

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Curso de Graduação em Biomedicina

Jonathan Henrique de Souza

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME DA
PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA FRENTE À
BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS**

UBERLÂNDIA

2023

Jonathan Henrique de Souza

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME DA
PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA FRENTE À
BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes
Martins

Co-orientadora: Me. Nagela Bernadelli Sousa
Silva

UBERLÂNDIA

2023

Jonathan Henrique de Souza

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIBIOFILME DA
PRÓPOLIS VERMELHA BRASILEIRA FRENTE À
BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes
Martins

Co-orientadora: Me. Nagela Bernadelli Sousa
Silva

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins
Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

Prof^a. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder
Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

Prof^a. Dra. Ralciane de Paula Menezes
Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

Uberlândia, 26 de junho de 2023.

Agradecimentos

Ao meu orientador pela confiança, amizade, pelos ensinamentos de microbiologia e vida.

À minha coorientadora por todo suporte, carinho e paciência.

Aos professores do Departamento por tudo que me ensinaram e pela amizade.

Aos funcionários e técnicos do Departamento que contribuíram com esse trabalho, direta ou indiretamente.

Aos colegas de laboratório LEA (Laboratório de Ensaio Antimicrobianos) pela colaboração, convivência e amizade.

À minha família, por ser meu porto seguro em todos os momentos.

A todos meus amigos mais próximos que me ajudaram nos melhores e piores momentos, sem eles eu não estaria aqui.

Resumo

A periodontite é uma infecção que se caracteriza como um conjunto de condições inflamatórias, de caráter crônico, e de origem bacteriana, afetando inicialmente o tecido gengival podendo levar, com o tempo, à perda dos tecidos de suporte dos dentes. Desde a antiguidade, a própolis tem sido utilizada na medicina tradicional para tratar resfriados, feridas e úlceras como também em rituais de mumificação para embalsamamento de mortos. A própolis possui potencial antibacteriano, o que explicaria a sua utilização para tratamentos na antiguidade tanto quando nos dias de hoje. Atualmente a própolis é utilizada na indústria de alimentos e bebidas, cosméticos, enxaguatórios bucais e cremes dentais. Sendo assim o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da própolis vermelha e suas substâncias isoladas, frente a periodontopatógenos. As bactérias utilizadas no estudo foram, *Porphyromonas gingivalis* – (ATCC 49417) e isolado clínico; *Prevotella intermedia* – (ATCC 15033) e isolado clínico; *Fusobacterium nucleatum* – (ATCC 10953) e isolado clínico e *Actinomyces naeslundii* – (ATCC 19039) e isolado clínico. A atividade antibacteriana foi realizada com extrato bruto hidroalcoólico da própolis vermelha e suas frações (diclorometano, acetato, hexano e *n*-butanol), bem como suas substâncias isoladas (vestitol, metilvestitol, neovestitol, medicarpina, gutiferona-E e oblongifolina-B), através do ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Para avaliação da inibição da formação do biofilme monoespécies e multiespécie com as amostras foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB₅₀) definida pela menor concentração dos agentes antibacterianos que apresenta 50 % ou mais de inibição na formação do biofilme. A partir da CIMB₅₀, foi realizada a contagem do número de microrganismos viáveis com resultados expressos em Log₁₀ por unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Os resultados obtidos da CIM do extrato bruto hidroalcoólico da própolis vermelha variaram entre 3,12 a 100 µg/mL. As frações do extrato bruto e substâncias isoladas obtiveram resultados de 1,56 a 400 µg/mL. Na avaliação da CBM, todas as substâncias avaliadas apresentaram ação bactericida para pelo menos uma bactéria. Dentre os melhores resultados do ensaio de CIMB₅₀ para o biofilme monoespécies, as amostras apresentaram maior atividade frente a bactéria *A. naeslundii* (ATCC 19039), onde extrato bruto demonstrou CIMB₅₀ de 3,12 µg/mL, Gutiferona-E e Oblongifolina-B obtiveram CIMB₅₀ de 0,78 µg/mL. Entre os resultados de biofilme misto, destancam-se a amostra de extrato bruto hidroalcoólico apresentou valores de CIMB₅₀ de 6,25 µg/mL para biofilme multiespécies ATCC e para o biofilme multiespécies dos isolados clínicos. Os valores obtidos

pela gutiferona-E frente ao biofilme multiespécies composto por *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 49417), *Prevotella intermedia* (ATCC 15033) e *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039). A molécula gutiferona-E apresentou CIMB₅₀ de 3,12 µg/mL e eliminou todas as células viáveis do biofilme a partir da concentração 6,25 µg/mL. A avaliação da atividade da Oblongifolina-B frente o biofilme multiespécie ATCC resultou em um valor de CIMB₅₀ de 1,56 µg/mL. Já para o biofilme multiespécie dos isolado clínicos, a amostra oblongifolina-B demonstrou valores de CIMB₅₀ de 50,0 µg/mL e eliminação de todas as células viáveis a partir dessa concentração. O objetivo do trabalho foi contemplado ao comprovar que as amostras de própolis vermelha brasileira possuem atividade antibacteriana frente a todas as bactérias avaliadas no estudo, sendo que todas as amostras apresentaram ação bactericida para pelo menos uma bactéria avaliada. Além disso, as amostras foram capazes de inibir a formação do biofilme com eliminação total das células viáveis em determinadas concentrações.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana, atividade antibiofilme, periodontite, própolis vermelha brasileira.

Abstract

Periodontitis is an infection that is characterized as a set of inflammatory conditions, of a chronic nature, and of bacterial origin, initially affecting the gingival tissue and may lead, over time, to the loss of the supporting tissues of the teeth. Since ancient times, propolis has been used in traditional medicine to treat colds, wounds and ulcers as well as in mummification rituals for embalming the dead. Propolis has antibacterial potential, which would explain its use for treatments both in antiquity and today. Currently, propolis is used in the food and beverage industry, cosmetics, mouthwashes and toothpastes. Therefore, the present study aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of red propolis and its chemical substances, against periodontopathogens. The bacteria used in the study were, *Porphyromonas gingivalis* – (ATCC 49417) and clinical isolates; *Prevotella intermedia* – (ATCC 15033) and clinical isolate; *Fusobacterium nucleatum* – (ATCC 10953) and clinical isolate and *Actinomyces naeslundii* – (ATCC 19039) and clinical isolate. The antibacterial activity was performed with crude hydroalcoholic extract of red propolis and its fractions (dichloromethane, acetate, hexane and n-butanol), as well as its basic substances (vestitol, methylvestitol, neovestitol, medicarpine, gutiferone-E and oblongifolin-B), through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assays. For the formation of the monospecies and multispecies biofilm with the sample, the experiment of the inhibitory concentration of biofilm (CIMB₅₀) was performed, defined by the lowest concentration of antibacterial agents that presents 50% or more of minimum evaluation in the formation of the biofilm. From the CIMB₅₀, the number of viable microorganisms was counted with results expressed in Log₁₀ by colony forming units per milliliter (CFU/mL). The results obtained from the MIC of the crude hydroalcoholic extract of red propolis ranged from 3.12 to 100 µg/mL. The crude extract and chemical fractions obtained results from 1.56 to 400 µg/mL. In the evaluation of the CBM, all the tests evaluated showed bactericidal action for at least one bacterium. Among the best results of the CIMB₅₀ assay for the monospecies biofilm, the samples showed greater activity against the bacteria *A. naeslundii* (ATCC 19039), where proven crude extract CIMB₅₀ of 3.12 µg/mL, Gutiferone-E and Oblongifolin-B obtained CIMB₅₀ of 0.78 µg/mL. Among the mixed biofilm results, the sample of crude hydroalcoholic extract stands out, showing CIMB₅₀ values of 6.25 µg/mL for ATCC multispecies biofilm and for the multispecies biofilm of clinical isolates. The values obtained by gutiferone-E against the multispecies biofilm composed by *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 49417), *Prevotella intermedia* (ATCC 15033) and *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039). The gutiferone-E

molecule showed a CIMB₅₀ of 3.12 µg/mL and eliminated all viable cells from the biofilm starting at a concentration of 6.25 µg/mL. The evaluation of Oblongifolin-B activity against the ATCC multispecies biofilm resulted in a CIMB₅₀ value of 1.56 µg/mL. As for the multispecies biofilm of clinical isolates, the oblongifolin-B sample demonstrated CIMB₅₀ values of 50.0 µg/mL and eliminated all viable cells from this concentration. The objective of the work was contemplated when verifying that the samples of red propolis have Brazilian antibacterial activity against all the evaluations evaluated in the study, and all the samples showed bactericidal action for at least one bacterial evaluation. Furthermore, the samples were able to inhibit biofilm formation with total elimination of viable cells at specific concentrations.

Keywords: Antibacterial activity, antibiofilm activity, Brazilian red propolis, periodontitis.

Lista de Figuras

Figura 1 – Padronização da formação do biofilme monoespécies e multiespécie ATCC.....	33
Figura 2 – Padronização da formação do biofilme monoespécies e multiespécie Isolado Clínico....	34
Figura 3 – Inibição da formação do biofilme monoespécie <i>P. gingivalis</i> (ATCC 49417).....	37
Figura 4 – Inibição da formação do biofilme monoespécie <i>P. intermedia</i> (ATCC 15033).....	38
Figura 5 – Inibição da formação do biofilme monoespécie <i>A. naeslundii</i> (ATCC 19039).....	39
Figura 6 – Inibição da formação do biofilme monoespécie <i>P. gingivalis</i> (Isolado Clínico)....	40
Figura 7 – Inibição da formação do biofilme monoespécie <i>P. intermedia</i> (Isolado Clínico)...	41
Figura 8 – Inibição da formação do biofilme monoespécie <i>F. nucleatum</i> (Isolado Clínico)...	42
Figura 9 – Inibição da formação do biofilme multiespécies ATCC.....	43
Figura 10 – Inibição da formação do biofilme multiespécies Isolado Clínico.....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Microbiota bucal	12
1.2. Periodontite	13
1.3. Biofilme	14
1.4. Própolis Vermelha Brasileira.....	15
2. OBJETIVO.....	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivo específico	17
3. METODOLOGIA.....	18
3.1. Aquisição das amostras de própolis e derivados	18
3.2. Bactérias utilizadas no ensaio	18
3.3. Avaliação da atividade antibacteriana da Própolis Vermelha Brasileira e suas substâncias isoladas	20
3.3.1. Preparo dos extratos de Própolis, frações e substâncias isoladas para obtenção da solução mãe.....	20
3.3.2. Preparo do controle positivo	20
3.3.3. Preparo dos inóculos bacterianos	21
3.3.4. Realização da técnica de avaliação da atividade antibacteriana pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	21
3.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	22
3.5. Padronização da Formação do Biofilme	23
3.6. Revelação da padronização dos biofilmes bacterianos	24
3.7. Avaliação da inibição do biofilme pela determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB ₅₀).....	25
3.7.1. Preparo das amostras mais promissoras	25
3.7.2. Preparo do controle positivo	25
3.7.3. Preparo do inóculo.....	25
3.7.4. Inibição da formação de biofilme pela determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB ₅₀)	26
3.7.4.1. Avaliação da atividade antibiofilme por quantificação da biomassa dos biofilmes bacterianos	26
3.7.4.2. Avaliação da atividade antibiofilme por contagem de microrganismos	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	28
4.2. Padronização da formação de biofilme	32
4.3. Inibição da formação de biofilme pela quantificação de biomassa (CIMB ₅₀) e viabilidade celular	35

5.	DISCUSSÃO.....	45
6.	CONCLUSÃO.....	49
7.	REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microbiota bucal

O ser humano é composto por células humanas e células microbianas. O número de microrganismos que colonizam o corpo humano é dez vezes maior que a quantidade de células humanas (HE *et al.*, 2015). A cavidade bucal é um dos ecossistemas mais bem estudados do organismo humano. Este ambiente apresenta diversos habitats para colonização de bactérias aeróbias e anaeróbias (KUMAR, 2017), abrigando mais de 750 espécies de bactérias que contribuem para o equilíbrio da saúde bucal (GOMES *et al.*, 2015). Existem dois tipos de superfícies habitáveis para colonização bacteriana nessa cavidade: a superfície dura dos dentes e os tecidos moles da mucosa da boca (ZHANG *et al.*, 2018). Além disso, essas bactérias podem colonizar a fenda subgengival, palato duro, amígdalas, mucosa alveolar, superfícies mucosas queratinizadas no dorso da língua e superfícies epiteliais não queratinizadas na mucosa (KUMAR, 2017).

Os microrganismos presentes na cavidade bucal são a primeira linha de defesa frente a patógenos. Eles impedem que outros de origem exógena e patogênicos se estabeleçam devido ao reconhecimento pelo sistema imune do corpo humano, regulando positivamente a resposta pró-inflamatória para aqueles que não fazem parte da microbiota da boca (KAAN *et al.*, 2021). A microbiota bucal é uma das partes importantes do microbioma humano e refere-se especificamente aos microrganismos que residem na cavidade oral humana (ZHANG *et al.*, 2018). Alterações no equilíbrio desses microrganismos podem resultar em doenças bucais ou até contribuir para o desenvolvimento de doenças sistêmicas como diabetes e Alzheimer (DOMINY *et al.*, 2019).

A composição da microbiota bucal varia em cada indivíduo, mas de modo geral, os gêneros de bactérias de maior prevalência em uma boca saudável são *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilis*, *Lactobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* e *Propionibacterium*. Os fungos estão presentes em menor quantidade, sendo os gêneros *Candida*, *Cladosporium*, *Aureoba-sidium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cryptococcus* os mais frequentes (GERMANO *et al.*, 2018). Quando há o desequilíbrio dessa microbiota acontece a proliferação excessiva de bactérias patogênicas, resultando na disbiose oral. Causada por diversos fatores, desde higiene inadequada a uso de antibióticos, esse quadro interfere diretamente no funcionamento da resposta imunológica do hospedeiro e pode

desencadear uma série de doenças. Entre elas, a periodontite representa uma condição disbiótica importante devido à diversidade de gêneros de bactérias e fungos envolvidos no microbioma periodontal (SUDHAKARA *et al.*, 2018).

1.2. Periodontite

As doenças periodontais, popularmente e clinicamente designado como periodontite, são definidas como uma inflamação dos tecidos de suporte do dente, cemento, ligamento e osso, iniciada pelo desequilíbrio entre crescimento das bactérias e a barreira imunológica do hospedeiro, causando infecção. De maneira recorrente na clínica odontológica, o diagnóstico é realizado através da observação de sangramento por estresse mecânico na gengiva, formação de bolsas periodontais de coleção purulenta, hiperplasia e perda da inserção gengival, comprometimento do ligamento e do tecido ósseo que suporta o dente, culminando em uma mobilidade excessiva do dente, ou até em casos mais graves, porém muito comum, sua perda (NUTO *et al.*, 2007; HAINI *et al.*, 2020).

Além dos danos causados na região da boca, é comprovada a existência da relação entre doenças sistêmicas e as infecções periodontais, entre elas estão, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, entre outras doenças que podem ter influência direta ou indireta com a periodontite. Atualmente relevantes evidências demonstram que a doença periodontal pode ser considerada como fator de risco para doenças cardiovasculares e até mesmo Alzheimer por apresentar elevado grau de microrganismos envolvidos na infecção, além de sua natureza invasiva, podendo haver contato com a corrente sanguínea do hospedeiro, resultando em uma bacteremia (presença de bactérias no sangue) no indivíduo (CANGUSSU *et al.*, 2014; DOMINY *et al.*, 2019).

O principal fator etiológico do desenvolvimento das doenças periodontais é o biofilme multiespécies. A formação de biofilme é um fator de resistência das bactérias na periodontite, tanto a estresse mecânico da escovação, quanto a atuação de agentes antimicrobianos (HERNANDEZ *et al.*, 2021). No biofilme existe um grande número de espécies de bactérias, e entre as periodontopatogênicas, as de maior prevalência são as bactérias do complexo laranja, responsáveis por infecções periodontais, como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (MIRANDA *et al.* 2019).

Segundo Socransky *et al.* (1988), a microbiota bucal pode ser classificada em diferentes complexos com base na associação das espécies microbianas. Os complexos bacterianos se

diferenciam por cores de acordo com sua virulência. O complexo amarelo inclui biofilmes saudáveis formados por *Streptococcus* spp. O complexo roxo corresponde principalmente por bactérias que iniciam a formação de biofilmes que, em seguida, bactérias do complexo verde colonizarão. Sem interferências externas, os biofilmes saudáveis criam condições que podem favorecer a colonização das espécies do complexo laranja. O complexo laranja está associado ao desenvolvimento da periodontite devido à mudança nas condições ambientais favorecendo a colonização por espécies incluídas no complexo vermelho e que são consideradas os principais patógenos da doença periodontal (SOCRANSKY *et al.* 1988).

Geralmente a microbiota da boca conta com biofilmes de bactérias em harmonia com o sistema imunológico do hospedeiro e é associada a um quadro de boa saúde da boca. Entretanto, condições como o estado imunológico, qualidade e pH da saliva e disponibilização de carboidratos, podem alterar a composição do biofilme e, por fim, gerar um quadro patogênico (ŁUSIAK-SZELACHOWSKA *et al.*, 2020).

1.3. Biofilme

A capacidade de adesão em superfícies sólidas seguida de multiplicação e colonização bacteriana é característica da formação de biofilme. Biofilmes constituem um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência de microrganismos em ambientes hostis, sendo de fisiologia e comportamento significativamente diferente de suas contrapartes planctônicas. Na natureza os microrganismos geralmente aderem a superfícies e se incorporam em uma matriz composta por 8 substâncias poliméricas extracelulares (EPS), polímeros produzidos por eles mesmos, formando uma população séssil, denominada biofilme (SIMÕES *et al.*, 2010; ZEA *et al.*, 2020). A formação do biofilme depende de várias condições ambientais como a composição do meio em se estabelece e nutrição, estresse salino, limitação de sais e também condições de anaerobiose. Entretanto, não apenas o estresse ambiental, mas também as densidades bacterianas regulam a produção do biofilme. (DIAZ *et al.*, 2019).

Os biofilmes bacterianos têm diferentes características em relação a capacidade de crescimento, expressão gênica e produção proteica. Os mecanismos utilizados para resistir a antibióticos são diferentes entre os tipos de biofilme e diferem dos mecanismos utilizados pelas células quando em modo planctônico. As principais características dos biofilmes são a capacidade de se auto-organizar, resistir a perturbações ambientais, resposta a mudanças ambientais como comunidade e não como célula isolada (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

De acordo com Sauer e colaboradores (2022), a formação de um biofilme ocorre em 5 fases principais: 1- aderência a uma superfície, 2- formação de uma microcolônia, 3- maturação, 4- aquisição de uma estrutura bem definida e 5- dispersão de células do biofilme para o meio circundante. Os dois primeiros passos diferem entre espécies bacterianas, estando relacionados com o habitat de cada uma. Entretanto, a maturação e a aquisição de uma estrutura definida num biofilme são passos regulados por sinais entre as células. (JAKUBOVICS *et al.*, 2021; FLEMMING *et al.*, 2022).

Além disso, sabe-se hoje que há microrganismos associados a uma superfície que exibem taxas elevadas de crescimento e aumento da resistência aos antimicrobianos (RAHIM *et al.*, 2020). Portanto, vários mecanismos bacterianos podem estar relacionados com o aumento da resistência microbiana das células dentro de biofilmes, como baixa penetração antimicrobiana devido à presença e à densidade da matriz, acúmulo de enzimas degradadoras de antibióticos, expressão aumentada de genes da bomba de efluxo, taxa de multiplicação microbiana alterada e alterações fisiológicas bacterianas (SINGH *et al.* 2017; HARPER *et al.* 2019). Outros estudos apontam que a formação de uma colônia com espécies variadas de bactérias dentro do biofilme pode promover o aumento da taxa de mutação, uma vez que o gene de resistência de uma delas pode ser transferido para as demais (DINCER, S. *et al.* 2020).

Os microrganismos se desenvolvem em dois tipos de biofilme na boca, supragengival e subgengival, que diferem entre si quantitativamente e qualitativamente. O biofilme supragengival inicia o processo de cárie no tecido dos dentes, já o biofilme subgengival ocasiona processos inflamatórios que decorrem em doenças periodontais (TASNEEM *et al.*, 2018). Diversas substâncias, como enxaguantes bucais e medicamentos, foram exploradas na atividade antibiofilme nas últimas décadas, no entanto, muitas bactérias desenvolveram resistências aos antibióticos comumente utilizados (ROQUE-BORDA *et al.*, 2021). Dessa maneira, agentes antibiofilmes mais eficientes precisam ser desenvolvidos para superar esse desafio e manter a saúde da boca e prevenir infecções endodônticas. Os compostos naturais têm mostrado grande potencial antimicrobiano frente a cepas resistentes devido a sua variação química, um deles é a própolis vermelha brasileira, que possui características singulares em decorrência da flora constituinte da região onde é produzida e coletada.

1.4. Própolis Vermelha Brasileira

A própolis é uma substância resinosa ou algumas vezes serosa, produzidas por abelhas a partir de brotos, flores e diferentes exsudatos vegetais, nas quais as abelhas acrescentam

secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto. As abelhas utilizam a própolis para selar furos em suas colmeias, alisar as paredes internas e para embalsamar insetos invasores mortos a fim de evitar sua decomposição e também protegendo a colônia de doenças devido a sua propriedade antimicrobiana. Desde a antiguidade, a própolis tem sido utilizada na medicina tradicional para tratar resfriados, feridas e úlceras como também em rituais de mumificação para embalsamamento de mortos. Atualmente a própolis é utilizada na indústria de alimentos e bebidas, cosméticos, enxaguatórios bucais e cremes dentais (FREIRES *et al.*, 2016; SLANZON *et al.* 2019; BATISTA *et al.* 2020).

A composição química da própolis é variável e depende da variedade genética da abelha que a produziu e da biodiversidade da região visitada pelas abelhas. A composição química da própolis determina também suas inúmeras propriedades biológicas, entre essas propriedades podemos destacar a atividade anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiparasitária (FREIRES *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2017; JIANG *et al.* 2020). A Própolis Vermelha Brasileira (BRP), é um material resinoso produzido pelas abelhas *Apis mellifera* através a coleta de cera e material vegetal de duas espécies vegetais: *Dalbergia ecastaphyllum* e *Symphonia globulifera* e apresenta excelente potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. A BRP é atualmente uma das mais produzidas e comercializadas tipos de própolis brasileira. É encontrada principalmente nos manguezais brasileiros do Nordeste, especialmente em Estados de Alagoas e Bahia (BATISTA *et al.*, 2012; CORREA *et al.* 2020).

A própolis vermelha tem muitos de seus compostos químicos identificados, tais como: elemicina, isoelemicina, metil isoeugenol, formononetina, biochanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, homopterocarpana, quercetina e vestitol. Do extrato lipofílico foram isoladas as benzofenonas polipreniladas guttiferone E, xantochimol e oblongifolina A, entre outros. As isoflavonas formononetina, biochanina A, pinocembrina e medicarpina são considerados seus marcadores químicos devido as suas elevadas concentrações na própolis vermelha (DE MENDONÇA *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2019). Além destes compostos, foram identificados o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido umbelico, ácido p-cumárico, genisteína, canferol, catequina, dalbergioidina, epicatequina, daidzein, 2'-hidroxiformononetina, ácido evernico, naringenina, calicosina, (7S), dalbergifenol, tevetiaflavona, cicloartenol, guttiferona C, e outros compostos, utilizando LC-Orbitrap-EMTF (MARÓSTICA JUNIOR *et al.*, 2008; FREITAS *et al.*, 2017; CHEGINI *et al.* 2018). Recentemente vários estudos com a própolis vermelha brasileira e seus compostos têm

demonstrado o seu grande potencial biológico (BOTTEON *et al.* 2021; DE OLIVEIRA *et al.* 2022; Silva *et al.*, 2022).

A própolis vermelha é produzida principalmente em Alagoas o qual foi certificado internacionalmente pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI, 2012) como o único produtor deste tipo de própolis no mundo. Muitos compostos encontrados na própolis vermelha não foram encontrados em outros tipos de própolis brasileiras, o que a torna um produto de abelha singular (FREIRES, *et al.*, 2016; SENA-LOPES *et al.*, 2018). Atualmente há 12 patentes depositadas no INPI sobre própolis vermelha. Todavia, ainda não existem medicamentos à base de própolis registrados na ANVISA até a presente data (FREITAS *et al.*, 2017; ANVISA 2019).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar as atividades antibacteriana e antibiofilme do extrato bruto, frações e substâncias isoladas da Própolis Vermelha Brasileira frente a bactérias periodontopatógenas.

2.2. Objetivo específico

- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato, frações e substâncias isoladas da Própolis Vermelha Brasileira, frente a um painel de bactérias causadoras de infecção periodontal;
- ✓ Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato, frações e substâncias isoladas da Própolis Vermelha Brasileira, frente a um painel de bactérias causadoras de infecção periodontal;
- ✓ Padronizar a formação do biofilme das bactérias que obtiveram melhores resultados da CIM;
- ✓ Avaliar a capacidade de inibição da formação dos biofilmes monoespécies e multiespécies de bactérias bucais frente aos extratos de Própolis Vermelha Brasileira, frações e substâncias isoladas.

3. METODOLOGIA

3.1. Aquisição das amostras de própolis e derivados

As amostras utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Jairo Kenupp Bastos e pelo Prof. Sérgio Ricardo Ambrósio, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e Universidade de Franca, respectivamente. As amostras utilizadas nesse estudo foram extrato bruto hidroalcoólico da Própolis Vermelha e suas frações em diclorometano, hexano, acetato, n-Butanol, e as substâncias isoladas gutiferona-E, oblongifolina-B, metilvestitol, medicarpina, vestitol e neovestitol.

3.2. Bactérias utilizadas no ensaio

As bactérias periodontopatogênicas utilizadas no estudo foram provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC) e seus respectivos isolados clínicos obtidos de trabalhos anteriores de infecções periodontais humanas, como mostra a **Tabela 1**.

Essas bactérias foram mantidas na coleção de cultura do LEA/UFU, sob criopreservação à 20° C negativos em uma solução de meio de cultura Brucella adicionado glicerol a 80% e sangue desfibrinado de cavalo, até o início dos testes.

Tabela 1: Características gerais das bactérias anaeróbias utilizadas

Bactérias utilizadas	Origem	Morfotipo
Porphyromonas gingivalis	ATCC 49417	Bacilo Gram - negativo
Porphyromonas gingivalis	Isolado Clínico	Bacilo Gram - negativo
Prevotella intermedia	ATCC 15033	Bacilo Gram - negativo
Prevotella intermedia	Isolado Clínico	Bacilo Gram - negativo
Fusobacterium nucleatum	ATCC 10953	Bacilo Gram - negativo
Fusobacterium nucleatum	Isolado Clínico	Bacilo Gram - negativo
Actinomyces naeslundii	ATCC 19039	Bacilo Gram - positivo
Actinomyces naeslundii	Isolado Clínico	Bacilo Gram - positivo

3.3. Avaliação da atividade antibacteriana da Própolis Vermelha Brasileira e suas substâncias isoladas

3.3.1. Preparo dos extratos de Própolis, frações e substâncias isoladas para obtenção da solução mãe

Com auxílio de uma balança analítica digital (Mettler Toledo, Toledo, OH, USA) foi pesado 1mg do extrato bruto hidroalcolico, suas frações e substâncias isoladas. Em seguida, as amostras foram solubilizadas em 125 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha). Para cada 125µL desta solução, foi adicionado 500 µL de caldo Brucella (Difco Labs, Detroit, MI, USA) suplementado com Hemina 5,0 µg/mL (Sigma, St. Louis, MO, USA) e Menadiona 1,0 µg/mL (Sigma), obtendo a solução mãe em concentração final de 1600 µL/mL.

3.3.2. Preparo do controle positivo

O antibiótico padrão utilizada para a validação da técnica frente às cepas de referência *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29741) foi o metronidazol (Sigma). A partir de uma solução estoque a 10 mg/mL, armazenada a -20°C, uma alíquota de 4,72 µL desta solução foi adicionada em um frasco contendo 1995,3 de caldo Brucella suplementado, resultando em uma solução mãe com concentração de 23,6 µg/mL. Esta solução foi utilizada para testar a droga a partir de diluições seriadas nas concentrações de 5,9 a 0,0115 µg/mL.

Para garantir a validação da técnica, foram realizados controles de esterilidade do caldo, solução mãe e controle positivo do solvente (DMSO). Foi realizado o controle do caldo, onde 200 µL do caldo foram adicionados em um dos poços para confirmar a ausência de crescimento bacteriano, ou seja, a esterilidade do caldo. O controle de esterilidade do solvente foi testado com 2 µL de DMSO (Merck) em 198 µL de caldo. Para teste de esterilidade da solução mãe, em um poço contendo 190 µL de caldo foram adicionados 10 µL de solução mãe. A fim de confirmar a esterilidade do controle positivo, 10 µL da solução mãe do antibiótico foram adicionados em um poço contendo 100 µL de caldo. O controle da cultura foi avaliado em 100 µL da suspensão bacteriana em 100 µL de caldo, apresentando crescimento bacteriano devido à ausência de substância teste.

Foi realizado o controle do DMSO (Merck) nas concentrações de 1 a 5%, onde foram adicionados caldo e suspensão bacteriana em todas as concentrações testadas, obtendo como resultado esperado a não inibição do crescimento bacteriano.

3.3.3. Preparo dos inóculos bacterianos

Foram realizados repiques em meio de cultura Ágar Schaedler (Difco) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo, com Hemina (5,0 µg/mL) e Menadiona (1,0 µg/mL). Sendo incubado em câmara de anaerobiose em uma atmosfera contendo 5-10% de H₂, 10% de CO₂ e 80-85% de N₂, e (Don Whitley 174 Scientific, West Yorkshire, Inglaterra) durante 72 horas.

As colônias foram transferidas com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada para um tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo Brucella suplementado como descrito anteriormente. Nesse tubo, foram inoculados suspensões bacterianas a fim de obter uma turvação de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A partir desse primeiro tubo, foram transferidos 500 µL para um outro tubo contendo 4,5 mL de caldo Brucella suplementado, obtendo uma concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Deste tubo, foram transferidos 2 mL para um terceiro tubo contendo 13 mL de caldo Brucella suplementado, obtendo uma concentração final de 2×10^6 UFC/mL (CLSI, 2007).

3.3.4. Realização da técnica de avaliação da atividade antibacteriana pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima é definida como a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para realização dos ensaios o método utilizado foi o de microdiluição seriada em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2007), com adaptações. Foi empregada como revelador do crescimento bacteriano a resazurina (Sigma), uma substância que ao entrar em contato com microrganismos vivos, sofre oxirredução e altera sua cor de roxo para rosa. Os agentes antimicrobianos são avaliados em diluições sucessivas, sendo a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano considerada como a Concentração Inibitória Mínima. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Após o preparo das soluções mãe dos extratos de Própolis, frações e suas substâncias isoladas, controle positivo e inóculo, foi realizado o método de diluição em caldo para determinar a CIM em microplacas esterilizadas de 96 poços. Para isso, foram pipetados 100

μL de caldo *Brucella* suplementado em todos os poços da microplaca e 100 μL da solução mãe das amostras de própolis apenas no primeiro poço de cada linha, para que fosse possível ser realizada a diluição das mesmas. Essa diluição foi feita transferindo-se 100 μL do primeiro poço para o próximo poço na sequência até completar todas as diluições. No fim dessa diluição, as amostras variaram 0,195 a 400 μg/mL. Por fim, 100 μL da suspensão bacteriana (descrita no item acima) foram pipetados em todos os poços, obtendo-se uma concentração bacteriana final no poço de 1×10^6 UFC/mL.

As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose em uma atmosfera contendo 5-10% de H₂, 10% de CO₂ e 80-85% de N₂, durante 72 horas. A técnica foi realizada em triplicata para todas as bactérias avaliadas.

Após a incubação das microplacas os resultados de CIM foram avaliados pela técnica que utiliza resazurina (Sigma) como revelador de crescimento bacteriano. A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FOERSTER *et al.*, 2017). É um método colorimétrico que avalia a presença de crescimento bacteriano pela mudança de cor da resazurina. A alteração da cor da resazurina ocorre por uma ação de oxirredução. Em seu estado oxidado, a resazurina é azul, tornando-se rosa quando semi reduzida em resofurina pela atividade metabólica enzimática das células viáveis. O corante resazurina atua como um aceptor de elétrons, mudando de cor na presença da enzima desidrogenase ativa, proveniente de uma cultura de bactéria em crescimento (LESCAT *et al.*, 2019).

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela adição de 30 μL do revelador resazurina (0,02%) em cada poço. Posteriormente, as placas foram incubadas novamente por 30 minutos para verificação da alteração da cor. Para interpretação dos resultados, a cor azul indicou a ausência de crescimento bacteriano e a cor rosa, crescimento bacteriano.

3.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima é definida como a menor concentração das amostras que resulta na morte bacteriana. Essa técnica permite saber se os compostos avaliados na CIM atuaram com ação bactericida, comprovada pela ausência de crescimento no ágar na concentração da amostra definida como CIM, ou ação bacteriostática, comprovada pelo crescimento bacteriano na concentração de amostra definida como CIM. Como foi utilizada a mesma microplaca do processo de CIM antes da adição de resazurina (Sigma), as

concentrações avaliadas são as mesmas de 0,195 a 400 µg/mL para o extrato da própolis e suas substâncias isoladas e para os controles positivos 0,0115 a 5,9 µg/mL.

Para determinação da CBM alíquotas de 10 µL de cada poço da microplaca foram inoculados em Ágar Schaedler (Difco) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo, com Hemina (5,0 µg/mL) e Menadiona (1,0 µg/mL), antes da revelação com resazurina. Em seguida, as placas de ágar foram incubadas em estufa de anaerobiose, com atmosfera ideal e temperatura de 36°C por 72 horas. Após o período de incubação, o resultado foi avaliado pela ausência ou crescimento de colônias de cada ponto onde alíquota foi inoculada.

A interpretação do efeito bactericida ocorre quando o resultado da CIM for igual ao resultado da CBM. Já o efeito bacteriostático ocorre quando a CBM for maior que o resultado da CIM, mostrando que a substância apresentou efeito inibitório, porém reversível.

3.5. Padronização da Formação do Biofilme

A padronização do biofilme foi realizada segundo Wilson e colaboradores (2017), que propõe a formação do biofilme em microplacas de fundo chato, com 96 poços, em diferentes condições. Essa padronização do biofilme das bactérias foi realizada apenas para os resultados mais promissores no ensaio da CIM e CBM.

Nesse estudo, foram selecionadas seis cepas e 3 amostras que apresentaram melhores resultados de CIM e CBM dentre todas avaliadas. Segundo Rios e Recio (2005) e Gibbons (2018), valores de CIM abaixo de 100 µg/mL para extrato bruto hidroalcoólico ou abaixo 10 µg/mL para compostos isolados são considerados promissores ao avaliar a atividade antibacteriana de extratos de plantas, óleos essenciais e compostos isolados de fontes naturais. Dessa forma, foram selecionadas as amostras extrato bruto hidroalcoólico e as substâncias isoladas gutiferona-E e oblongifolina-B. As cepas *F. nucleatum* (ATCC 10953) e *A. naeslundii* (isolado clínico) foram as únicas não selecionadas para dar prosseguimento aos ensaios com avaliações de sensibilidade do biofilme. As cepas bacterianas apresentaram resultados promissores frente às amostras selecionadas.

Para avaliar a inibição dos biofilmes das bactérias selecionadas ao extrato bruto da própolis vermelha e as substâncias isoladas, foi necessário verificar previamente a capacidade de crescimento das cepas analisadas no modo sésil, onde bactérias formadoras de biofilme aderem no fundo dos poços das microplacas e são quantificadas pela coloração com cristal violeta. Existem vários fatores que podem influenciar na formação do biofilme, como a composição do meio de cultura, período de incubação, temperatura e concentração do inóculo.

Portanto, foram preparadas diferentes concentrações do inóculo e diferentes períodos de incubação. (SCHNURR *et al.*, 2015; MAHTO *et al.*, 2022; SAUER *et al.*, 2022).

As concentrações bacterianas testadas foram de 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 UFC/mL, incubadas em diferentes períodos, sendo 3, 5 e 7 dias em câmara de anaerobiose a 36°C. Além da formação do biofilme monoespécie, foi avaliada a formação de biofilmes multiespécies, sendo um biofilme multiespécies composto por apenas cepas ATCC e outro formado por apenas isolados clínicos. O inóculo preparado para formação de biofilme multiespécies foi composto pelas mesmas quantidades do inóculo de cada cepa, formando um inóculo final com proporções iguais de microrganismos.

As bactérias foram cultivadas em Ágar Schaedler (Difco) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo, com Hemina (5,0 µg/mL) e Menadiona (1,0 µg/mL), em condições de anaerobiose por três dias. Observado o crescimento bacteriano, as colônias bacterianas foram inoculadas em 5mL de caldo Brucella suplementado para obter a turbidez equivalente a escala 10 de McFarland, correspondente a 10^9 UFC/mL. Posteriormente, foram realizadas sucessivas diluições decimais de 500 µL deste primeiro tubo para outro contendo 4,5 mL de caldo Brucella e assim sucessivamente até obter a concentração de 10^6 UFC/mL. Após o preparo das suspensões bacterianas, alíquotas de 200 µL de cada diluição foram transferidas para três microplacas de 96 poços. As microplacas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 36°C, sendo que a primeira placa permaneceu por 3 dias, a segunda por 5 dias e a terceira por 7 dias. O ensaio foi realizado em triplicata.

Para a formação do biofilme multiespécies, procedimento foi o mesmo, com apenas adaptação na preparação do inóculo, onde foi adicionado 33 µL de inóculo de cada bactéria, a fim de formar um inóculo com 100 µL composto por 3 espécies de bactéria.

3.6. Revelação da padronização dos biofilmes bacterianos

Após o período de incubação de cada microplaca, o volume total de cada poço (200 µL) foi aspirado cuidadosamente e as células não aderidas foram removidas pela lavagem com 200 µL de água Milli Q esterilizada. A água foi retirada e o biofilme aderido foi fixado com 200 µL de metanol em todos os poços por 15 minutos. Após esse período, o metanol foi aspirado e as microplacas foram abertas para que o restante do metanol fosse evaporado e cada poço ficasse totalmente seco. O biofilme fixado, em seguida, foi corado com 200 µL de uma solução de cristal violeta (Sigma) a 2% e deixado em repouso por 20 minutos. Posteriormente, o cristal violeta foi retirado e o excesso foi lavado com água Milli Q esterilizada até que todo cristal

violeta não aderido ao biofilme fosse lavado. O excesso de água foi retirado e o biofilme foi ressuspensão em 200 µL de ácido acético 33% por 30 minutos a fim de solubilizar o cristal violeta presente no biofilme.

A leitura foi realizada, após total solubilização dos grumos de cristal violeta, em leitor de microplacas (TPP) a 595nm. Para a interpretação, foi considerado a formação de biofilme, os valores de absorbância maiores ou iguais a 1,00 obtidos na leitura espectrofotométrica. A partir do procedimento de padronização do biofilme realizado no item 3.5, foi estabelecido a concentração de 10^6 UFC/mL e período de incubação de 3 dias para todas as bactérias selecionadas para essa fase.

3.7. Avaliação da inibição do biofilme pela determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB₅₀)

3.7.1. Preparo das amostras mais promissoras

Esse procedimento foi realizado com as amostras que apresentaram os melhores resultados de CIM e CBM, que foram extrato bruto hidroalcoólico da Própolis Vermelha Brasileira e substâncias isoladas gutiferona-E e oblongifolina-B. Em uma balança analítica (METTLER TOLEDO) foi pesado 1 mg da amostra e solubilizada em 125 µL de DMSO (Merck), em seguida foram adicionados 500 µL de caldo Brucella suplementado, obtendo a concentração de 1600 µg/mL. Em seguida foi realizada diluição seriada em microplaca de 96 poços para atingir as concentrações de 400 a 0,195 µg/mL, como já descrito no item 3.3.1.

3.7.2. Preparo do controle positivo

Para garantir que a técnica estava sendo feita da maneira adequada, foi utilizado como controle positivo o antibiótico metronidazol (Sigma), preparado a partir de uma solução estoque a 10 mg/mL, como já descrito no item 3.3.2. As concentrações utilizadas foram de 0,0115 a 5,9 µg/mL, para avaliar a determinação da CIMB₅₀.

3.7.3. Preparo do inóculo

O procedimento para realização dos biofilmes monoespécie foi realizado como descrito no item 3.3.3. Já para os biofilmes multiespécies, alíquotas de volumes iguais de cada inóculo das bactérias selecionadas foram inoculadas nos poços da microplaca a fim de formar um volume final de inóculo misto de 100 µL.

3.7.4. Inibição da formação de biofilme pela determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB₅₀)

A metodologia utilizada para a determinação da atividade antibiofilme é similar ao ensaio de microdiluição em caldo, realizados em microplacas de 96 poços para a determinação da CIM como preconizado pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2007) com modificações. Para avaliação da inibição da formação dos biofilmes foi proposta a determinação da Concentração Inibitória Mínima do Biofilme (CIMB₅₀) definida pela menor concentração do agente antibacteriano capaz de inibir 50% ou mais da formação do biofilme (WEI *et al.*, 2006), sendo realizada apenas com as amostras que apresentaram melhor resultado no ensaio da CIM. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para avaliar a atividade antibiofilme das amostras de própolis e suas substâncias isoladas, foram preparados 100 µL de caldo Brucella suplementado e adicionados 100 µL da solução mãe das amostras de própolis avaliadas nesse ensaio, para que assim fosse feita a diluição seriada a fim de obter as concentrações das amostras variando de 0.195 a 400 µg/mL. Por fim, 100 µL das suspensões bacterianas foram inoculadas em todos os poços da microplaca, obtendo um volume final de 200 µL por poço. O mesmo procedimento foi realizado com controle positivo. Assim como na CIM, para validar o método, foram realizados todos os controles de esterilidade do caldo, soluções mães, do solvente DMSO (Merck), controle do antibiótico, bem como o controle do crescimento do biofilme sem tratamento.

A interpretação da atividade antibiofilme foi dada por duas metodologias, a leitura da placa por densidade óptica (D.O) em aparelho de espectrofotometria e contagem dos microrganismos por unidade formadora de colônia por mililitro (UFC/mL). Sendo assim, toda a parte metodológica citada anteriormente foi realizada em duas placas simultaneamente e em triplicata para todas as bactérias selecionadas.

3.7.4.1. Avaliação da atividade antibiofilme por quantificação da biomassa dos biofilmes bacterianos

A quantificação da biomassa foi realizada pela metodologia do cristal violeta. Após o período de incubação em câmara de anaerobiose, as microplacas passaram pelo processo de lavagem, fixação, coloração e ressuspensão como no método citado no item 3.6. Após realizado todos os processos, a leitura das microplacas foi realizada por espectrofotometria a 595 nm e a porcentagem de inibição foi calculada pela seguinte equação:

$$Inibição = 1 - \left(\frac{Absorbância (595nm) do poço tratado com a substância teste}{Absorbância (595nm) do poço não tratado} \right) \times 100$$

3.7.4.2. Avaliação da atividade antibiofilme por contagem de microrganismos

Após o período de incubação, o conteúdo de todos os poços das microplacas foi aspirado cuidadosamente e foi realizado o processo de lavagem da placa, onde as células planctônicas foram removidas. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de caldo Brucella e realizado o desprendimento das células aderidas pelo processo de 15 minutos no aparelho de banho em ultrassom. Para garantir o completo desprendimento das células do biofilme, os poços foram homogeneizados com o auxílio de uma micropipeta.

Em seguida, foram realizadas diluições seriadas de 10^0 a 10^{-14} da seguinte maneira: alíquotas de 20 µL de cada poço das placas que passaram pelo banho em ultrassom foram transferidos para outro poço de uma outra placa contendo 180 µL de caldo (primeira diluição 10^{-1}), desta diluição 20 µL foram pipetados e transferidos para o próximo poço contendo 180 µL de caldo obtendo-se a diluição 10^{-2} , e assim sucessivamente até a última diluição 10^{-14} .

Realizado o processo de diluições seriadas, 50 µL de cada poço, correspondente a cada diluição, foram aplicados em uma única placa de ágar Schaedler (Difco) suplementado fracionada em 8 partes (HARRISON *et al.*, 2005), para em seguida serem incubadas em câmara de anaerobiose por 72 horas. Após incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia em cada diluição, considerando apenas aquelas que apresentavam número de 30 a 300 UFC por diluição. Os resultados foram expressos em Log_{10} por Unidade Formadora de Colônia por mililitro (UFC/mL) e demonstrado graficamente. Os resultados foram analisados e a elaboração dos gráficos foi utilizando o programa GraphPad Prisma, versão 8.0.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os resultados da CIM e CBM do extrato bruto, frações e substâncias isoladas da própolis vermelha frente as bactérias avaliadas no estudo estão apresentados nas **Tabelas 2 a 4**.

Os resultados da CIM e CBM para o extrato bruto hidroalcolico frente as bactérias avaliadas variaram de 3,12 a 100 µg/mL e 25 a 100 µg/mL respectivamente. Além disso, demonstrou ação bactericida frente as bactérias *Prevotella intermedia* (Isolado clínico), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) e *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039 e Isolado Clínico)(**Tabela 2**).

Dentre as frações, os melhores resultados foram observados na fração em diclorometano apresentando valores de CIM de 1,56 a 200 µg/mL e CBM de 25 a 200 µg/mL para todas bactérias avaliadas. Dentre todas as bactérias avaliadas, destaca-se *P. gingivalis* (ATCC 49417) apresentando os menores valores de CIM e CBM, (1,56 e 25 µg/mL respectivamente). Além disso, a fração em diclorometano foi bactericida frente as cepas *P. intermedia* (Isolado clínico), *F. nucleatum* (ATCC 10953) e *A. naeslundii* (Isolado clínico). As demais bacterias avaliadas, a amostra apresentou ação bacteriostática (**Tabela 2**).

A fração em acetato, em sua maior concentração avaliada, não foi capaz de inibir o crescimento de *P. intermedia* (Isolado Clínico), *F. nucleatoum* (Isolado Clínico) e *A. naeslundii* (ATCC 19039), assim como a fração *n*-Butanol frente a *P. gingivalis* (Isolado Clínico), *P. intermedia* (Isolado Clínico), *F. nucleatum* (ATCC 10953 e Isolado Clínico) e *A. naeslundii* (ATCC 19039). Essas amostras não foram capazes de eliminar as células das cepas citadas, mesmo na maior concentração avaliada nesse estudo, apresentando CBM > 400 µg/mL. Entretanto, a fração acetato apresentou atividade antibacteriana frente a *P. gingivalis* (ATCC 49417) com valores de CIM e CBM de 12,5 e 25 µg/mL respectivamente, assim como *n*-Butanol frente a mesma bactéria com valores de CIM e CBM de 100 µg/mL (**Tabela 2**).

Já a fração em hexano não apresentou inibição para *F. nucleatum* (ATCC 10953), porém inibiu na maior concentração avaliada (400 µg/mL) 4 das 8 bactérias presentes no teste, demonstrando ação bactericida em 400 µg/mL para essas bactérias. A bactéria que apresentou maior sensibilidade frente a molécula hexano foi *P. gingivalis* (ATCC 49417), onde obteve

CIM de 3,25 µg/mL e CBM de 25 µg/mL. A menor concentração com atividade bactericida da fração foi de 100 µg/mL para *P. gingivalis* (Isolado Clínico) (**Tabela 2**).

Já as substâncias isoladas da própolis vermelha metilvestitol, medicarpina, vestitol, neovestitol, oblongifolina-B e gutiferona -E, os melhores resultados de CIM e CBM foram observados nas substâncias oblongifolina-B e gutiferona-E (**Tabela 3**).

A substância oblongifolina-B inibiu o crescimento bacteriano de todos os microrganismos avaliados nas concentrações de 3,12 a 50 µg/mL, apresentando melhor resultado frente a *P. intermedia* (Isolado clínico), com CIM de 3,12 µg/mL. Além disso, apresentou ação bactericida frente a *P. gingivalis* (ATCC 49417) e *P. intermedia* (ATCC 15033), e bacteriostática frente as demais bactérias. Já a gutiferona-E apresentou valores de CIM de 1,56 a 200 µg/mL, demonstrando ação bactericida frente a *P. intermedia* (ATCC 15033). (**Tabela 3**).

As substâncias isoladas vestitol e neovestitol tiveram desempenho similar na inibição do crescimento bacteriano, apresentando CIM e CBM de 12,5 a 200 µg/mL. A substância isolada Vestitol foi mais efetiva frente a *P. gingivalis* (ATCC 49417) com valores de CIM e CBM de 12,5 e 25 µg/mL. Já a substância neovestitol apresentou os mesmos valores de CIM e CBM de 12,5 e 25 µg/mL frente a *P. gingivalis* (ATCC 49417) e *P. intermedia* (ATCC 15033). Além disso, essa molécula foi bactericida frente a *P.gingivalis* (Isolado clínico) na concentração de 100 µg/mL (**Tabela 3**).

Metilvestitol demonstrou atividade frente a *P. gingivalis* (ATCC 49417), *P. gingivalis* (Isolado Clínico) e *P. intermedia* (ATCC 15033) com valores de CIM e CBM que variaram de 25 a 400 µg/mL. Os menores resultados foram para *P. gingivalis* (ATCC 49417), com efeito bactericida na concentração de 25 µg/mL. Os menores resultados de CIM da molécula medicarpina foram de 50 µg/mL e CBM 100 µg/mL para *P. gingivalis* (ATCC 49417) e *P. intermedia* (ATCC 15033 e Isolado Clínico) (**Tabela 3**).

Tabela 2: Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato bruto e suas frações frente a bactérias causadoras de periodontite avaliadas neste estudo.

Microrganismo	Resultados expressos em µg/mL									
	Extrato bruto		Diclorometano		Acetato		Hexano		n-Butanol	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 49417)	3,12	100	1,56	25	12,5	25	3,12	25	100	100
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Isolado clínico)	12,5	25	25	100	400	400	100	100	>400	>400
<i>Prevotella intermedia</i> (ATCC 15033)	6,25	25	6,25	25	200	200	200	200	200	200
<i>Prevotella intermedia</i> (Isolado clínico)	50	50	100	100	>400	>400	400	400	>400	>400
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (ATCC 10953)	100	100	200	200	400	400	>400	>400	>400	>400
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (Isolado clínico)	12,5	50	12,5	100	>400	>400	400	400	>400	>400
<i>Actinomyces naeslundii</i> (ATCC 19039)	25	25	25	100	>400	>400	400	400	>400	>400
<i>Actinomyces naeslundii</i> (Isolado clínico)	100	100	100	100	400	400	400	400	400	400

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das substâncias isoladas da própolis vermelha brasileira frente a bactérias causadoras de periodontite avaliadas neste estudo.

Resultados expressos em µg/mL												
Microrganismo	Metilvestitol		Medicarpina		Vestitol		Neovestitol		Oblongifolina-B		Gutiferona-E	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 49417)	25	25	50	100,0	12,5	25	12,5	25	12,5	12,5	1,56	12,5
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Isolado clínico)	100	400	200	400	100	200	100,0	100,0	6,25	12,5	6,25	12,5
<i>Prevotella intermedia</i> (ATCC 15033)	50	50	50	100	25	100	12,5	25	50	50	200	200
<i>Prevotella intermedia</i> (Isolado clínico)	>400	>400	50	100	100	200	50	100	3,12	12,5	3,12	12,5
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (ATCC 10953)	>400	>400	100	100	100	200	50	100	6,25	12,5	12,5	25
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (Isolado clínico)	>400	>400	>400	>400	200	400	100	200	50	200	50	200
<i>Actinomyces naeslundii</i> (ATCC 19039)	400	400	100	200	200	400	50	100	6,25	100	6,25	12,5
<i>Actinomyces naeslundii</i> (Isolado clínico)	>400	>400	>400	>400	200	400	100	200	25,0	50	50	100

4.2. Padronização da formação de biofilme

Nos testes de padronização do biofilme foi observado que todas as bactérias selecionadas a partir de 3 dias de incubação em condições de anaeorbiose em todas as concentrações de 10^6 a 10^9 UFC/mL foram capazes de formar biofilme. A partir desses resultados, foi selecionado o melhor cenário de formação de biofilme em 3 dias de incubação com concentração de 10^6 UFC/mL. Todos os resultados estão demonstrados nas **Figuras 1 e 2**.

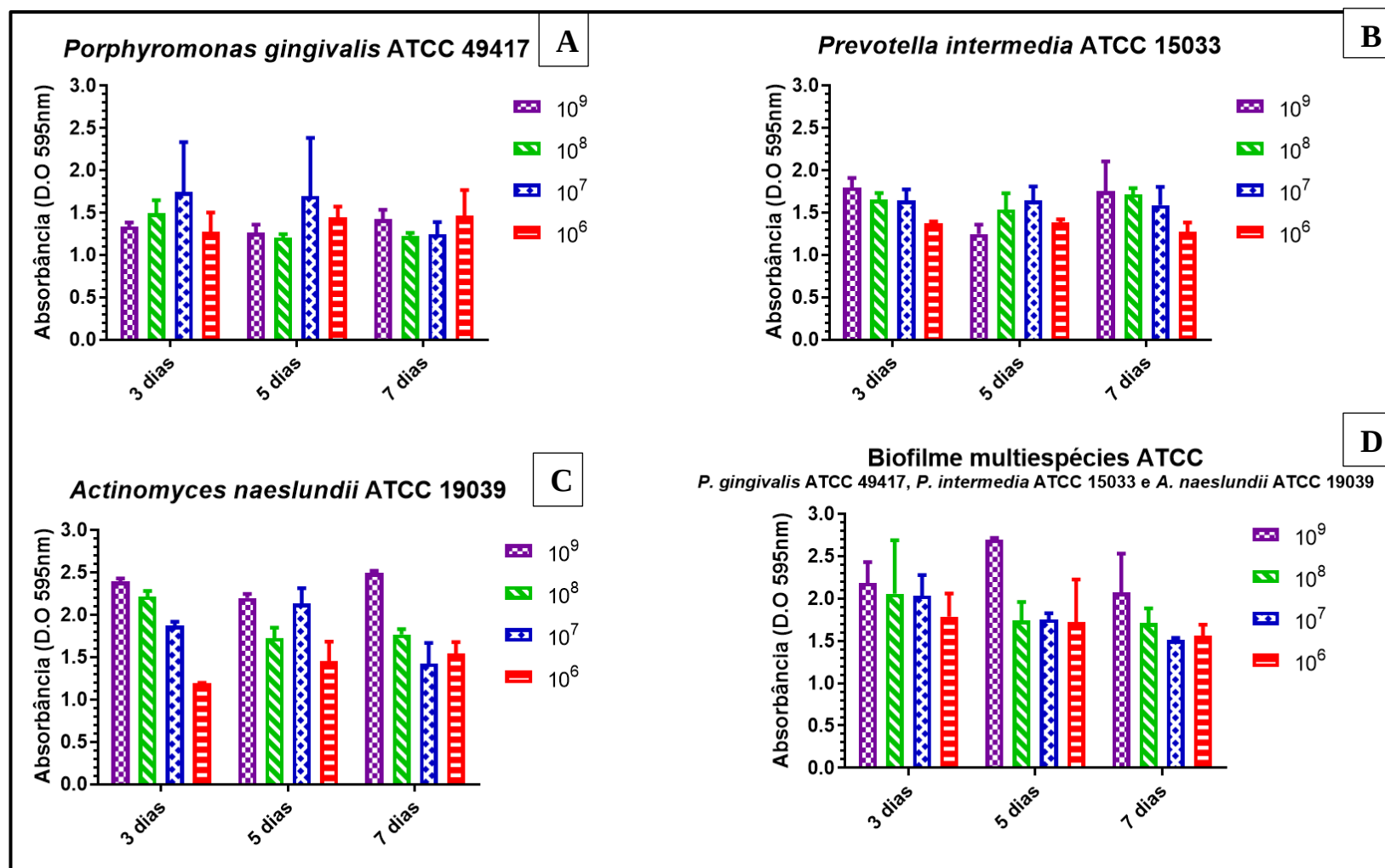


Figura 1. Padronização da formação de biofilme monoespécie e multiespécie de cepas ATCC sem tratamento em diferentes concentrações de inóculo e em 3, 5 e 7 dias de incubação. **A:** *P. gingivalis* (ATCC 49417). **B:** *P. intermedia* (ATCC 15033). **C:** *A. naeslundii* (ATCC 19039). **D:** Biofilme multiespécie ATCC (*P. gingivalis* (ATCC 49417) + *P. intermedia* (ATCC 15033) + *A. naeslundii* (ATCC 19039))

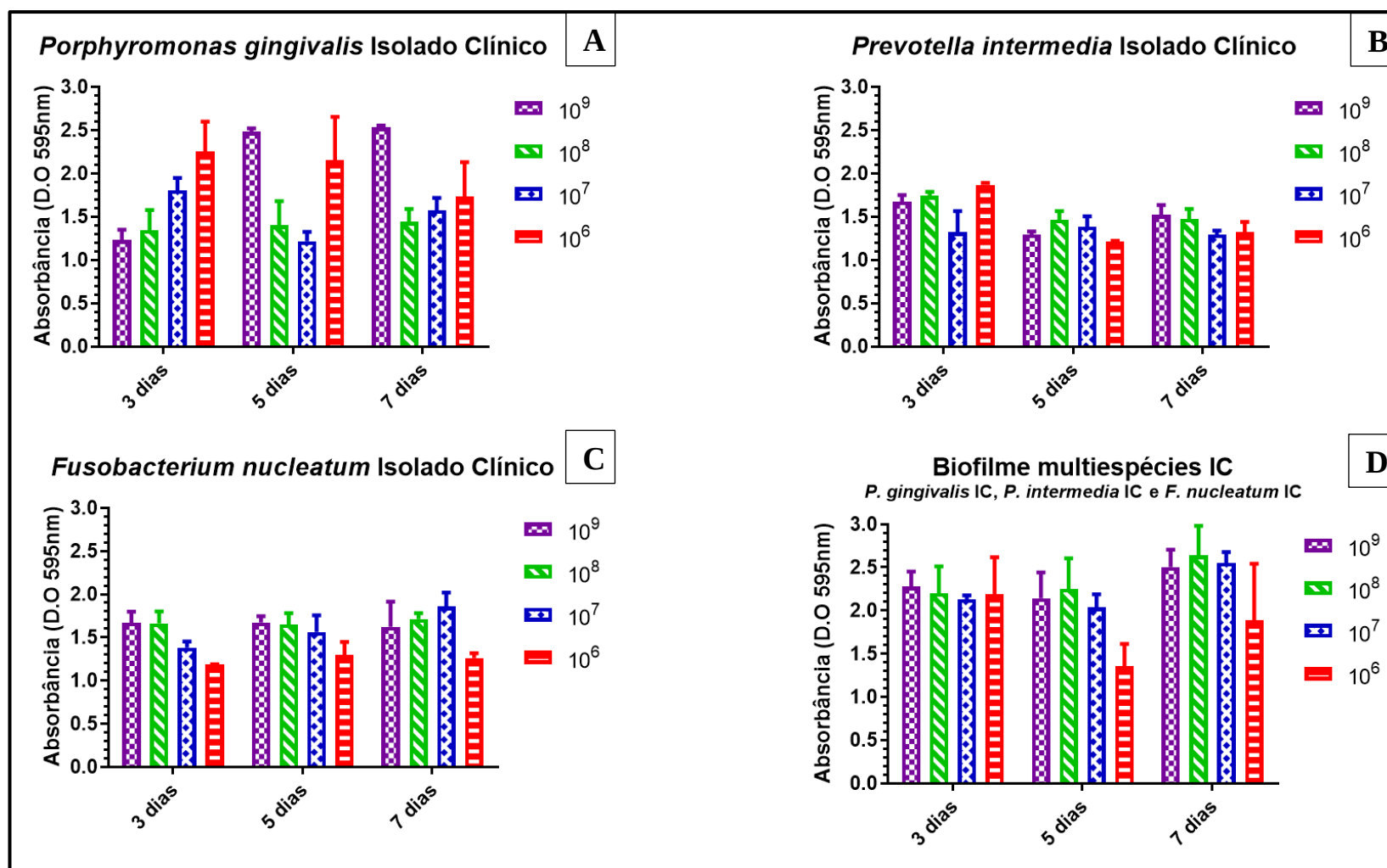


Figura 2. Padronização da formação de biofilme monoespécie e multiespécie de cepas Isolado Clínico sem tratamento em diferentes concentrações de inóculo e em 3, 5 e 7 dias de incubação. **A:** *P. gingivalis* (Isolado Clínico). **B:** *P. intermedia* (Isolado Clínico). **C:** *F. nucleatum* (Isolado Clínico). **D:** Biofilme multiespécie Isolado Clínico (*P. gingivalis* (Isolado Clínico) + *P. intermedia* (Isolado Clínico) + *F. nucleatum* (Isolado Clínico))

4.3. Inibição da formação de biofilme pela quantificação de biomassa (CIMB₅₀) e viabilidade celular

Os resultados da CIMB₅₀ frente aos biofilmes monoespécies variaram de 3,12 a 12,5 µg/mL para extrato bruto, 0,78 a 25 µg/mL para gutiferona-E e de 0,78 a 100 µg/mL para oblongofolina-B com inibição de 50% ou mais da formação do Biofilme para todas as cepas avaliadas (**Figuras 3 a 10**).

Para a bactéria *P. gingivalis* (ATCC 49417) os valores encontrados da CIMB₅₀ frente ao extrato bruto hidroalcoólico, gutiferona-E e Oblongofolina-B foram de 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL e 12,5 µg/mL respectivamente. Já os valores de viabilidade celular frente as mesmas substâncias foram de 50 µg/mL para extrato bruto e gutiferona-E e 6,25 µg/mL para oblongifolina-B. Metronidazol apresentou valores de CIMB₅₀ e viabilidade celular de 5,9 µg/mL (**Figura 3**).

A **Figura 4** demonstra o valor de CIMB₅₀ do extrato bruto hidroalcoólico frente a *P. intermedia* (ATCC 15033) na concentração 6,25 µg/mL e viabilidade celular >400. Já a molécula isolada gutiferona-E demonstrou CIMB₅₀ e viabilidade celular de 3,12 µg/mL. Oblongofolina-B demonstrou resultado de CIMB₅₀ de 1,56 µg/mL e viabilidade celular de 12,5 µg/mL. O antibiótico metronidazol frente a essa mesma cepa bacteriana demonstrou valor de CIMB₅₀ e viabilidade celular de 5,9 µg/mL.

Os valores de CIMB₅₀ para as amostras extrato bruto hidroalcoólico frente ao biofilme formado por *A. naeslundii* (ATCC 19039) foi de 3,12 µg/mL, já as amostras gutiferona-E e oblongifolina-B obtiveram o mesmo valor de 0,78 µg/mL. Ademais, os resultados de viabilidade celular para extrato bruto, guriferona-E e oblongifolina-B foram respectivamente 400 µg/mL, 0,78 µg/mL e 3,12 µg/mL. O antibiótico metronidazol apresentou valores de CIMB₅₀ de 5,9 µg/mL e viabilidade celular de 2,95 µg/mL conforme apresentado na **Figura 5**.

Na avaliação do extrato bruto avaliado frente ao biofilme formado pela cepa *P. gingivalis* (Isolado Clínico) apresentou atividade antibiofilme com valores de CIMB₅₀ de 12,5 µg/mL e viabilidade celular de 400 µg/mL, já a molécula isolada gutiferona-E apresentou CIMB₅₀ e viabilidade celular de 1,56 µg/mL. Por fim, a amostra oblongifolina-B apresentou CIMB₅₀ de 100 µg/mL e viabilidade celular de 6,25 µg/mL. O teste com metronidazol como controle apresentou resultados de CIMB₅₀ e viabilidade celular de 5,9 µg/mL frente ao biofilme da cepa em questão analisada (**Figura 6**).

Analizando o biofilme formado por *F. nucleantum* (Isolado Clínico) e a atividade antibiofilme das três amostras selecionadas, extrato bruto hidroalcoólico apresentou valor de CIMB₅₀ de 6,25 µg/mL e viabilidade celular de 25 µg/mL. Gutiferona-E teve atividade antibiofilme e os resultados de CIMB₅₀ foi de 25 µg/mL e viabilidade celular 12,5 µg/mL. Já a molécula oblongifolina-B demonstrou valores de CIMB₅₀ e viabilidade celular de 25 µg/mL frente ao biofilme de *F. nucleantum* (Isolado Clínico). Os resultados do antibiótico foram de 5,9 µg/mL para CIMB₅₀ e viabilidade celular (**Figura 7**).

Para a avaliação das amostras frente ao biofilme formado por *P. intermedia* (Isolado Clínico), a amostra extrato bruto hidroalcoólico apresentou valor de CIMB₅₀ 12,5 µg/mL e viabilidade celular 25 µg/mL. Já as amostras gutiferona-E e oblongifolina-B apresentaram ambas CIMB₅₀ e viabilidade celular de 25 µg/mL. O antibiótico metronidazol demonstrou valores de CIMB₅₀ e viabilidade celular de 5,9 µg/mL (**Figura 8**).

No estudo do ensaio da junção das três bactérias ATCC, formando o biofilme multiespécie ATCC (*P. gingivalis* (ATCC 49417) + *P. intermedia* (ATCC 15033) + *A. naeslundii* (ATCC 19039)) possibilitou a avaliação da atividade antibiofilme das amostras em um cenário onde extrato bruto hidroalcoólico apresentou valor de CIMB₅₀ de 6,25 µg/mL e viabilidade celular de 200 µg/mL. Gutiferona-E obteve, tanto para CIMB₅₀ como para viabilidade celular, a concentração de 3,12 µg/mL. A molécula isolada oblongifolina-B apresentou CIMB₅₀ e viabilidade celular de 1,56 µg/mL e 25 µg/mL respectivamente. Para o metronidazol foi obtido 2,95 µg/mL de CIMB₅₀ e 5,9 µg/mL de viabilidade celular (**Figura 9**).

Na **Figura 10** é demonstrado que a amostra extrato bruto hidroalcoólico, frente ao biofilme multiespécie formado por cepas Isolado Clínico (*P. Gingivalis* + *F. nucleantum* + *P. intermedia*) apresentou valores de CIMB₅₀ 6,25 µg/mL e viabilidade celular 100 µg/mL. Já gutiferona-E obteve resultados de CIMB₅₀ 100 µg/mL e viabilidade celular 50 µg/mL, enquanto oblongifolina-B apresentou valor de CIMB₅₀ e viabilidade celular de 50 µg/mL para o biofilme em questão. Na mesma figura é representado o metronidazol obteve resultados de CIMB₅₀ 2,95 µg/mL e viabilidade celular 5,9 µg/mL.

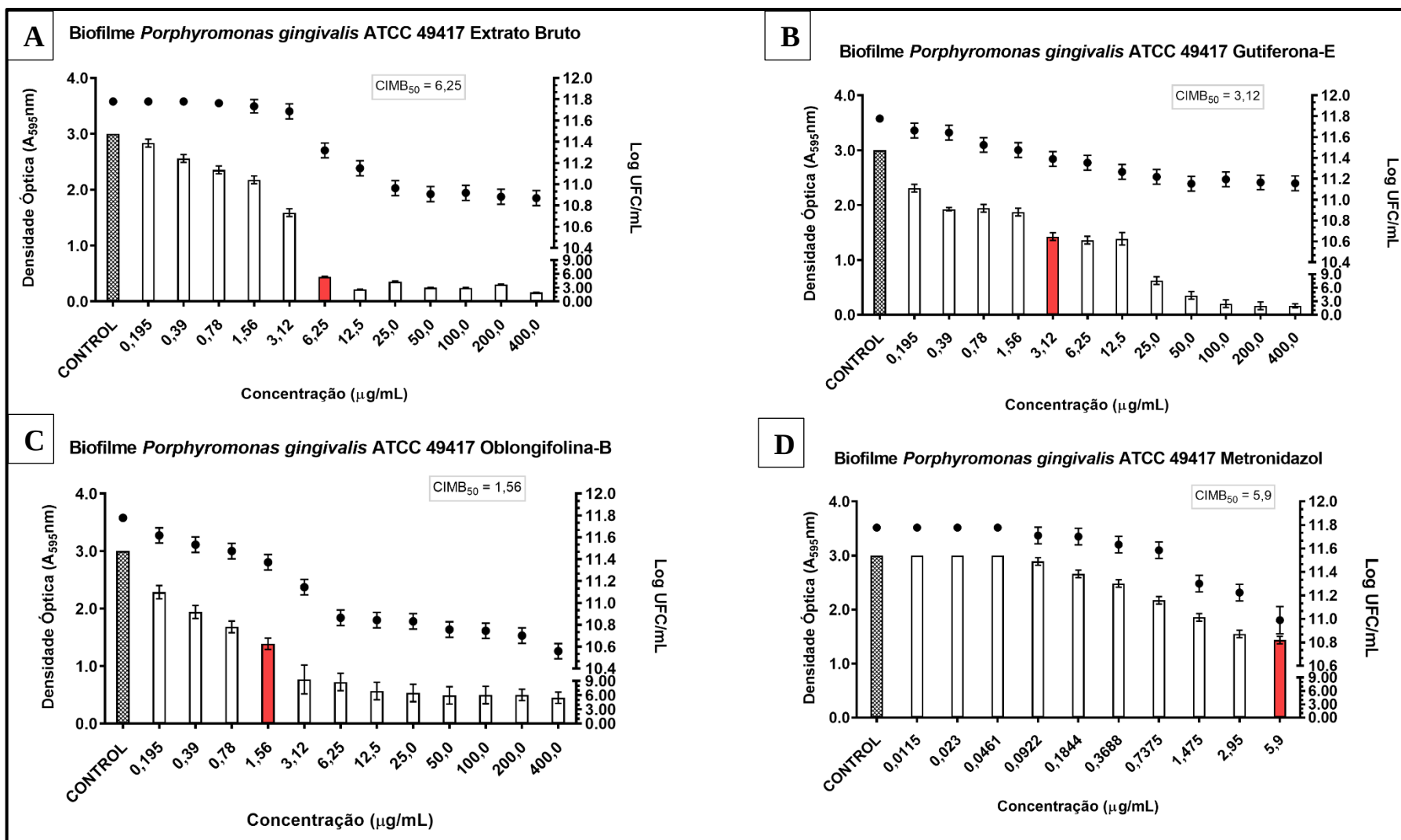


Figura 3: Inibição da formação de biofilme monoespécie e número de células viáveis. Atividade antibiofilme de extrato bruto, gutiferona-E, oblongifolina-B e metronidazol frente a *P. gingivalis* (ATCC 49417). **A:** extrato bruto. **B:** gutiferona-E. **C:** oblongifolina-B. **D:** metronidazol

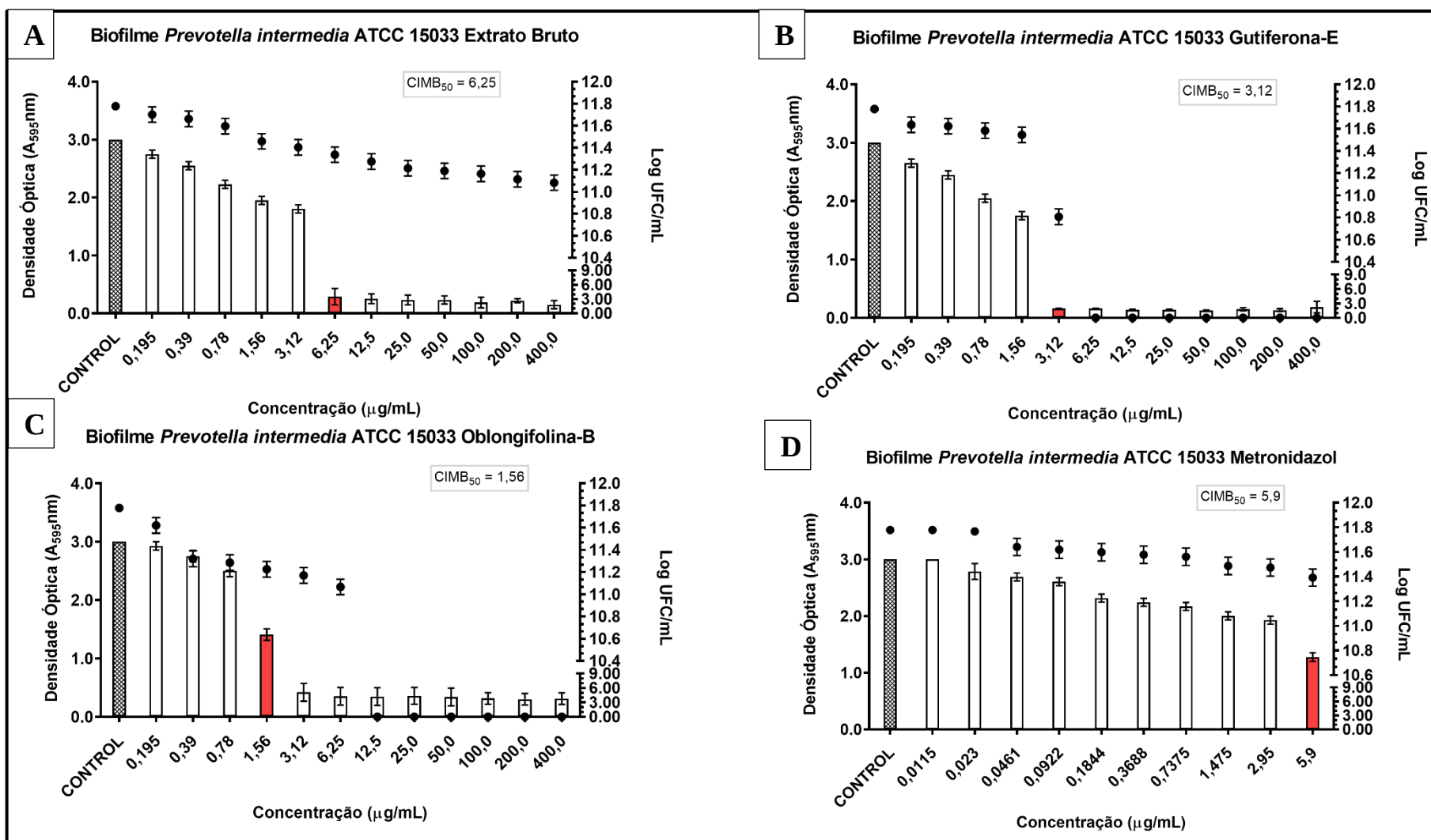


Figura 4: Inibição da formação de biofilme monoespécie e número de células viáveis. Atividade antibiofilme de extrato bruto, gutiferona-E, oblongifolina-B e metronidazol frente a *P. intermedia* (ATCC 15033). **A:** extrato bruto. **B:** gutiferona-E. **C:** oblongifolina-B. **D:** metronidazol

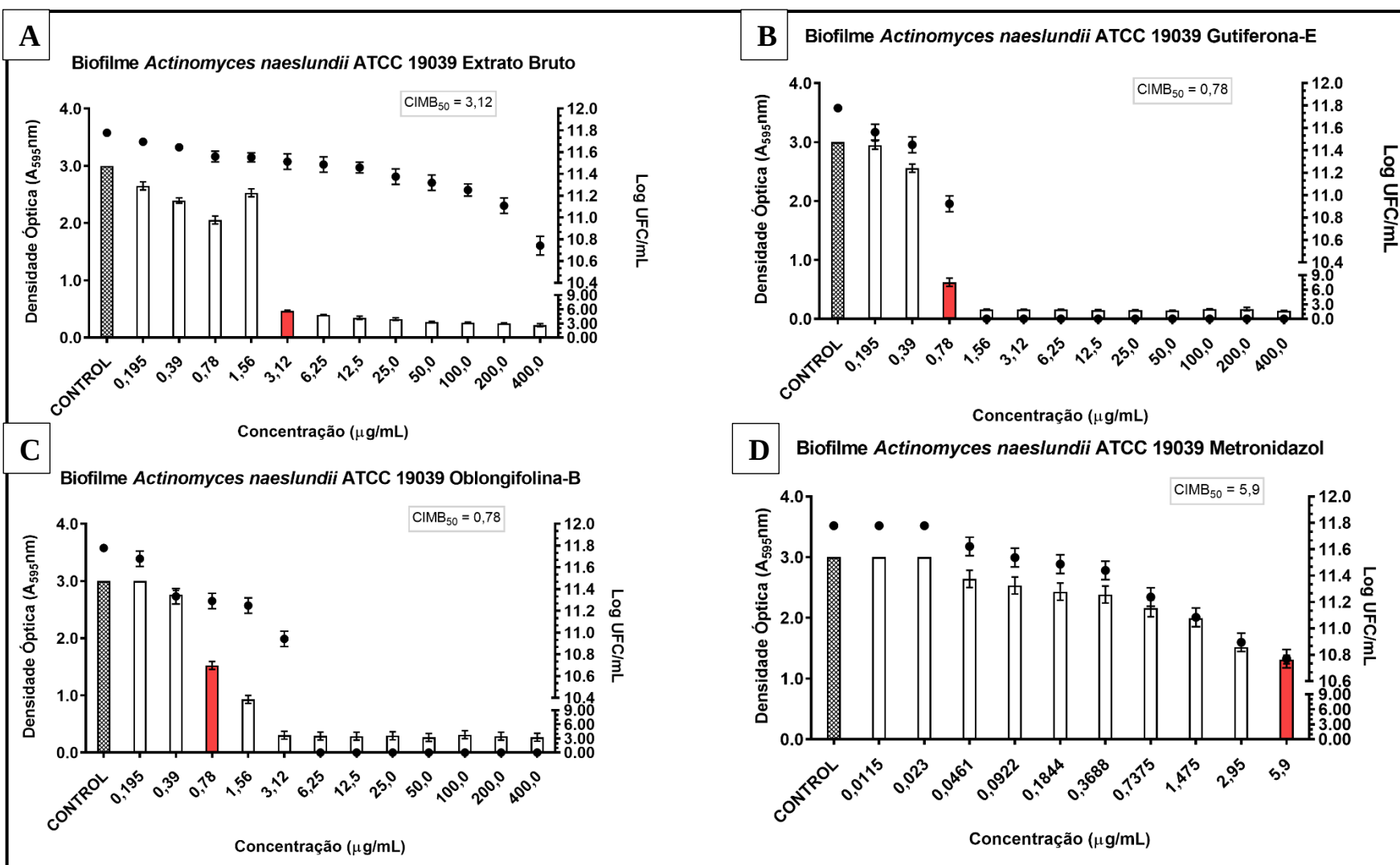


Figura 5: Inibição da formação de biofilme monoespécie e número de células viáveis. Atividade antibiofilme de extrato bruto, gutiferona-E, oblongifolina-B e metronidazol frente a *A. naeslundii* (ATCC 19039). **A:** extrato bruto. **B:** gutiferona-E. **C:** oblongifolina-B. **D:** metronidazol

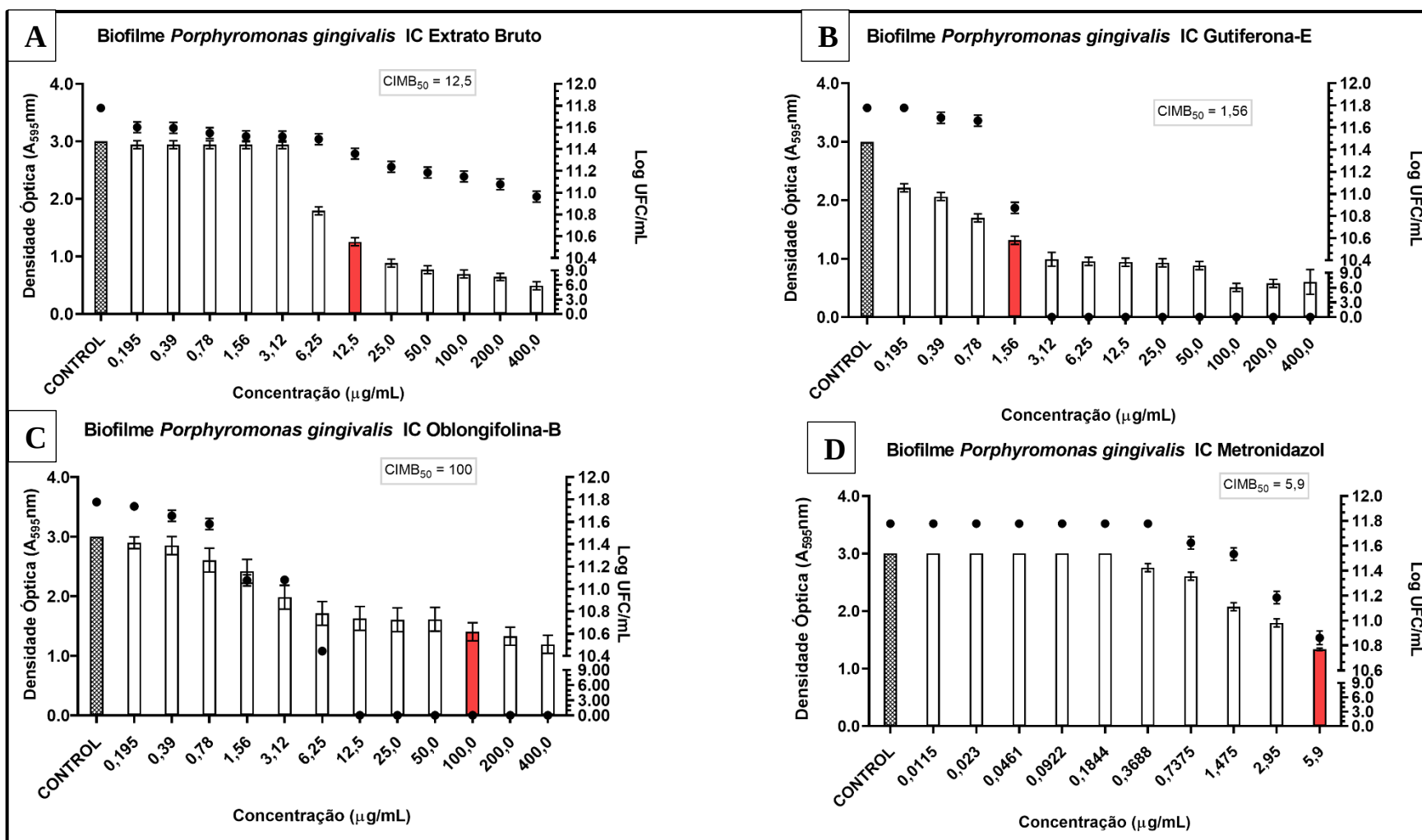


Figura 6: Inibição da formação de biofilme monoespécie e número de células viáveis. Atividade antibiofilme de extrato bruto, gutiferona-E, oblongifolina-B e metronidazol frente a *P. gingivalis* (Isolado Clínico). **A:** extrato bruto. **B:** gutiferona-E. **C:** oblongifolina-B. **D:** metronidazol

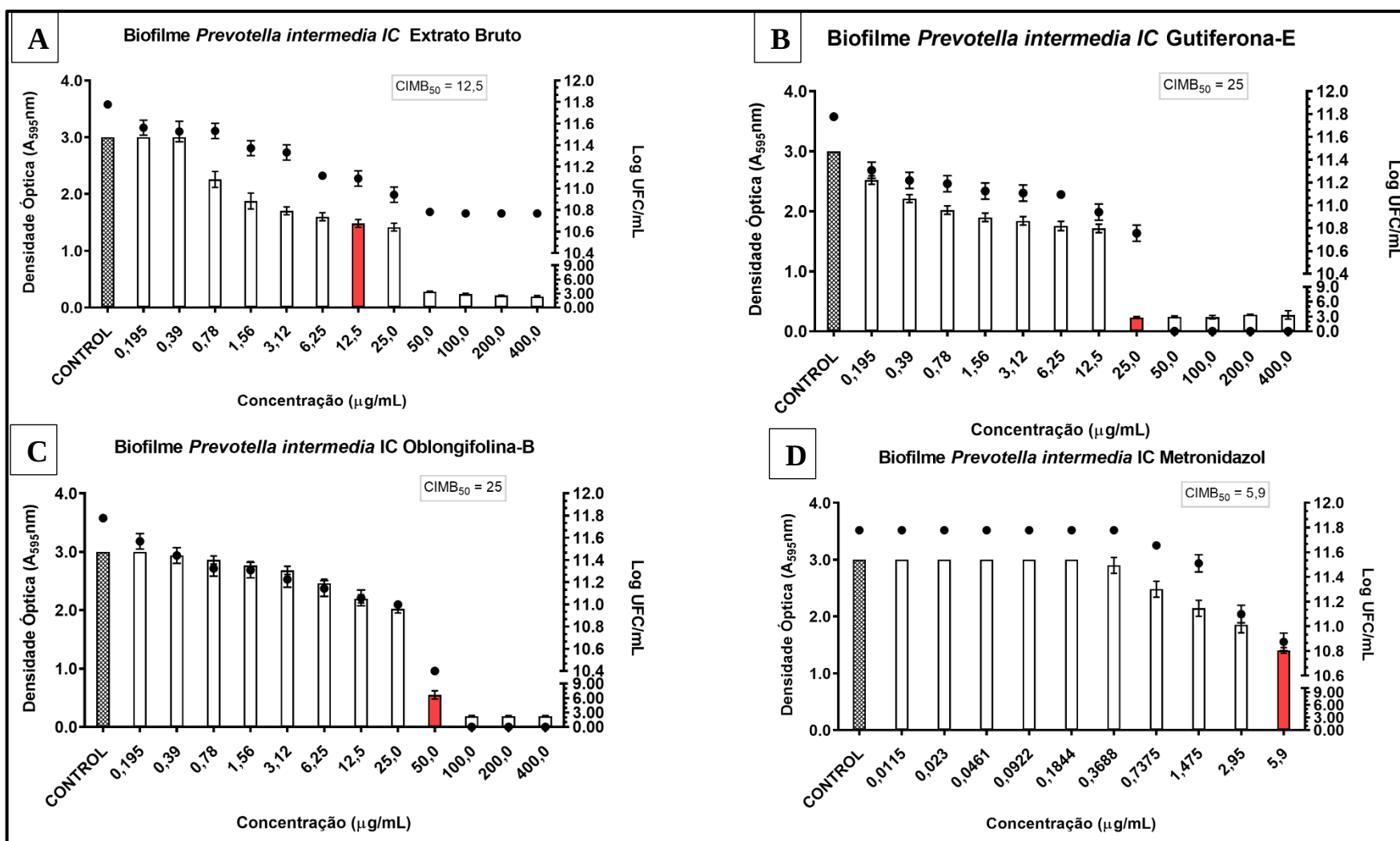


Figura 7: Inibição da formação de biofilme monoespécie e número de células viáveis. Atividade antibiofilme de extrato bruto, gutiferona-E, oblongifolina-B e metronidazol frente a *P. intermedia* (Isolado Clínico). **A:** extrato bruto. **B:** gutiferona-E. **C:** oblongifolina-B. **D:** metronidazol

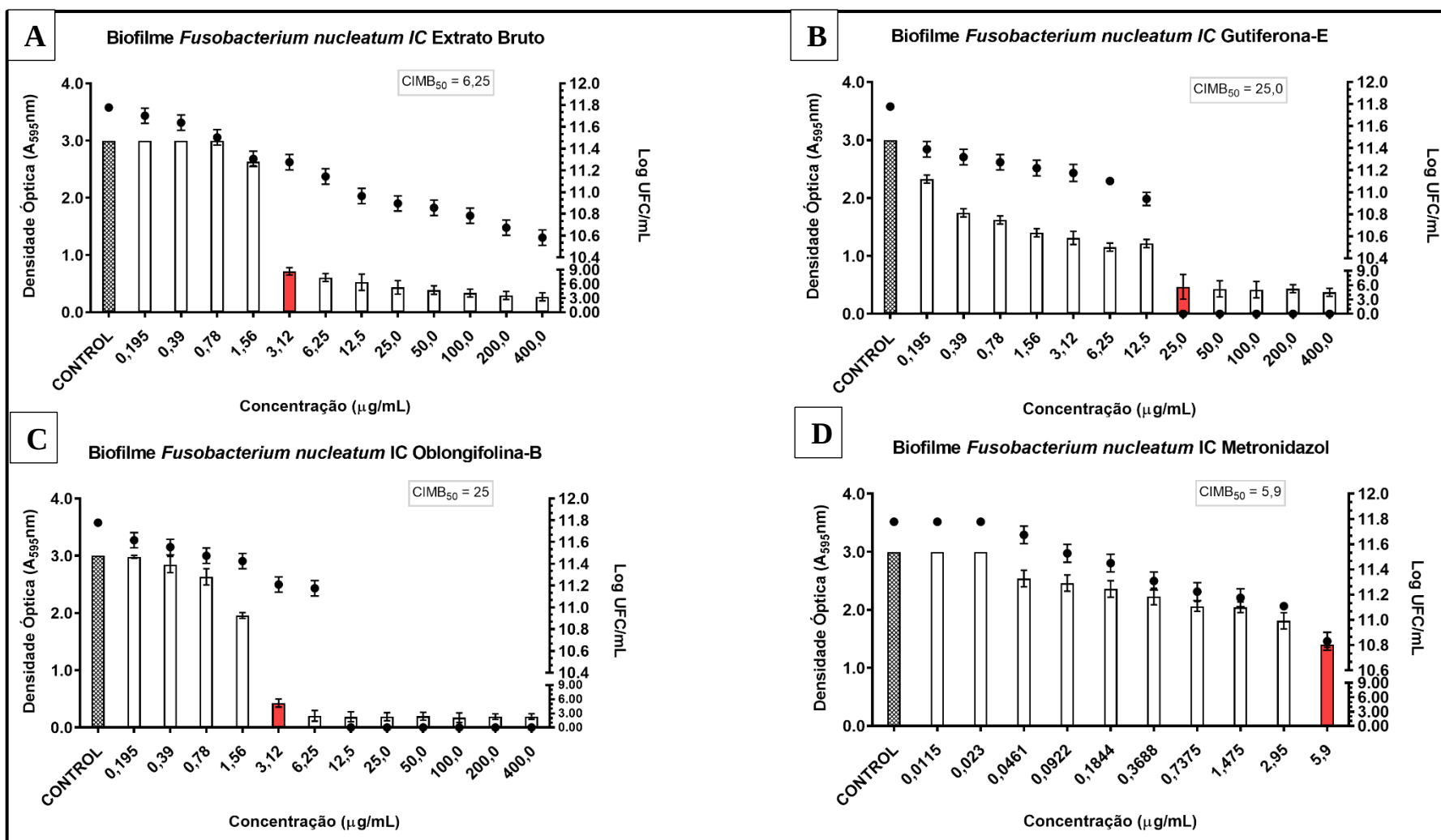


Figura 8: Inibição da formação de biofilme monoespécie e número de células viáveis. Atividade antibiofilme de extrato bruto, gutiferona-E, oblongifolina-B e metronidazol frente a *F. nucleatum* (Isolado Clínico). **A:** extrato bruto. **B:** gutiferona-E. **C:** oblongifolina-B. **D:** metronidazol

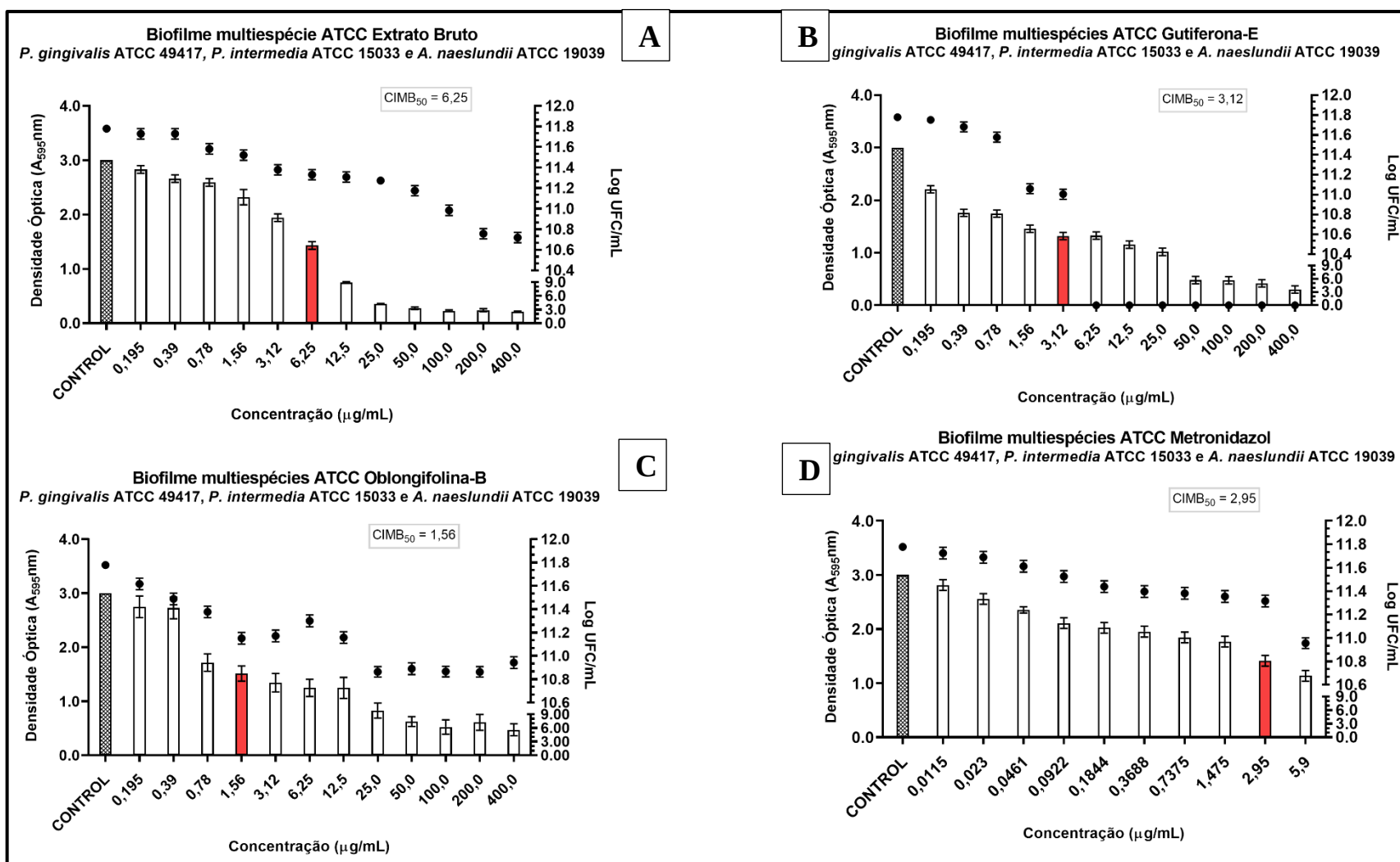


Figura 9: Inibição da formação de biofilme multiespécies e número de células viáveis. Atividade antibiofilme de extrato bruto, gutiferona-E, oblongifolina-B e metronidazol frente a biofilme multiespécie ATCC. **A:** extrato bruto. **B:** gutiferona-E. **C:** oblongifolina-B. **D:** metronidazol

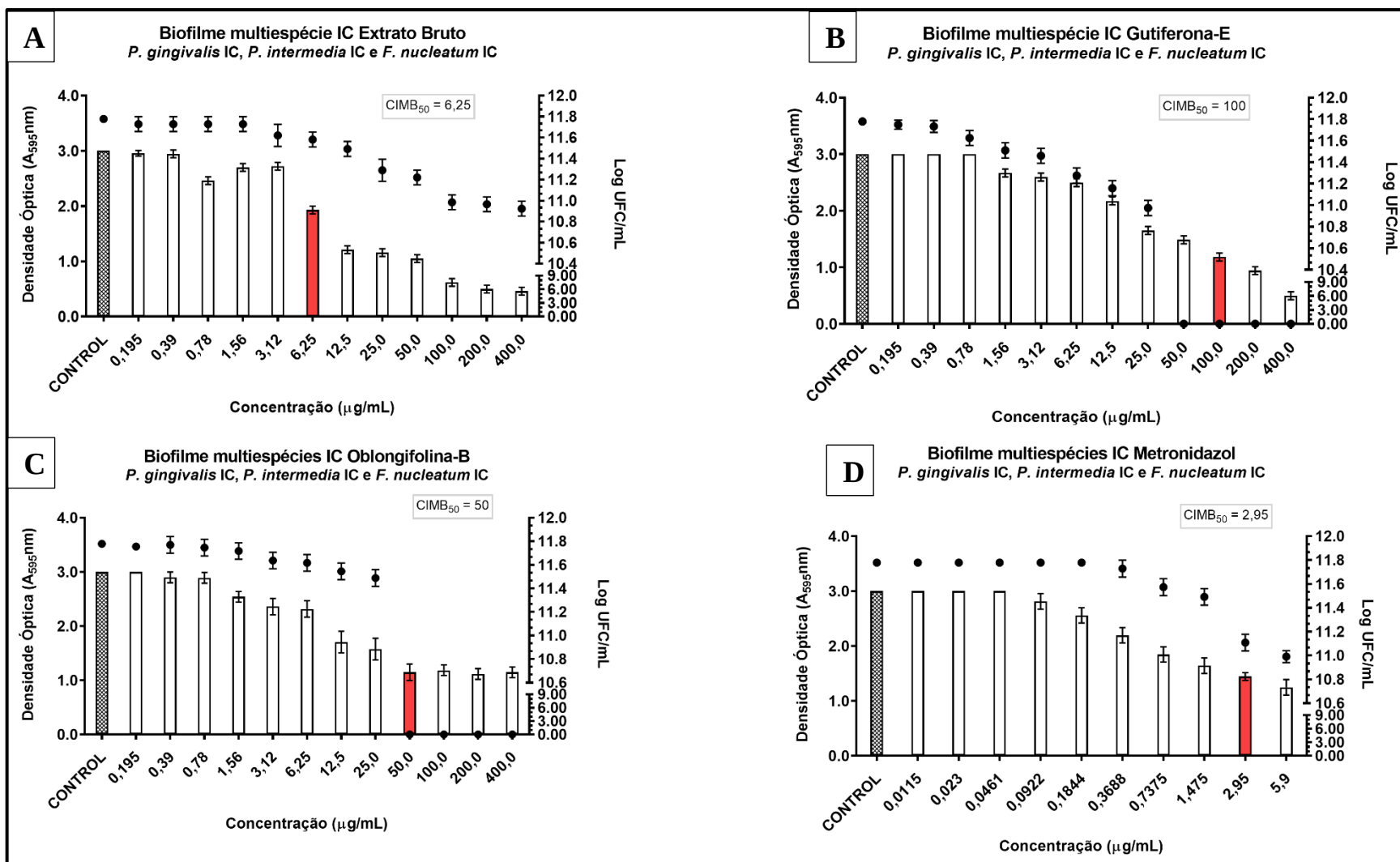


Figura 10: Inibição da formação de biofilme e número de células viáveis. Atividade antibiofilme de extrato bruto, gutiferona-E, oblongifolina-B e metronidazol frente a biofilme multiespécie Isolado Clínico. **A:** extrato bruto. **B:** gutiferona-E. **C:** oblongifolina-B. **D:** metronidazol

5. DISCUSSÃO

Por muitos anos, a própolis foi utilizada para tratar infecções na medicina popular, e seu potencial antimicrobiano tem sido demonstrado pela comunidade científica (REIS *et al.*, 2019). Segundo Rios e Recio (2005) e Gibbons (2018), valores de CIM abaixo de 100 µg/mL para extrato bruto hidroalcoólico ou abaixo 10 µg/mL para compostos isolados são considerados promissores ao avaliar a atividade antibacteriana de extratos de plantas, óleos essenciais e compostos isolados de fontes naturais.

Com base nesses critérios e considerando os valores de CIM aqui apresentados para todas as amostras de própolis vermelha brasileira avaliadas, o extrato bruto hidroalcoólico e os compostos isolados gutiferona-E e oblongifolina-B apresentaram a melhor atividade de inibição frente a maioria das bactérias avaliadas. Entre as amostras promissoras, não foi incluída a fração diclorometano do extrato bruto hidroalcoólico, porque o extrato bruto consistia em frações, e a fração diclorometano faz parte da composição do extrato bruto hidroalcoólico podendo gerar os mesmos resultados, então decidimos dar prosseguimento para a próxima etapa apenas com o extrato bruto hidroalcoólico e os compostos isolados oblongifolina-B e gutiferona-E.

Essas amostras apresentaram atividade antibacteriana principalmente frente a bactérias *P. gingivalis* (ATCC 49417), considerada a espécie clinicamente mais importante no desenvolvimento da doença periodontal (YOSHIMASU *et al.*, 2018) e *F. nucleatum* (Isolado Clínico), também considerada um importante patógeno, uma vez que piora a inflamação gengival e a perda dentária (HAN *et al.*, 2015). Esses resultados demonstraram a relevância desses produtos naturais no controle e tratamento futuro da doença periodontal.

Para as demais bactérias avaliadas, os valores de CIM (1,56 a 400 µg/mL) foram significativamente menores em relação aos dados da literatura. Bueno-Silva e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato bruto e dos compostos isolados neovestitol e vestitol obtidos de própolis vermelha brasileira de mesma origem botânica frente a *A. naeslundii* (ATCC 12104), e relataram valores de CIM de 25, 25 e 50 µg/mL, respectivamente. Já para valores de CBM foram relatados 50, 50 e 100 µg/mL respectivamente, devido a necessidade de concentrações maiores para eliminar todas as células presentes. Neste trabalho, neovestitol e vestitol não foram promissores frente a várias das bactérias periodontais avaliadas, pois a atividade antibacteriana da própolis vermelha e suas substâncias isoladas é dependente sazonalidade e da coleta. Outro ponto a destacar é que o valor de CIM para o extrato

bruto relatado por Bueno-Silva e colaboradores (2013) frente a *A. naeslundii* (ATCC 12104) se assemelha ao valor que foi obtido nesse estudo frente a *A. naseslundii* (ATCC 19039), sugerindo uma relação de suscetibilidade da espécie para o extrato bruto.

A determinação da CIM/CBM é recomendada para avaliar e selecionar agentes antimicrobianos eficazes e promissores (SCHNURR *et al.*, 2015). Entretanto, esse modelo de ensaio se apresenta limitado, pois é realizado avaliando microrganismos no estado planctônico, sendo necessário realizar outros testes complementares no modo de biofilme para se aproximar o máximo possível da realidade da microbiota bucal (WILSON *et al.*, 2019).

Outro estudo também avaliou a atividade antibacteriana do extrato bruto de própolis vermelha e foram relatados valores de CBM entre 62,5 a 500 µg/mL em bactérias gram-negativas (Souza *et al.*, 2021). Em relação ao presente estudo, os valores apresentados foram mais promissores para o extrato bruto obtendo concentração mínima de CBM em 25 µg/mL e ação bactericida em 100 µg/mL.

Santos e colaboradores (2002) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico aquoso e frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) obtidos de outro tipo de própolis, da região de Cachoeira da Prata, Minas Gerais – Brasil, também coletada pelas abelhas *Apis mellífera*. As bactérias testadas nesse estudo foram periodontais *F. nucleatum* (ATCC 10953), *P. gingivalis* (ATCC 33277) e *P. intermedia* (ATCC 25611). O extrato mostrou valores de CIM de 1024, 256 e 256 µg/mL frente a *F. nucleatum* (ATCC 10953), *P. gingivalis* (ATCC 33277) e *P. intermedia* (ATCC 25611), respectivamente. Quanto às frações, os valores de CIM variaram de 512 a >1024 µg/mL. Os resultados de CIM frente a essas bactérias foram superiores aos apresentados neste estudo para o extrato bruto hidroalcoólico e frações frente à mesma espécie bacteriana, mas de cepas diferentes: apresentando valores de CIM de 100, 3,12 e 6,25 µg/mL para o extrato bruto hidroalcoólico frente a *F. nucleatum* (ATCC 10953), *P. gingivalis* (ATCC 49417) e *P. intermedia* (ATCC 15033), respectivamente. Quanto às frações, foram encontrados no presente estudo valores de CIM variando de 12 a 400 µg/mL frente a mesma bactéria. Portanto, em comparação com os resultados descritos por esses autores, o extrato hidroalcoólico bruto e as frações aqui empregadas foram mais eficazes frente a bactérias periodontais.

Shabbir e colaboradores (2016) avaliaram a atividade do extrato bruto de própolis coletado em Skardu (Paquistão) proveniente de *Robinia pseudoacacia*, *Elegnus agustifolia* (azeitona russa) e *Acacia modesta*, coletadas de abelhas *Apis mellifera*. Os produtos naturais

proporcionaram valores de CIM variando de 64 a 512 µg/mL frente a isolados clínicos de *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Nossos resultados sugerem que a própolis vermelha brasileira é mais eficaz do que a própolis usada por Shabbir e colaboradores (2016), uma vez que os valores de CIM obtidos para o extrato bruto hidroalcoólico da própolis vermelha brasileira frente a isolados clínicos de *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram menores (12,5 e 6,25 µg/mL, respectivamente). Portanto, a própolis vermelha brasileira mostrou-se com atividade mais promissora do que a própolis de outros países, uma vez que é composta por compostos únicos que normalmente não ocorrem em outros tipos de própolis (REIS *et al.*, 2019).

A inibição da formação de biofilme por essas bactérias pode contribuir para a redução da periodontite. De fato, Al-Ahmad e colaboradores (2007) descreveram que *A. naeslundii* e *F. nucleatum* desempenham os papéis de bactéria colonizadora inicial e colonizadora tardia, respectivamente. Esta última bactéria mostrou-se presente em taxas superiores a 50% após 62 horas de formação do biofilme, contribuindo para o aumento da inflamação e perda dentária (AL-AHMAD *et al.*, 2007).

Outros estudos avaliaram a atividade antibiofilme monoespécie da própolis vermelha brasileira frente a outros tipos de bactérias. De Souza Silva e colaboradores (2021) avaliaram a atividade antibiofilme do extrato bruto hidroalcoólico da própolis vermelha brasileira (coletado na mesma região da utilizada em nosso estudo) revestido em nanopartículas poliméricas frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O extrato bruto hidroalcoólico da própolis vermelha brasileira livre e o extrato revestido em nanopartículas inibiram o biofilme formado pelas cepas Gram-positivas de forma mais eficaz em comparação com o biofilme formado pelas cepas Gram-negativas, com valores de concentração inibitória do biofilme variando de 15,6 a 125 µg/mL frente às cepas de *S. aureus* e de 100 a 1560 µg/mL frente a cepa de *P. aeruginosa*. Em nossos achados verificamos os menores valores de CIMB₅₀ frente à bactéria Gram-positiva *A. naeslundii* (ATCC 19039) 3,12 µg/mL para o extrato bruto e 0,78 µg/mL para os compostos isolados oblongifolina-B e gutiferona-E.

Miranda e colaboradores (2019) avaliaram a atividade antibiofilme do extrato bruto hidroalcoólico da própolis vermelha brasileira da mesma origem botânica da que foi utilizada nesse estudo. Esses autores dividiram as bactérias avaliadas em complexos (Actinomyces, roxo, amarelo, verde, laranja, vermelho e outros). Nas concentrações de extrato de 800 e 1.600 µg/mL, os autores mostraram uma diminuição de 40 e 45% na atividade metabólica dos

biofilmes multiespécies formados por esses complexos, respectivamente. de Figueiredo e colaboradores (2020) também avaliaram a atividade antibiofilme do extrato bruto da própolis vermelha brasileira em 1600, 800 e 400 µg/mL e obtiveram 56, 56 e 57% de redução na atividade metabólica do biofilme, respectivamente.

O presente estudo não avaliou a erradicação, mas avaliou a capacidade das amostras da própolis vermelha brasileira de inibir a formação de biofilme. De acordo com Wei e colaboradores (2006) inibir a formação do biofilme é muito mais importante do que erradicá-lo porque a inibição da formação do biofilme impede o crescimento bacteriano e, portanto, a maturação bacteriana. Os resultados aqui apresentados demonstraram que as amostras de própolis vermelha brasileira inibiram a formação de biofilmes multiespécies por bactérias periodontais em pelo menos 50%. Oblongifolina-B deu o menor valor de CIMB₅₀ (1,56 µg/mL) frente ao biofilme multiespécie formado pelas cepas ATCC. Quanto ao biofilme multiespécie formado pelos isolados clínicos, o menor valor de CIMB₅₀ foi de 6,25 µg/mL. Esses resultados sugerem que os compostos isolados oblongifolina-B e gutiferona-E inibiram todas as células viáveis da maioria dos biofilmes monoespécies e multiespécies formados pelas bactérias incluídas neste estudo. Isso apontou que as amostras da própolis vermelha brasileira podem inibir a formação de biofilme e atingir as células dessa comunidade bacteriana, eliminando-as e deixando apenas o conjugado glicoproteico sem células vivas (MIRANDA *et al.*, 2019).

Considerando que bactérias em modo Biofilme podem ser 10 a 1000 vezes mais resistentes a um determinado agente antimicrobiano quando comparados às mesmas células em modo planctônico (OQUE-BORDA *et al.*, 2021), os resultados evidenciados aqui são considerados promissores e confirmam o potencial da própolis vermelha e suas substâncias isoladas na atuação como agente Inibitório de Biofilmes. Estudos comprovam que as bactérias incorporadas nas matrizes polissacarídeos são muito mais resistentes aos antibióticos se comparadas às células planctônicas, essas matrizes funcionam como uma barreira impedindo que os agentes antibióticos penetrem (DIAZ *et al.*, 2019; RAHIM *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2021), por esta razão já estudos com substâncias que possuam características antibiofilme são extremamente importantes.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram avaliadas a amostra de própolis vermelha brasileira em extrato bruto hidroalcólico e 4 frações, além de 6 substâncias isoladas. A atividade antibacteriana dos extratos de própolis vermelha brasileira e suas frações foi evidenciada nos ensaios de CIM e CBM, sendo que extrato bruto hidroalcólico e as isoladas gutiferona-E e oblongifolina-B foram as amostras mais promissoras frente a maior quantidade de bactérias avaliadas. Para o ensaio de padronização da formação de biofilme, foi evidenciado a capacidade da formação e aderência de todas as cepas selecionadas para essa etapa do ensaio, bem como os biofilmes multiespécies. Na atividade antibiofilme, foi notado que todas as amostras tiveram eficácia frente a todos os biofilmes avaliados e em alguns casos houve a inibição total e eliminação de todas as células viáveis do biofilme. Portanto, verifica-se a atividade antibacteriana e antibiofilme do extrato bruto hidroalcólico da própolis vermelha e suas substâncias isoladas gutiferona-E e oblongifolina-B. Dessa forma, consolidamos uma base para o desenvolvimento de novos estudos acerca dos efeitos destas moléculas como agentes no combate e prevenção da periodontite.

7. REFERÊNCIAS

AL-AHMAD, A. *et al.* The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol* **56**, 681-687, doi:10.1099/jmm.0.47094-0 (2007)

BATISTA, L.L.V. *et al.* Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 39, n. 6, p. 515-520, dez. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-69912012000600012>.

BIMANAND, L. *et al.* Association between biofilm production, adhesion genes and drugs resistance in different SCCmec types of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from several major hospitals of Iran. *Iranian journal of basic medical sciences*, v. 21, n. 4, p. 400, 2018.

BOTTEON, C. E. A. *et al.* Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities. *Scientific Reports*, v. **11**, n. 1, p. 1974, 2021.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem* **61**, 4546-4550, doi:10.1021/jf305468f (2013)

CANGUSSU P.M. *et al.* Endocardite bacteriana de origem bucal: revisão de literatura. *RBPeCS*. 2014; **1**: 11-13.

CANGUSSÜ V.L. *et al.* Doença periodontal, seus sinais e sequelas: limitações para o tratamento com implantes osseointegrados. *Rev Dental Press Periodontia Implantol*. 2010; **4**:93-110.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria – Seventh Edition*, 27(2). Approved Standard M11-A7, CLSI, Wayne, PA.

de FIGUEIREDO, K. A. *et al.* Brazilian Red Propolis Is as Effective as Amoxicillin in Controlling Red-Complex of Multispecies Subgingival Mature Biofilm In Vitro. *Antibiotics (Basel)* **9**, doi:10.3390/antibiotics9080432 (2020).

De MENDONÇA I.C.G *et al.*. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2015; **15**: 357.

DE OLIVEIRA NETO, N. F., *et al.* Antibacterial activity of Brazilian red propolis and in vitro evaluation of free radical production. *Archives of Oral Biology*, **143**, 105520, 2022.

De SOUZA SILVA, T. *et al.* Green and Red Brazilian Propolis: Antimicrobial Potential and Anti-Virulence against ATCC and Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria. *Chem Biodivers* **18**, e2100307, doi:10.1002/cbdv.202100307 (2021)

DINCER, S. *et al.* Antibiotic resistance in biofilm. In: *Bacterial biofilms*. IntechOpen, 2020.

DOMINY, S. S. *et al.* Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science advances*, v. **5**, n. 1, p. eaau3333, 2019.

EBERT, C. *et al.* Correlation of crystal violet biofilm test results of Staphylococcus aureus clinical isolates with Raman spectroscopic read-out. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. **52**, n. 12, p. 2660-2670, 2021.

FERBER S.G. *et al.* Weller A. The "Entourage Effect": Terpenes Coupled with Cannabinoids for the Treatment of Mood Disorders and Anxiety Disorders, v. **18**, n. 2, p. 87-96, 2020. *Current neuropharmacology*. 10.2174/1570159X17666190903103923

FLEMMING, Hans-Curt *et al.* The biofilm matrix: Multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, p. 1-17, 2022.

FOERSTER, S. *et al.*. A new rapid resazurin-based microdilution assay for antimicrobial susceptibility testing of Neisseria gonorrhoeae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. **72**, n. 7, p. 1961–1968, 2017.

FREITAS, M.C.D. *et al.* . Biological Activities of Red Propolis: a Review. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 2018, **11**, 3–12. <https://doi.org/10.2174/1872214812666180223120316>

GIBBONS, S. *et al.* Phytochemicals for Bacterial Resistance - Strengths, Weaknesses and Opportunities. *Planta Medica*, 2008, **74**, 594–602. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074518>

GLURICH, I. *et al.* The oral-systemic Personalized Medicine Model at Marshfield Clinic. *Oral Diseases* 2012, **19**, 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2012.01921.x>

GROSSMAN, A.B *et al.* Quantification of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Crystal Violet and Confocal Microscopy. In: *Staphylococcus aureus*. Humana, New York, NY, 2021. p. 69-78.

GOMES, B.P.F.A *et al.* Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions Before and after Chemomechanical Preparation. *Journal of Endodontics* **41**, 2015, 1975–1984. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.08.022>

HARPER, R A. *et al.* Decreasing biofilm resistance to antimicrobial nanomaterials through electrolytic screening of electrostatic interactions. *Colloids and B Surfaces: Biointerfaces*, v. **173**, p. 392-399, 2019.

JAKUBOVICS, Nicholas S. *et al.* The dental plaque biofilm matrix. *Periodontology* 2000, v. **86**, n. 1, p. 32-56, 2021.

JIMÉNEZ H. M. *et al.* Impact of locking solutions on conditioning biofilm formation in tunnelled haemodialysis catheters and inflammatory response activation. *J. Vasc. Access* 2021, **22**, 370–379

JUG M. *et al.* Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT - Food Sci Technol.* 2014; **57**:530–7.

KINANE D.F. *et al.* Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol.* 2001;**25**:8-20.

KLAUSEN, M. *et al.* Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;**261**:1-11.

KRAGH, K. N. *et al.*. Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, v. **1**, p. 100006, 2019.

KUMAR, P.S. *et al.* From Focal Sepsis to Periodontal medicine: a Century of Exploring the Role of the Oral Microbiome in Systemic Disease. *The Journal of Physiology* 2016, **595**, 465–476. <https://doi.org/10.1113/jp272427>

LESCAT, M. *et al.* A Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. **57**, n. 3, p. 1–6, 2019.

LOTTI C. *et al.* Chemical Constituents of Red Mexican Propolis. *J Agric Food Chem.* 2010; **58**: 2209–13. Lustosa SR *et al.* Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Rev Bras Farmacogn.* 2008; **18**: 447-454.

ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, M. *et al.* A. Bacteriophages and Lysins in Biofilm Control. *Viol. Sin.* 2020, **35**, 125–133.

MAHTO, K. U. *et al.* Bacterial biofilm and extracellular polymeric substances in the moving bed biofilm reactor for wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology*, v. **345**, p. 126476, 2022.

MARÓSTICA J.M.R *et al.*. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2008; **28**: 178- 181.

MELANDER, R. J.; *et al.* Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Natural product reports*, v. 37, n. 11, p. 1454-1477, 2020.

MENDONÇA, I.C.G. *et al.* Abhishek. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, v. **15**, n. 1, p. 327-345, 14 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-015-0888-9>.

MIRANDA, S.L.F., *et al.* Brazilian Red Propolis Reduces orange-complex Periodontopathogens Growing in Multispecies Biofilms. *Biofouling*. 2019, **35**, 308–319. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1598976>

MOSADDAD S.A. *et al.* Oral microbial biofilms: an update, v. **38**, n. 11, p. 19-34, nov. 2019. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 10.1007/s10096-019-03641-9

NINA N. *et al.* Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. *Letters In Applied Microbiology*, v. **62**, n. 3, p. 290-296, 16 fev. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12543>.

NUTO S.A.S. *et al.* Aspectos culturais na compreensão da periodontite crônica: um estudo qualitativo. *Cad. Saúde Pública*. 2007; **23**, 681- 690.

OLIVEIRA, D. *et al.* Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins* 2018, **10**, 252.

PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, v. **131**, n. 1, p. 11-22, 2021.

PICCINELLI, A.L. *et al.* Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, v. **53**, n. 23, p. 9010-9016, nov. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0518756>.

REIS, J. H. O. *et al.* Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS One* **14**, e0219063, doi:10.1371/journal.pone.0219063 (2019).

RÍOS, J.L. *et al.* Medicinal Plants and Antimicrobial Activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. **100**, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

ROQUE-BORDA, C.A *et al.* Challenge in the Discovery of New Drugs: Antimicrobial Peptides against WHO-List of Critical and High-Priority Bacteria. *Pharmaceutics* 2021, **13**, 773.

SANDBERG M. *et al.* Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; **32**:233-240.

SANKAR G.P. *et al.* Attenuation of quorumsensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Tradit Complement Med*. 2018.

SANTOS, F. A. *et al.* Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* **80**, 1-7, doi:10.1016/s0378-8741(02)00003-x (2002)

SARKER, S.D. *et al.* Microtitre plate-based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin as an Indicator of Cell growth, and Its Application in the in Vitro Antibacterial Screening of Phytochemicals. *Methods*. 2007. **42**, 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.00>

SAUER, K. *et al.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, v. **20**, n. 10, p. 608-620, 2022.

SCHNURR, P.J *et al.* Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. **52**, p. 418-429, 2015.

SHABBIR, A. *et al.* Propolis, A Hope for the Future in Treating Resistant Periodontal Pathogens. *Cureus* **8**, e682, doi:10.7759/cureus.682 (2016).

SILVA J.C. *et al.* Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol.* 2012; **50**, 1790–5

SILVA, N. B. S. *et al.* Potential in vitro anti-periodontopathogenic, anti-Chikungunya activities and in vivo toxicity of Brazilian red propolis. *Scientific Reports*, v. **12**, n. 1, p. 21165, 2022.

SINGH, S. *et al.* Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol*, v. **11**, p. 53–62, 2017.

SOCRANSKY S.S. *et al.* Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol Immunol.* v. **3**, 1–7, 1988.

SUDHAKARA, P. *et al.* Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dentistry Journal*, v. **6**, n. 2, p. 10-16, 2018.

TASNEEM, U. *et al.* Biofilm producing bacteria: A serious threat to public health in developing countries. *J. Food Sci. Nutr.* 2018, **1**, 25–31.

TSUKATANI, T. *et al.* A rapid and simple measurement method for biofilm formation inhibitory activity using 96-pin microtiter plate lids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. **36**, n. 12, p. 1-9, 2020.

TRUSHEVA, B.; *et al.* New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia*, v. **75**, n. 7-8, p. 683-689, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2004.08.001>.

YOSHIMASU, Y. *et al.* Rapid Bactericidal Action of Propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* **97**, 928-936, doi:10.1177/0022034518758034 (2018).

WAGH V.D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci.* 2013; **82** 30-49.

WEI, G.X. *et al.* Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **57**:1100-1109.

WILSON, C. *et al.*. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: a mini-review. Research & reviews. Journal of engineering and technology, v. **6**, n. 4, 2017.