

Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária - avaliação ultra-estrutural*

CLEUSA APARECIDA CAMPANINI GERALDINI**, ELIZABETH GODOY CEZAR SALGADO***, SIGMAR DE MELLO RODE****

RESUMO

A própolis é um produto natural, coletado pelas abelhas, dos brotos de árvores, flores e pólen e conhecida por suas propriedades biológicas: atividade antibacteriana, anti-inflamatória, cicatrizante, fúngica, etc. Neste trabalho avaliou-se *in vitro* o extrato etanólico de própolis na superfície dentinária de 15 dentes divididos em cinco grupos. Com instrumento diamantado removeu-se o esmalte e, com brocas carbide, cilíndricas lisas nº 56, cortou-se aproximadamente 1mm de dentina, em alta rotação sob abundante refrigeração ar/água, para produzir a camada de esfregaço. Em seguida estas superfícies foram tratadas com diferentes concentrações etanólicas de própolis e com etanol 70% puro, utilizando-se bolinhas de algodão estéril para aplicação de cada substância, esfregando-a por 30 segundos, considerando-se como controle onde foi apenas utilizado o *spray* água/ar. Os espécimes, após serem lavados com água e secos, foram fixados em um posicionador metálico, metalizados com ouro e avaliados em microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que, morfologicamente, as soluções estudadas, quando comparadas ao grupo controle, removeram parte da camada de esfregaço, sem expor os túbulos dentinários. O extrato etanólico de própolis a 10% promoveu uma camada regular cobrindo a superfície dentinária e a 20% e 30% apresentou partículas com formas esferoidais de vários tamanhos que ficaram sobrepostas ao esfregaço dentinário, o qual se apresentava re-

gular e com poucos detritos, sugerindo ação de limpeza das substâncias utilizadas.

UNITERMOS

Camada de esfregaço dentinário; dentina; própolis; microscopia eletrônica de varredura.

GERALDINI, C.A.C.; SALGADO, E.G.C.; RODE, S.M. Application of própolis solutions on dental surface: scanning electron microscopy evaluation. **Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v.3, n.2, jul./dez. p., 2000.

ABSTRACT

The propolis is a natural product, collected by the bees, of the sprouts of trees flowers and pollen and known by its biological properties: antibacterial activity, anti-inflammatory activity, healing, anti-fungal activity, etc. In this in vitro research the extract of ethyl alcohol propolis was evaluated as a cleaning agent of the dentinal surface of 15 teeth divided in five groups. With diamond instrument the enamel was removed and with nº 56 flat end fissure carbide burs, it was cut approximately 1mm

* Resumo da Dissertação de Mestrado - Área de Concentração em Prótese Bucomaxilofacial - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP - 12245-000 - SP.

** Aluna do curso de Pós-Graduação, Área de Concentração em Prótese Bucomaxilofacial, (Nível Doutorado) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP - 12245-000 - SP.

*** Mestre em Ciências pelo Departamento de Engenharia Mecânica do Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA.

**** Depto de Materiais Odontológicos e Prótese - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP - 12245-000 - SP.

dentine, in high rotation under continuous refrigeration water/air, to produce a smear-layer. These surfaces were treated with different concentrations of ethyl alcohol propolis and with pure ethyl alcohol 70%, being used sterile cotton pellets for application of each substance scrubbing it for 30 seconds, being considered as control where was just used the spray water/air. The specimens, after washing with water and drying, were fastened in a metallic support, gold sputtered and evaluated with scanning electron microscopy. It was observed that, morphologically, the studied solutions, when compared to the control group, removed part of the smear-layer, without exposing the dentinal tubules. The extract of propolis with ethyl alcohol at 10% promoted a regular covering layer on the dentinal surface. Concentrations at 20% and 30% presented spherical particles with several sizes that were located upon the regular smear-layer, and with few debris, suggesting a cleaning action of the used substances.

UNITERMS

Dentin; Smear-layer; Propolis; Scanning electron microscopy.

INTRODUÇÃO

Na história da medicina popular a própolis pode ser considerada como um dos mais eficientes medicamentos naturais descobertos. A importância dessa medicina alternativa é extremamente relevante no Brasil, principalmente porque sua zona rural é bastante extensa e muito rica no tocante às propriedades farmacológicas de sua variada flora.

A utilização da própolis na medicina popular é anterior à época do Egito antigo. Aristóteles, no seu livro “Catálogo Animal”, a registrou como medicamento para tratamento de abscessos e feridas, ou seja, usado para prevenção das infecções¹⁹. A origem da palavra própolis é grega, com o significado *pró*= defesa e *polis*= cidade, que combinados significam defesa da cidade, ou seja, da colméia, que por vezes abriga dezenas de milhares de abelhas.

A própolis é empregada pelas abelhas no reparo de frestas ou danos à colméia, e no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha. É uma resina viscosa constituída basicamente por uma mistura de resina das cascas e dos brotos de árvores, com a seiva das flores, saliva das abelhas, cera e pólen¹⁹. As variações na composição são determinadas principalmente pela flora da área ecológica, pelos ciclos evolutivos das plantas provedoras de resinas, pelos microorganismos

presentes em torno da região e fatores climatológicos¹⁴. O tipo de vegetação da região de onde a própolis foi retirada, é o que determinaria maior ou menor teor de flavonóides totais, da mesma forma a sua qualidade. Segundo Matsuno¹⁹(1997), pode-se dizer, que a composição da própolis é de 50 a 55% de resinas, 30% de cera de mel, 8 a 10% de óleos essenciais e 5% de pólen, e além disso é também encontrada uma pequena quantidade de ácidos graxos, ácidos orgânicos, amino-ácidos e vitaminas.

A própolis possui funções biológicas tais como bactericida, bacteriostática, antiviral, fungicida, fungistática, antiflogística, antialérgica, bioestimuladora, dermatoplástica e anestésica local⁴, atividade citotóxica, cicatrizante do tecido ósseo, tecido cartilaginoso, polpa dental entre outros^{17,18}. Scheller et al.²³ (1977) constataram que a atividade antibiótica da própolis não é exercida por uma fração química do produto, mas pelo conjunto dos componentes.

Do ponto de vista farmacológico, a própolis tem sido empregada na forma sólida¹⁶; na forma de unguento à base de vaselina, lanolina, manteiga, azeite de oliva, ou extrato óleo-alcoólico²¹; na forma de extrato alcoólico¹³; e extrato hidro-alcoólico¹². A proporção própolis/veículo pode variar, para que se obtenha resultados bacteriostáticos ou bactericidas²⁵.

Na Odontologia tem se estudado a ação da própolis em algumas situações como: gengivites, periodontites e GUNA^{5,8}; aftas^{7,15}; mumificação pulpar em dentes de cães²⁴; e cárie dental em ratos¹¹.

Observando-se as excelentes propriedades da própolis na colméia e tendo em vista inúmeros relatos sobre a aplicação clínica da própolis na área médica e odontológica, a selecionamos para iniciarmos estudos experimentais, *in vitro*, de aplicação do produto na superfície dentinária.

MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionados 15 coroas de dentes molares íntegros, que foram seccionadas ao meio, no sentido mesio distal, com disco de carborundum em peça de mão. Após a remoção do esmalte da porção vestibular e lingual dos fragmentos da co-

roa, com instrumento rotatório de carbide cilíndrico liso nº 56, da KG Sorensen, cortou-se por 30 segundos aproximadamente 1mm de dentina em alta rotação e abundante refrigeração ar/água, produzindo assim uma camada de esfregaço dentinário, em ambas as faces, sendo utilizada uma broca para cada dente, de acordo com o preconizado por Araújo et al¹(1997).

A própolis foi obtida de colméias localizadas na região de Bauru, Estado de São Paulo. Após a limpeza da própolis, preparou-se o extrato diluindo em etanol a 70^o G.L.

Os dentes foram divididos aleatoriamente em grupos de três, nos quais nas superfícies dentiná-

rias se fez uso de bolinha de algodão estéril para aplicação das soluções por 30 segundos. Após o tratamento, todos os dentes foram lavados com spray ar/água e secos com jatos de ar livres de impurezas e armazenados em recipiente estéril.

Após a metalização (Sputter Coater, Balzer SCD 50), os corpos de prova foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura (modelo DSM 950-ZEISS), do Centro Técnico Aeroespacial - CTA em São José dos Campos, com aumentos originais que variavam de quinhentas a quatro mil vezes. Eletronmicrografias foram obtidas para análise morfológica comparativa dos espécimes.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos segundo o tratamento superficial dentinário e a concentração da solução

GRUPO	TRATAMENTO SUPERFICIAL DENTINÁRIO	CONCENTRAÇÃO
G1	Sem tratamento superficial (controle)	—————
G2	Etanol	70%
G3	Extrato Etanólico de Própolis (EEP)	10%
G4	Extrato Etanólico de Própolis (EEP)	20%
G5	Extrato Etanólico de Própolis (EEP)	30%

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da própolis estar despertando grande interesse na sociedade nos últimos tempos, ela é utilizada desde a antigüidade.

Na dermatologia há vários relatos de uso da própolis, em forma de pomadas, emplastos, unguentos e em *spray* para facilitar a aplicação⁵. Em soluções, as concentrações, utilizando o álcool como veículo principal, variavam entre 5 a 30%, as quais não foram muito diferentes das que utilizamos em nosso experimento.

O objetivo deste trabalho foi verificar a alteração da morfologia da superfície dentinária na aplicação de soluções de própolis em etanol. Inicialmente utilizamos isoladamente o etanol a 70% para diferenciar do resultado quando associássemos o própolis.

Com relação às soluções utilizadas, pudemos observar que todas promoveram algum tipo de alteração na morfologia da camada superficial de esfregaço dentinário. Boyde et al.²(1963) e Eick

et al.⁶(1970) verificaram uma camada sobre a dentina, composta de substâncias orgânicas e inorgânicas que denominaram de camada de esfregaço. Nossos resultados são concordes com os autores, nas alterações morfológicas ocorridas na dentina do grupo um, controle sem limpeza; verificamos uma camada irregular depositada sobre a superfície, que obstruía a entrada dos túbulos dentinários, chamada de esfregaço dentinário (Figura 1).

Quando do preparo cavitário, os profissionais dispunham de duas opções para limpar a cavidade: a primeira sugeria que a limpeza deveria ser mecânica; e a segunda preconizava que se deveria associar ao método mecânico, um químico com alguma solução, como por exemplo o álcool²².

Brännström & Johnson³(1974) e Gwinnett¹⁰(1984), utilizando etanol, observaram que a dentina permaneceu com esfregaço dentinário e assim, com microrganismos. Nossos resultados do grupo dois, com etanol 70%, são morfológicamente semelhantes aos desses autores (Figura 2).

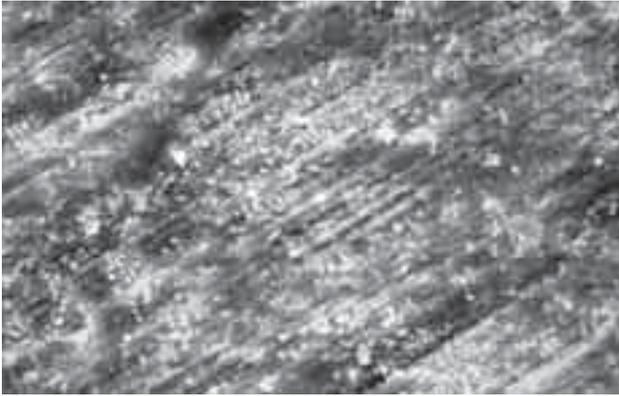


FIGURA 1 - Fotomicrografia mostrando a camada de esfregaço dentinário na superfície da dentina. Riscos paralelos causados pela broca (↔), os detritos (D) e irregularidades (*) da camada de esfregaço 1.000x de aumento original.

Mesmo com a limpeza da cavidade, microorganismos permanecem, principalmente nas camadas mais profundas, sugerindo a necessidade um tratamento químico³; embora Pashley²⁰ (1984) tenha afirmado que a camada de esfregaço dentinário possa agir como um forrador cavitário biológico, reduzindo a permeabilidade dentinária.

Em nossos resultados do grupo três, extrato etanólico de própolis (EEP) a 10%, observamos uma deposição discreta da solução sobre a camada de esfregaço dentinário, mantendo os túbulos obstruídos (Figura 3).

No grupo quatro, com EEP a 20%, foi observada a presença de partículas com formas esferoidais sobre a camada de esfregaço dentinário, de maneira mais evidente, provavelmente devido ao aumento

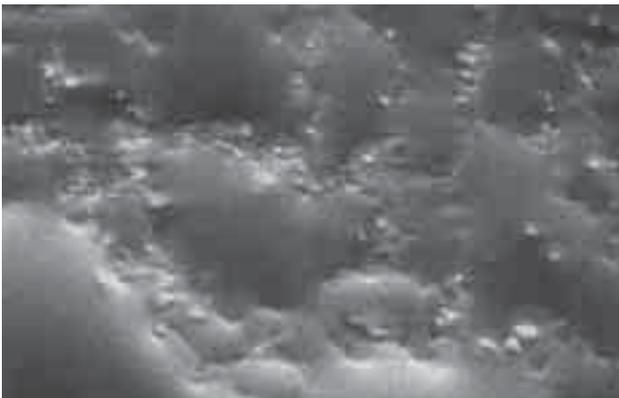


FIGURA 3 - Fotomicrografia mostrando a dentina tratada com extrato etanólico de própolis 10%, observar os detritos (D), e a superfície mais regular que os grupos anteriores, com aumento original de 1.000x.

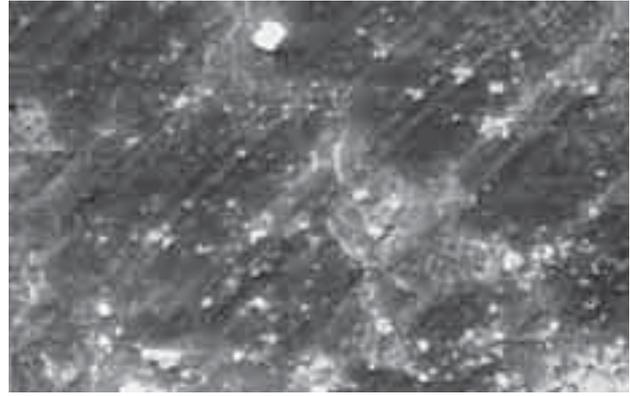


FIGURA 2 - Fotomicrografia mostrando o esfregaço dentinário tratado com etanol 70%. Detritos (D), as irregularidades (*) e riscos causados pela broca (↔), com aumento original de 1.000x.

da concentração. Também não foram observados túbulos abertos (Figura 4), pelo contrário, nossos estudos deste grupo mostraram que as partículas da própolis se depositaram sobre o esfregaço e, talvez, auxiliem na manutenção dos túbulos obstruídos.

No grupo cinco, EEP a 30%, pode-se observar a deposição de uma camada de partículas de formas esferoidais, em maior número que no grupo quatro, e de tamanhos variados sobre o esfregaço dentinário, aparentemente incorporando toda a camada irregular do esfregaço e mantendo obstruídos os túbulos dentinários (Figura 5). Estas partículas de formas esferoidais apresentadas no grupo quatro e cinco, talvez possam ser atribuídas à composição da própolis¹⁷, pois Matsuno¹⁹(1997) mencionou que na composição da própolis, 50 a 55% são resinas.

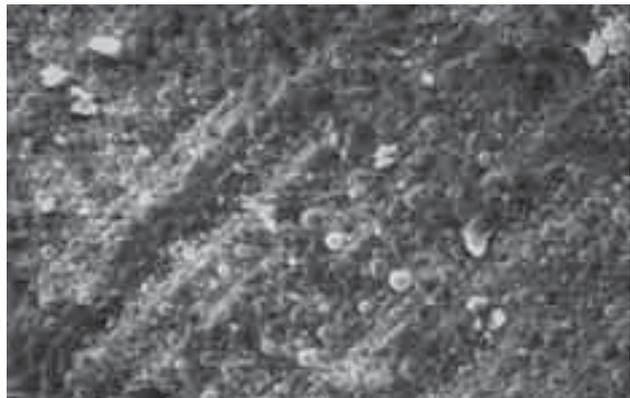


FIGURA 4 - Fotomicrografia mostrando as características da dentina tratada com extrato etanólico de própolis 20%. Riscos da broca (↔), detritos (D) e partículas esferoidais (P), com aumento original de 1.000x.

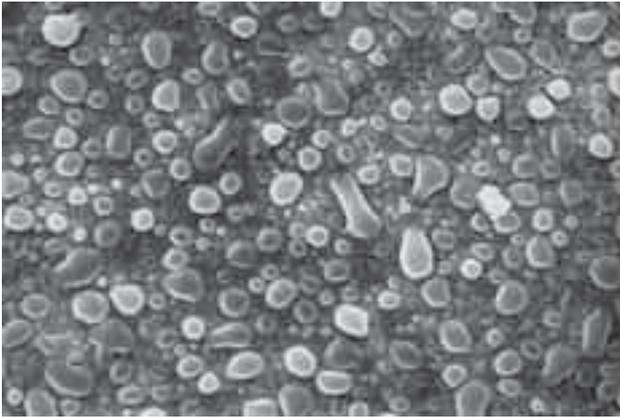


FIGURA 5 - Fotomicrografia mostrando as características da dentina tratada com extrato etanólico de própolis 30%, notar as partículas esferoidais mais ou menos alongadas sugestivas de própolis (P), recobrando quase que toda a camada de esfregaço (E) com poucos detritos (D) com aumento original de 1.000x.

Estudos futuros devem nos informar se a própolis também penetra até os túbulos dentinários, e, ainda mais adiante, verificar o poder de eliminar ou não os microorganismos presentes. Já é um subsídio a avaliação de Ikeno et al.¹¹(1991) das propriedades que a própolis tem de eliminar alguns microorganismos pertencentes à cárie, onde confirmaram a atividade antibacteriana da própolis sobre amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Ainda, a própolis apresenta o poder de inibir a aderência dos microorganismos na superfície dentinária, como demonstraram o estudo, *in vitro*, de Gebara et al.⁹(1996) onde a própolis foi efetiva na inibição da aderência de *S. mutans* e *S. sobrinus*. Ikeno et al.¹¹(1991), quando analisaram a composição da própolis em seu experimento observaram a existência dos ácidos cinâmico e cafeico, que tiveram atividade contra o *S. mutans*. O ácido cinâmico inibiu a atividade da glicosiltransferase, sendo o possível agente ativo na proteção contra a cárie.

Observando a literatura, e levando-se em conta que nossos estudos mostraram que houve uma provável deposição da própolis sobre a superfície dentinária, seria muito satisfatório saber se o esfregaço que ficou abaixo das soluções com própolis, não manteria sua atividade bacteriana. Tendo a própolis as propriedades bactericida e bacteriostática no combate à cárie como já foi demonstrado^{9,11}, é provável que os microorganismos presentes no esfregaço dentinário sejam eliminados pela ação antimicrobiana da própolis. Porém mais estudos seriam necessários para fazermos esta verificação.

A falta de pesquisas nesta área nos deixa sem subsídios para podermos fazer maiores compara-

ções sobre nossos resultados. Scheller et al.²⁴(1978), constataram que aplicação de EEP a 5% em cavidades dentinárias de cães reduz a reação inflamatória. Com base nestes dados acreditamos que a própolis agindo sobre os microorganismos da cavidade dentinária, onde existe uma correlação direta entre a dentina e a polpa, poderá levar clinicamente, a uma resposta pulpar favorável.

Nossos estudos sugerem a necessidade de verificar a penetração do EEP na superfície dentinária e também um estudo *in vivo* para observar se as soluções com EEP interfeririam com uma adesão efetiva à dentina.

CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais deste trabalho podemos concluir que:

- a) as soluções estudadas removeram parte da camada de esfregaço dentinário, sem expor os túbulos dentinários;
- b) o extrato etanólico de própolis 10% apresentou uma camada regular cobrindo quase toda a camada de esfregaço;
- c) o extrato etanólico de própolis 20%, permaneceu na superfície dentinária em forma de partículas esferoidais e mantendo abaixo destas uma área regular;
- d) o extrato etanólico de própolis 30% manteve todas as características do EEP 20%, apenas diferenciando no tamanho maior das partículas, e de quantidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ARAÚJO, M.A.J. et al. Avaliação qualitativa do efeito de agentes de limpeza na camada de lama dentinária: estudo ultra-estrutural em microscopia eletrônica de varredura. **Rev Odontol UNESP (São Paulo)**, v.12, n.2, p.99-104, abr./jun. 1997.
- 2 BOYDE, A. et al. An assment of two new phisical methods applied to the study of dental tissues. In:- **Advances in fluorine reserch and dental caries prevention**. Oxford: Pergamon Press, 1963. v.1, p.185-93.
- 3 BRÄNNSTRÖM, M., JOHNSON, G. Effects of various conditioners and cleaning agents on prepared dentin surfaces: a scanning electron microscopy investigation. **J Prosthet Dent**, v.31, n.4, p.422-30, Apr. 1974.
- 4 CIZMARIK, J, CIZMARIKOVA, R., MATEL, I. Preparations with propolis. In: HARNAJ, V. (Ed.). **Própolis: scientific data and suggestions concerning. Its composition, properties and possible use in therapeutics**. Trad. M. Gligor. Bucharest: Apimondia, 1978. p.209-11. (Trabalho apresentado em International Beekeep Jubilee Congress, 1975, Bucharest).
- 5 COLITA, D. et al. Primeiros resultados del empleo de los preparados apifitoterapeuticos, como adyuvantes en el tratamiento de hemorragias cutaneas y lesiones de la mucosa bucal, en varias enfermedades de la sangre. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2, 1976, Bucarest. **Anais...Bucarest: Apimondia, 1976. p.274-79.**
- 6 EICK, J.D. et al. Scanning electron microscopy of cut thooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. **J Dent Res**, v.49, n.6, p.1359-68, Nov./Dec. 1970.
- 7 GAFAR, M., MINDRU-SACALUS, A. Tratamiento con propoleos de las aftas banales cronicas recidivantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2, 1976, Bucarest. **Anais...Bucarest: Apimondia, 1976. p.265-70.**
- 8 GAFAR, M. et al. Preparados farmaceuticos con extracto de propoleos empleados en el tratamiento de las parodontopatias marginales cronicas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2, 1976, Bucarest. **Anais...Bucarest: Apimondia, 1976. p.189-92.**
- 9 GEBARA, E.C.E., ZARDETTO, C.G.C., MAYER, M.P.A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre o *S.mutans* e *S.sobrinus*. **Rev. Odontol UESP (São Paulo)**, v.10, n.4, p.251-6, out./dez. 1996.
- 10 GWINNETT, A.J. Smear layer: morphological considerations. **Oper Dent**, v.9, suppl.3, p.3-12, 1984.
- 11 IKENO, K., IKENO, T., MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res**, v.25, n.5, p.347-51, 1991.
- 12 KARIMOVA, Z. H., RODIONOVA, E. I. Propolis in complex treatment of pulmonary tuberculosis. In: HARNAJ, V. (Ed.). **Própolis: scientific data and suggestions concerning. Its composition, properties and possible use in therapeutics**. Trad. M. Gligor. Bucharest: Apimondia, 1978. p.169-71. (Trabalho apresentado em International Beekeep Jubilee Congress, 1975, Bucharest).
- 13 LEIPUS, J. K. Propolis: an efficient treatment. In: HARNAJ, V. (Ed.). **Própolis: scientific data and suggestions concerning. Its composition, properties and possible use in therapeutics**. Trad. M. Gligor. Bucharest: Apimondia, 1978. p.132. (Trabalho apresentado em International Beekeep Jubilee Congress, 1975, Bucharest).
- 14 LEYVA, D.J.C. (Coord.) **Los propoleos: sus aplicaciones en la medicina humana: experiencia cubana**. Cuba: s.n., 1989. 44p. (Apostila).
- 15 LOTUFO, M.A. **Avaliação clínica do uso tóxico de própolis em pacientes com úlceras aftosas recorrentes do tipo Minor**. São Paulo, 1998. 68p. Dissertação (Mestrado em Semiologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 16 LUND AAGAARD, K. Propolis, natural substance: the way to health. In: HARNAJ, V. (Ed.). **Própolis: scientific data and suggestions concerning. Its composition, properties and possible use in therapeutics**. Trad. M. Gligor. Bucharest: Apimondia, 1978. p.124-31. (Trabalho apresentado em International Beekeep Jubilee Congress, 1975, Bucharest).
- 17 MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.
- 18 MATOS, F.T.C. Mumificação pulpar pelo emprego da própolis. **Rev Bras Odontol**, v.46, n.6, p.44, nov./dez. 1989.
- 19 MATSUNO, T. **O efeito terapêutico da própolis**. Trad. Y.Odo. São Paulo: Nair Tazue Itice, 1997. 133p.
- 20 PASHLEY, D.H. Smear layer: physiological considerations. **Oper Dent**, v.9, suppl.3, p.13-29, 1984.
- 21 PERSHAKOV, I.T. The treatment of hypohearing with propolis. In: HARNAJ, V. (Ed.). **Própolis: scientific data and suggestions concerning. Its composition, properties and possible use in therapeutics**. Trad. M. Gligor. Bucharest: Apimondia, 1978. p.144-6. (Trabalho apresentado em International Beekeep Jubilee Congress, 1975, Bucharest).
- 22 RODE, S.M., FERREIRA SANTOS, J.F. Limpeza cavitária: remoção da camada de "smear". **Rev Bras Odontol**, v.47, n.5, p.46-51, set./out. 1990.
- 23 SCHELLER, S. et al. Biological properties and clinical application of propolis: I. Some physico-chemical properties of propolis. **Arzneim Forsch Drug Res**, v.27, n.1, p.889-90, 1977.
- 24 SCHELLER, S. et al. Biological properties and clinical application of propolis. IX. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on dental pulp regeneration. **Arzneim Forsch Drug Res**, v.28. n.1, p.289-91, 1978.
- 25 TANASIENKO, I. S. Prophylaxis and treatment of the nonspecific chronic pneumonia and bronchic asthm in children. In: HARNNAJ, V. (Ed.). **Própolis: scientific data and suggestions concerning. Its composition, properties and possible use in therapeutics**. Trad. M. Gligor. Bucharest: Apimondia, 1978. p.167-8. (Trabalho apresentado em International Beekeep Jubilee Congress, 1975, Bucharest).