. Desde 1965, por ocasião da primeira patente de própolis, já foram registrados 239 patentes internacionais envolvendo exclusivamente a própolis, sendo que dessas, 43% são de própolis brasileiras patenteadas pelo Japão (Pereira et al., 2003). Como exemplos, podemos citar três patentes japonesas utilizando própolis brasileiras: a de isolamento do composto antitumoral – Artepelim C (3,5-diprenil-4-ácido hidroxicinâmico) proveniente da própolis brasileira; a patente de aplicação do Artepelim C isolado e/ou seu sal como agente controlador do processo de apoptose (Kimoto et al., 1998); e a patente de processo de obtenção de extrato de própolis desodorizado (Shibuya et al., 2000). Este fato demonstra a importância da

própolis brasileira, o que é devido, principalmente, a grande biodiversidade de vegetais para a retirada de resinas pelas abelhas.

Em função disso, uma extensa análise da própolis brasileira, devido a sua biodiversidade geográfica, vegetal e química, diferentemente das demais de origem americana, asiática e européia, foi realizada englobando as regiões Sudeste, Sul, Centro Oeste e alguns estados do Nordeste, sendo coletadas ao todo 500 amostras de própolis. Após o processamento e análise quanto a aparência e coloração dos extratos, o espectro de absorção na região do UV-visível e o perfil da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ambas em fase reversa, foi possível classificar a própolis brasileira em 12 grupos, com base no seu complexo perfil químico (Park et al., 2000), sendo que os grupos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram os grupos 3 (região sul); 6 (região litorânea da Bahia); e 12 (região sudeste).

As própolis do grupo 3, cuja origem botânica é a planta *Populus sp.*(álamo), caracterizam-se pela predominância de flavonóides agliconas (pinobanksin, pinocembrin, pinobanksin 3-acetato

chrysin, galangin), compostos aromáticos (metil hidrocinâmico; metil cinâmico; 1,4-methanonaphthalen-9-ol; ácido ferúlico,o éster do ácido dimetil dialil caféico), terpenóides (eudesmol). Esta própolis demonstrou excelente atividade antimicrobiana contra estreptococos do grupo mutans. Esse microrganismo é o principal patógeno da placa dental bacteriana ou biofilme, produtor de ácidos e de enzimas glicosiltransferases (GTF) responsáveis pela formação de polissacarídeos importantes para a adesão e formação da matriz do biofilme sobre a superfície dental a partir de sacarose da dieta (Bowen 2002). Esta própolis foi capaz de inibir

as atividades das GTFs B (produtora de glucanos insolúveis) com ligações $\alpha(1-3)$ e C (produtora de glucanos solúveis e insolúveis) com ligações $\alpha(1-3)$ e ligações $\alpha(1-6)$ aderidas à superfície de hidroxiapatita (Koo et al., 2000), o que extremamente importante pois a maioria dos agentes antimicrobianos comercializados são incapazes de produzir significativa redução na atividade dessas enzimas (Wunder & BOWEN, 1999) e ela também reduziu a produção de ácido no biofilme bacteriano oral, por inibição irreversível da enzima de membrana F-ATPase responsável pela manutenção do pH interno do citoplasma microbiano (Hayacibara 2005). Além desses efeitos sobre o biofilme dental, essa própolis produziu a redução da cárie dental em ratos dessalivados, sendo que a própolis do grupo 3 mostrou os menores índices de cárie de superfície e de sulco, bem como menor severidade de cárie (Koo et al., 1999) e redução de 44,7% do índice de placa supra-gengival em experimento clínico onde os voluntários utilizaram um bochecho contendo própolis do grupo 3 que poderia reduzir o acúmulo de placa. Além disso, o enxaguatório bucal reduziu em 61,7% o índice de polissacarídeos insolúveis presentes na placa dental (Koo et al., 2002).

Outro estudo conduzido com o mesmo tipo de própolis proveniente da Bulgária (Paulino et al., 2003), confirmou e ampliou o conhecimento sobre o efeito analgésico do extrato etanólico dessa própolis, associando-o às respostas antiinflamatórias obtidas nos modelos por formalina e capsaicina e não a simples irritação das terminações nervosas em animais. Em acréscimo, esse mesmo estudo demonstrou a inibição da contração da musculatura da traquéia induzida por histamina, capsaicina, KCl e carbacol em animal. Essa mesma própolis, assim como as do tipo 12, são reconhecidas na literatura por apresentarem elevado

potencial antioxidante demonstrado nos testes de formação de radicais livre por DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e nos testes de branqueamento β -caroteno, sendo esta atividade relacionada à presença de flavonóides e outros compostos polifenólicos poliprenilados (Park et al., 2000; Kumazawa et al., 2004).

As própolis do grupo 6, cuja origem botânica é a planta *Hyptis divaricata* (alecrim), apresentam uma composição química distinta dos demais grupos, principalmente pela completa ausência de flavonóides, e presença de ácidos graxos, sendo bastante semelhante a própolis da Venezuela (Koo et al., 2000b), caracterizada pela presença de benzofenonas poliprenilados (Tomás-Barberán et al., 1993). Este foi o grupo que exibiu as maiores atividades contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e *Streptococcus mutans*, especialmente contra os fatores de virulência como aderência, inibição da produção de ácido e da enzima glucosiltransferase, além da alteração da matriz do biofilme bacteriano oral (Duarte et al., 2003). A descoberta de ácidos graxos neste grupo de própolis com composição química predominante passou a chamar a atenção para outras atividades farmacológicas, como a atividade anticâncer, a qual foi testada no laboratório para estudos de câncer da University of North Caroline (Chapel Hill, EUA) tendo apresentado mais de 50% de inibição do crescimento celular em 4 linhagens de células tumorais (carcinoma nasofaríngeal, adenocarcinoma ileocecal, carcinoma renal e adenocarcinoma de mama) (Park et al., 2000).

As própolis do grupo 12, cuja origem botânica é a planta *Baccharis dracunculifolia*, proveniente da região sudeste representando quase a totalidade da exportação brasileira de própolis e caracterizam-se quimicamente pela presença de artepelim C, uma nova nova molécula patenteada recentemente

(Kimoto et al., 1998). Além disso, essa própolis possui uma variedade de compostos fenólicos como flavonóides, ácidos fenólicos, derivados dos ácidos cinâmicos e poliprenilados. As própolis com este perfil químico foram exaustivamente estudadas demonstrando atividades biológicas no controle do biofilme oral, entretanto com efetividade menor que a própolis do tipo 3 (Koo et al., 1998), atividade antioxidante (Park et al., 2000) e anti-tumoral (Matsuno et al., 1997). Santos et al., 2002 demonstrou a atividade antibacteriana da própolis G12 e suas frações contra várias bactérias anaeróbicas orais, incluindo *A.actinomycetemcomitans*, *E.nucleatum*, *P.gingivalis* e *P intermédia*, espécies frequentemente associadas com doença periodontal.

O alto valor agregado do extrato alcoólico da própolis tipo 12 no mercado japonês pode justificar em parte o interesse pela própolis brasileira, sendo hoje a terceira maior produção mundial, correspondendo a cerca de US\$ 300 milhões/ano respondendo por 80% da demanda do mercado naquele país (Martins et al., 2002). Dois pontos se destacam na preferência japonesa pela própolis brasileira, além das propriedades farmacológicas: o primeiro em relação às suas características organolépticas e em segundo devido ao menor teor de metais pesados (Pereira et al., 2002).

Recentemente, foram explorados os efeitos de 30 substâncias identificadas na própolis sobre a atividade de GTFs e viabilidade de estreptococos do grupo mutans, sendo que dois compostos apresentaram atividades biológicas distintas e foram identificados potencialmente como novos agentes anticárie e antiplaca (Koo et al., 2002, 2003).

Um desses agentes é a apigenina (4',5,7-trihydroxyflavone), uma bioflavona não tóxica encontrada comumente em vegetais e frutas (Sampson et al., 2002),

um potente inibidor de GTFs, reduzindo 90,5 a 95% da atividade dessas enzimas testadas em solução (Koo et al., 2002), virtualmente sem atividade antibacteriana contra estreptococos do grupo mutans, com capacidade de inibir a produção de ácidos irreversivelmente, assim como, a atividade extrusora de prótons de H⁺-ATPases de estreptococos do grupo mutans (Koo et al., 2003; Rosalen et al., 2004; Duarte et al., 2005).

O outro agente, o tt-Farnesol (3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol), é um sesquiterpeno muito usado em perfumes e comumente encontrado em frutas cítricas (Choi et al., 2001), que afeta o crescimento (atividade bacteriostática), e o metabolismo de estreptococos do grupo mutans (reduzindo 1 log no número de CFU por mililitro) e conseqüentemente a virulência do biofilme oral (Koo et al., 2002). Por sua característica lipofílica, o tt-Farnesol atua sobre a membrana bacteriana causando ruptura e influenciando a permeabilidade de prótons de estreptococos do grupo mutans em biofilme, entretanto, o mecanismo ainda é desconhecido (Koo et al., 2002; Rosalen et al., 2004).

Os resultados obtidos até o momento confirmam a atividade promissora da própolis e de seus compostos bioativos, especialmente no controle do biofilme dental (Farré et al., 2004), gerando interesse em novas descobertas. Embora a biodiversidade da própolis brasileira propicie a descoberta de novas drogas, é complexo se definir exatamente o seu princípio ativo ou biomarcador(es) que a identifique como um fitoterápico ou opoterápico. Entretanto, a própolis certamente é uma fonte natural de novas moléculas biologicamente ativas, em especial a brasileira, que merece ser explorada cientificamente em detalhes usando técnicas genômicas e proteômicas, que decifrem as bases fisiológicas e químicas pelas quais interagem com os organismos na promoção de saúde.

2. Bibliografia

1. BANKOVA, V.; POPOV, S. MAREKOV, N.L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. *Phytochemistry*, v.28, p.871-873, 1989.
2. BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol*, Limerick, v.72, n.1-2, p.239-246, Sept. 2000.
3. BOWEN, W.H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, Stanford, v.13, n.2, p.126-131, 2002.
4. CLARDY J, WALSH C. Lessons from natural molecules. *Nature*. 2004 Dec 16; 432(7019): 829-37
5. CHOI HS, KONDO Y, SAWAMURA M. Characterization of the odor-active volatiles in citrus Hyuganatsu (*Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka). *J Agric Food Chem*. 2001 May; 49(5): 2404-8.
6. DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and growth and adherence of mutans streptococci. *Biol. Pharm. Bull.*, v.26(4), p.527-531, 2003.
7. GREENWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, v. 71, p. 107-118, 1990
8. HAYACIBARA MF, KOO H, ROSALEN PL, DUARTE S, FRANCO EM, BOWEN WH, IKEGAKI M, CURY JÁ. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol*. 2005 May 20.
9. HOROWITZ, A. M. A report on the NIH Consensus Development Conference on Diagnosis and Management of Dental Caries Throughout Life. *J Dent Res*. 2004;83 Spec No C:C15-7.
10. KIMOTO T, ARAI S, KOHGUCHI M, AGA M, NOMURA Y, MICALLEF MJ, KURIMOTO M, MITO K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev*. 1998; 22(6): 506-15
11. KOO, H.; HAYACIBARA, M. F.; SCHOBEL, B.D.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; PARK, Y.K.; VACCA-SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and t-farnesol. *J. Antimicrob. Chemother*, v.52, p. 782-789, 2003.
12. KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.B.; PARK, Y.K.; CURY, J.A. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. *Arch. Oral Biol.*, v.45, p.141-148, 2000a.
13. KOO, H.; VACCA SMITH, A.M.; BOWEN, W.H.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; PARK, Y.K. Effect of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res.*, v.34, p. 418-26, 2000b.
14. KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; AMBROSANO, G.M.B.; MURATA, R.M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; PARK, Y.K.. Effect of a new

- variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Cur. Microbiol.*, v.41, p. 192-196, 2000c
15. KOO, H.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res.*, v.33, p.393-400, 1999.
 16. KOO, H.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res.*, v.33, p.393-400, 1999.
 17. KUMAZAWA S;AHN MR,HAMASAKA T,BANG KS,NAKAYAMA T Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem.* 2004 Dec 1; 52(24): 7286-92.
 18. MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* May-Jun; 38(3): 204-11, 2004
 19. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, 66: 1022-1037, 2003
 20. MATSUNO, T. et al. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepin C) isolated from propolis. *Anticancer Res.*, v.17, n.5a, p.3565-3568, Sept/oct. 1997
 21. MARTINS RS,PEREIRA ES JR,LIMA SM,SENNÁ MI,MESQUITA RA,SANTOS VR. Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci.* 2002 Mar; 44(1): 41-8.
 22. PAULINO N,DANTAS AP,BANKOVA V, LONGHI DT, SCREMIN A, DE CASTRO SL,CALIXTO JB. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *J Pharmacol Sci.* 2003 Nov; 93(3): 307-13
 23. PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico- químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, v.58, n.9, p.2-7, 2000.
 24. PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; WANG, SH.K.; BASTOW, K.; COSENTINO, M.; LEE, K.H. Determinação das atividades citotóxicas e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletados em regiões do Brasil. *Mensagem Doce*, v.56, p.2-5, 2000.
 25. PARK, Y.K.; KOO, M.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ABREU, J.A.S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Cur. Microbiol.*, v.34, p.24-28, 1998a.
 26. PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, no.9, p 2502-2506, 2002
 27. PARK, Y.K.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. & ROSALEN, P.L. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. *Rev. Microbiol.*, v.29, p. 143-148, 1998b.
 28. PEREIRA N. Biotech Patenting--EuroLegal Conference. 26-27 February 2003, London, UK. *IDrugs*. 2003 Apr; 6(4): 340-4

29. SANTOS FA,BASTOS EM,UZEDA M,CARVALHO MA,FARIAS LM,MOREIRA ES,BRAGA FC. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. J Ethnopharmacol. 2002 Apr; 80(1): 1-7
30. TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry, Oxford, v.34, n.1, p.191-196, 1993.
31. Wunder D.; Bowen, W. H. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. Arch. Oral Biol. 44:203-214, 1999.