



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FELIPE AUGUSTO JULIANI

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO
ANTISSÉPTICA BUCAL CONTENDO MEL DE ABELHAS
INDÍGENAS SEM FERRÃO *SCAPTOTRIGONA POSTICA*
(LATREILLE, 1836)**

FELIPE AUGUSTO JULIANI

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO
ANTISSÉPTICA BUCAL CONTENDO MEL DE ABELHAS
INDÍGENAS SEM FERRÃO *SCAPTOTRIGONA POSTICA*
(LATREILLE, 1836)**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Odontologia, Mestrado em Odontologia, na Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Juliani, Felipe Augusto.

Desenvolvimento de uma formulação antisséptico bucal contendo mel de abelhas indígenas sem ferrão *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1836) / Felipe Augusto Juliani. - Londrina, 2016.
51 f. : il.

Orientador: Ricardo Sérgio Couto de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2016.
Inclui bibliografia.

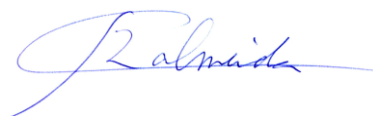
1. Antissépticos em odontologia - Tese. 2. Antissépticos bucais - Tese. 3. Mel de abelha - Tese. 4. Agentes antibacterianos - Tese. I. Almeida, Ricardo Sérgio Couto de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

FELIPE AUGUSTO JULIANI

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO ANTISSÉPTICA
BUCAL CONTENDO MEL DE ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO
SCAPTOTRIGONA POSTICA (LATREILLE, 1836)**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Odontologia, Mestrado em Odontologia, na Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcio Grama Hoepfner
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Audrey Alesandra Stingham Garcia
Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 05 de abril de 2016.

Dedico este trabalho:

A Deus;

Aos meus pais, Luiz Antônio Juliani e Maria Inês de Araújo Puerta Juliani;

Ao meu tio, Nilton Puerta de Araújo (in memoriam);

A minha namorada, Francielle Pereira de Souza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço do fundo da minha alma a Deus, pois em Ele nada seria possível. Minha eterna gratidão.

Agradeço aos meus pais Luiz Antônio Juliani e Maria Inês de Araújo Puerta Juliani, por toda ajuda, suporte, motivação, brigas, abrir minha janela as 7 horas da manhã e me chutar da cama, enfim por tudo. Essa é para vocês, agradeço do fundo do meu coração por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

A minha família por toda ajuda, orações e motivação nesta importante etapa da minha vida.

A minha namorada Francielle Pereira de Souza, por toda paciência em ir ao laboratório domingo à noite, por toda cumplicidade, me escutar nos momentos de angustia e desespero do mestrado, pelos momentos felizes, por me escutar explicar a metodologia dos projetos e compartilhar minha ansiedade, alegria e medo em todos os momentos desta etapa. Meu amor, meu mais sincero e muito obrigado!

Aos meus amigos do mestrado da turma Adrieli Burey, Maitê Soares, Juliana Proença, Valeria Avelar, Marcela Moreira, Marisa França, Bruna Góis 2014/2016, muito obrigado por todo apoio, seja nas disciplinas, na clínica do mestrado e para as dificuldades que foram surgindo durante o decorrer do Mestrado, pessoal muitíssimo obrigado do fundo do coração!

Ao pessoal do NIP 3, Sara, Erika, Juan, Marcelly, Léo, Larissa, muito obrigado por toda ajuda e paciência na hora de tirar dúvidas sobre a metodologia, contas, concentrações e muito mais, o meu muito obrigado do fundo do coração.

Aos colegas de laboratório, Karla, Patrícia, Aline, Caísa, Nayra, Nathalia, Jéssica, Teka, Giovanna, Carol, Lola, Tatiany, Guilherme, Ricardo (chewy) e Cesar, sem vocês seria quase impossível terminar esse mestrado. Muito obrigado por toda ajuda, paciência, motivação e cumplicidade ao longo destes dois anos, vou levar vocês para sempre no meu coração.

Aos professores do meu mestrado Prof. Dr. Márcio Grama Hoepfner, Prof. Dr. Edwin Fernando Ruiz Contreras, Profa. Dr. Cássia Cilene Dezan Garbelini, Profa. Dr. Elisa Emi Tanaka, Profa. Dr. Maria Celeste Morita, Profa. Dra. Solange, de Paula Ramos. Agradeço a todos por todos os ensinamento, paciência e ajuda.

Aos servidores da UEL, Ediel, Iara, e Claci por toda a disposição em me ajudar.

Aos professores do laboratório Prof. Dr Luciano Aparecido Panagio por toda ajuda, paciência, cafés e tantas outras atitudes que foram tão importantes nesta etapa.

E muito obrigado, do fundo do meu coração, ao meu amigo e orientador Prof. Dr Ricardo Sérgio Couto de Almeida por toda ajuda possível e impossível, pela dose em dobro de paciência e por todo o ensinamento nesta caminhada.

Agradeço a CAPES pela bolsa cedida neste tempo.

“- Pelo amor de Deus rapaz! Já não basta eu ter respondido tantas perguntas suas?
O que mais você quer saber?
- Tudo! Quero saber sobre o céu e a terra e o nome de todas as estrelas, claro!
Porque menos?

JULIANI, Felipe Augusto. **Desenvolvimento de um antisséptico bucal a base de mel de abelha sem ferrão**. 2016. Dissertação Mestrado em Odontologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Os antissépticos bucais são utilizados em larga escala pela população auxiliando na higienização da cavidade bucal, diminuindo assim a incidência de doenças como a cárie. Contudo, alguns antissépticos bucais trazem riscos à saúde oral e sistêmica do paciente como mudança da cor dos dentes e bioacumulação de substâncias tóxicas no epidídimo e adipócitos. O objetivo deste estudo foi desenvolver um antisséptico bucal contendo mel de abelhas indígenas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille 1807 e analisar atividade antimicrobiana e citotoxicidade do produto. Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizados os microrganismos, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans* para o teste de ágar difusão e a curva de crescimento e morte celular nos tempos de 1, 15, 30, 45, 60, 120 segundos, 30 minutos e 1 hora. Foram testados o mel puro, a base do antisséptico, a base acrescida de 5%, 10% e 20% (v/v) do mel de abelhas sem ferrão e dois controles triclosan 0,05% e clorexidina a 0,12%. Já para o teste de citotoxicidade foi utilizada a célula FaDu, e a viabilidade celular foi avaliada com base na oxidação mitocondrial do MTT nos mesmos tempos da curva de crescimento e morte celular. A microscopia eletrônica de varredura foi realizada com *S. mutans* na presença do antisséptico contendo 20% (v/v) do mel por 1, 15 e 30 minutos. Para o teste de difusão em ágar, o mel puro apresentou halo de inibição de $30 \pm 0,27$ mm para *E. coli*, $16 \pm 0,93$ mm para *E. faecalis* e $26 \pm 0,33$ mm para *S. mutans*. Em relação aos produtos, *E. coli* apresentou um halo de inibição de $12 \pm 0,2$ mm somente com a formulação de 10% (v/v) de mel. Para *E. faecalis*, 10% e 20% (v/v) demonstraram atividade antimicrobiana com halo de inibição de $17 \pm 0,58$ mm e $21 \pm 0,33$ mm, respectivamente e para *S. mutans*, 10% e 20% (v/v) demonstraram atividade antimicrobiana com halo de inibição de $19 \pm 0,20$ mm e $25 \pm 0,60$ mm, respectivamente. Os antissépticos contendo 10% e 20% (v/v) de mel apresentaram efeito bactericida ao longo do tempo para *E. faecalis* e *S. mutans*. O produto não apresentou efeito algum contra *E. coli*. Em relação à citotoxicidade, as 3 concentrações de antisséptico bucal apresentaram perda de viabilidade celular inferior a 50%. Na microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a formação de vesículas na parede celular, desarranjo celular e queda na população. Assim através destes testes, conseguimos demonstrar a aplicabilidade do mel de abelha sem ferrão em um produto capaz de eliminar microrganismos bucais e ajudar no controle de doenças como a cárie dentária.

Palavras-chave: Antisséptico bucal. Atividade antimicrobiana. Viabilidade celular. Mel de abelha sem ferrão.

JULIANI, Felipe Augusto. **Development of an oral antiseptic base of stingless bee honey**. 2016. Dissertation (Master's degree in Odontologic Clinic) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The mouthwash are used by large-scale population aiding in cleaning the oral cavity, thus reducing the incidence of diseases such as caries and periodontal disease. However, some mouthwashes pose risks to oral and systemic health of the patient as change the color of teeth and bioaccumulation of toxic substances in the epididymis and adipocytes. The aim of this study was to develop a mouthwash containing honey indigenous stingless bee from the specie *Scaptotrigona Postica*, Latreille 1807 and analyze the antimicrobial activity and cytotoxicity of the product. To evaluate the antimicrobial activity, the organisms were used, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* to agar test diffusion and growth curve and cell death in the times 1, 15, 30, 45, 60, 120 seconds 30 minutes and 1 hour. The pure honey the base of the antiseptic, the added base 5%, 10% and 20% (v/v) of stingless honey bees and two controls triclosan and chlorhexidine 0.05% to 0.12% were used to the test. As for the cytotoxicity assay was used FaDu and cell viability was assessed by mitochondrial oxidation of MTT at the same time the growth curve and cell death. The scanning electron microscopy was performed with *S. mutans* in the presence of an antiseptic containing 20% (v/v) honey by 1, 15 and 30 minutes. For the agar diffusion test, pure honey showed inhibition zone of 30 mm \pm 0.27 for *E. coli*, 16 \pm 0.93 mm for *E. faecalis* and 26 \pm 0.33 mm for *S. mutans*. For products, *E. coli* showed a zone of inhibition of 12 \pm 0.2 mm only with formulation 10% of honey. For *E. faecalis* 10% and 20% showed antimicrobial activity in inhibition zone of 17 mm \pm 0.58 and 21 \pm 0.33 mm, respectively, and for *S. mutans*, 10% and 20% showed antimicrobial activity with halo inhibition of 19 mm \pm 0.20 and 25 \pm 0.60 mm, respectively. The antiseptic containing 10% and 20% honey showed bactericidal effect over time for *E. faecalis* and *S. mutans*. The mouthwash containing 10% and 20% honey exhibit bactericidal effect over time for *E. faecalis* and *S. mutans*. However, the product did not show any effect against *E. coli*. With regard to cytotoxicity, the mouthwash three concentrations showed loss of cell viability below 50%. In scanning electron microscopy, we observed the formation of vesicles in the cell wall, cell disarray and decline in population. So through these tests, we demonstrate the applicability of stingless bee honey in a product capable of eliminating oral microorganisms and help control diseases like tooth decay.

Key words: Mouthwash. Antimicrobial activity. Cell viability. Stingless bee honey.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Atividade antimicrobiana do mel de abelha sem ferrão.....	36
Figura 2	–	Avaliação antimicrobiana da Base, do antisséptico bucal nas concentrações 5, 10 e 20% e dos controles Triclosan e Clorexidina para <i>E. faecalis</i>	37
Figura 3	–	Avaliação antimicrobiana da Base, do antisséptico bucal nas concentrações 5, 10 e 20% e dos controles Triclosan e Clorexidina para <i>E. coli</i>	37
Figura 4	–	Avaliação antimicrobiana da Base, do antisséptico bucal nas concentrações 5, 10 e 20% e dos controles Triclosan e Clorexidina para <i>S. mutans</i>	38
Figura 5	–	Curva de sobrevivência e morte de <i>E. faecalis</i>	38
Figura 6	–	Curva de sobrevivência e morte de <i>E. coli</i>	39
Figura 7	–	Curva de sobrevivência e morte de <i>S. mutans</i>	40
Figura 8	–	Ensaio de viabilidade celular com células FaDu testadas em RPMI, TRITON, PBS e Base.....	40
Figura 9	–	Ensaio de viabilidade celular com células FaDu testado em RPMI, antisséptico bucal a base de mel à 5, 10 e 20%	41
Figura 10	–	Imagem da atividade antimicrobiana do antisséptico bucal a base de mel de abelha a 20%, através da microscopia eletrônica de varredura. A, C e E: Controle negativo, tratamento com a base por 1, 15 e 30 minutos. B, D e E: Tratamento com antisséptico bucal.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI caldo	Caldo infusão de cérebro e coração
BHI ágar	Agar infusão de cérebro e coração
PBS	Tampão fosfato-salina
pH	Potencial hidrogênio
UFC	Unidade formadora de colônias
%	Porcentagem
°C	grau Celsius
µl	microlitros
mL	mililitro
mm	milímetro
PBS	Phosphate - buffered saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
tri	Triclosan
clx	Clorexidina

SUMÁRIO

1	Introdução Geral	12
1.1	Objetivo Geral	16
1.2	Objetivo Especifico	16
	Referências da Introdução geral	17
2	Artigo formatado nas normas da revista American Journal of Dentistry	24
	Resumo	25
2.1	Introdução	26
2.2	Metodologia	28
2.2.1	Formulação da base do antisséptico bucal	28
2.2.2	Coleta do mel	28
2.2.3	Cultivo dos microrganismos	28
2.2.4	Teste da atividade antimicrobiana por difusão em ágar	29
2.2.5	Ensaio de viabilidade celular	29
2.2.6	Curva de crescimento e morte	30
2.2.7	Microscopia eletrônica de varredura	30
2.2.8	Análise estatística	31
2.3	Resultados	32
2.3.1	Teste antibacteriano em ágar difusão	32
2.3.2	Curva de sobrevivência e morte	34
2.4.3	Ensaio de viabilidade celular	36
2.5	Discussão	38
2.6	Conclusão	42
2.7	Referências do artigo	42
	Anexo A – Normas da Revista American Journal of Dentistry	57

1 Introdução Geral

A microbiota da cavidade bucal é composta por milhares de microrganismos, dentre eles bactérias, fungos e vírus, os quais encontram nela seu nicho ideal. A presença de bactérias patogênicas e produtos de seu metabolismo interferem na homeostase dos da cavidade bucal, levando ao desenvolvimento de doenças como cárie (JAKUBOVICS, 2015; FALSETTA *et al.*, 2014).

Várias pesquisas como estudos epidemiológicos, ensaios laboratoriais e testes em animais confirmam a associação entre *Streptococcus mutans*, cárie dental e má higienização da cavidade oral. *S. mutans* é uma bactéria Gram positiva com morfologia de coco anaeróbio facultativo e apresenta como produto final de sua fermentação o ácido lático. A produção excessiva desse ácido por esse coco, na presença de carboidratos causa uma queda no pH (abaixo de 5,0) e desmineralização dos tecidos dentários, dando origem à cárie. Esta doença é multifatorial e de alcance global, afetando desde crianças até adultos. Em algumas partes do mundo apresenta-se de forma endêmica em decorrência da mínima instrução de higiene da população e más condições locais (água não fluoretada, falta de tratamento odontológico adequado e a dieta cariogênica) (DALMASSO *et al.*, 2015; ODA; HAYASHI; OKADA, 2015). *S. mutans* também está associado a casos de infecção não bucal como é o caso da endocardite bacteriana. Assim, é importante diminuir a quantidade de bactérias na saliva antes de procedimentos invasivos, evitando a ocorrência de bacteremia e consequente endocardite (KAUR; RAJESH; PRINCY, 2015).

Outro importante microrganismo presente na cavidade bucal é a bactéria *Enterococcus faecalis*, um coco gram positivo e anaeróbio facultativo. Esta bactéria consegue colonizar uma vasta gama de habitats, como o trato gastrointestinal e vagina. Na cavidade oral apresenta-se livre na saliva e, quando presente nos canais radiculares, está associada ao fracasso e a necessidade do retratamento endodôntico (WANG, Q.-Q. *et al.*, 2012). Melhorias nas técnicas de coleta de material biológico e métodos de identificação molecular auxiliaram na evidência deste microrganismo em canais radiculares (SEDGLEY; BUCK; APPELBE, 2006). *E. faecalis* apresenta alguns mecanismos que auxiliam na sobrevivência e permanência no interior do dente, onde a polpa dental em decomposição cria um ambiente extremamente inóspito. Dentre esses mecanismos estão a alta adaptação

nutricional, sobrevivência em meio extremamente alcalino e mobilidade para penetrar fundo nos túbulos dentinários (ZHANG; DU; PENG, 2015; AMARAL *et al.*, 2014; BUMB *et al.*, 2014; GURSOY; OZCAKIR-TOMRUK; TANALP, 2013; SEDGLEY; BUCK; APPELBE, 2006).

Em decorrência da grande quantidade de microrganismos na cavidade bucal, esta mesma característica pode ser aplicada às patologias como a doença cárie, periodontopatias e as alterações pulpares. É raro encontrarmos microrganismos como *Escherichia coli* em dentes indicados para tratamento endodôntico. Não se sabe ao certo se a bactéria *E. coli* está contribuindo para o desenvolvimento da doença pulpar ou é um achado clínico, porém, coletas clínicas e testes moleculares identificaram bactérias do gênero *Escherichia* em doenças pulpares (RANI; CHOPRA, 2006; HAAPASALO; UDNÆS; ENDAL, 2003).

A utilização da escova de dente, pasta e fio dental aliada a uma correta técnica de higiene bucal estão entre as opções encontradas pelo ser humano para a remoção mecânica dos microrganismos patogênicos. Porém, alguns pacientes não conseguem alcançar certos locais ou até mesmo não tem a destreza manual necessária para realizar uma higiene bucal eficiente, não removendo os microrganismos de forma satisfatória e, conseqüentemente, favorecendo a evolução de patologias (GUNSOLLEY, 2010). Buscando uma alternativa para este problema, os antissépticos bucais são recomendados, pois conseguem alcançar os locais que são de difícil acesso ao paciente, além de desestabilizar e auxiliar na remoção dos microrganismos (GONÇALVES, E. D. A., 2013; SANTOS, 2003).

O mercado conta com uma grande variedade de antissépticos bucais que podem auxiliar o paciente na remoção dos microrganismos. Uma substância antisséptica amplamente utilizada é o Triclosan ou triclosanato, um composto fenólico amplamente utilizado em desodorantes, na limpeza de material cirúrgico, detergente, sabonetes, produtos para limpar as mãos, gel, loções pós barba, produtos de higiene oral como pastas de dente e antissépticos entre outros. Apresenta um amplo espectro de ação contra bactérias Gram positivas e negativas, sendo mais eficiente contra bactérias anaeróbicas. Também tem ação contra fungos, como leveduras do gênero *Candida* e ainda possui atividade anti-inflamatória. É apresentado comercialmente nas concentrações entre 0,03% até 0,5% (WATANABE *et al.*, 2015; DE ROSSI *et al.*, 2014). Contudo o Triclosan pode acumular-se nos adipócitos e epidídimo, podendo levar a problemas endócrinos e de fertilidade.

Alguns trabalhos encontraram concentrações de Triclosan em plantas, animais e em águas fluviais, comprovando assim sua bioacumulação e aumentando os riscos para o seres humanos (REISS *et al.*, 2002; WANG, L.; ASIMAKOPOULOS; KANNAN, 2015; WANG, L.-S. *et al.*, 2009; FORAN; BENNETT; BENSON, 2000).

Outra opção de antisséptico bucal apresentada pelo mercado é a clorexidina. Quimicamente classificada como diglucanato de clorexidina, tem amplo espectro de ação, sendo eficiente contra bactérias Gram positivas e negativas, vírus e fungos (DE ROSSI *et al.*, 2014). Assim a clorexidina apresenta-se como um excelente antisséptico, podendo, também, ser utilizada como solução irrigadora no tratamento endodôntico (KOLOSOWSKI *et al.*, 2015). Comercialmente pode ser encontrada nas concentração de 0,12% a 0,2% (DE MOURA *et al.*, 2012; PRASAD *et al.*, 2015; FEDOROWICZ *et al.*, 2010). Entretanto, a clorexidina apresenta alguns efeitos adversos oriundos do uso crônico, como manchamento dentário e lingual, sabor desagradável, sensação de queimação e perda do paladar (PAPAIOANNOU *et al.*, 2015).

Outro problema é a presença do álcool, utilizado como solvente para o princípio ativo de antissépticos bucais. O álcool auxilia na remoção da placa bacteriana mas causa sensação de ardência na boca. Além disso, o álcool tem a capacidade de infligir danos ao material genético das células humanas podendo aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de boca (REIDY; MCHUGH; STASSEN, 2011; ZAMORA-PEREZ *et al.*, 2013).

Assim, frente a estes problemas, um antisséptico bucal contendo em sua fórmula mel de abelha, poderia substituir os princípios ativos como, triclosan e clorexidina nos antissépticos bucais atuais. O mel de abelha é um importante suplemento alimentar, o qual, desde a antiguidade, é utilizado também no tratamento de feridas. Atualmente, o mel de abelhas como o da *Apis mellífera*, sua eficácia como agente cicatrizante é comprovada nos casos de tratamentos de feridas como de úlcera crônica de pacientes diabéticos, úlceras de estômago, feridas e queimaduras (MANDAL; MANDAL, 2011; LUSBY; COOMBES; WILKINSON, 2005). Suas propriedades cicatrizantes devem-se em parte ao seu pH ácido que promove a cicatrização graças a liberação de oxigênio da hemoglobina. Além disso, o pH ácido não é favorável a atividade de proteases, reduzindo assim a destruição da matriz extracelular (MOLAN, P.; RHODES, 2015). Adicionalmente, uma das atividades

farmacológicas do mel de abelha que tem chamado a atenção dos pesquisadores, é a atividade antimicrobiana.

Os agentes antimicrobianos são de extrema importância no combate a infecções, porém nos últimos anos a resistência aos antimicrobianos tradicionais e os de última geração tem gerado grandes preocupações. Neste contexto, o mel de abelha tem sido testado nos últimos anos na busca por um mel ou produto que auxilie no combate contra microrganismos resistentes a antibióticos (ZAINOL; MOHD YUSOFF; MOHD YUSOF, 2013).

O mel apresenta uma grande variedade de componentes dentre eles sua grande maioria é de carboidratos como frutose, glicose, erlose, gentiobiose, maltose, maltotetraose, isomaltose, isomaltotriose. Em menor quantidade estão minerais como cálcio, ferro, magnésio, fosfato, potássio, sódio, fluoretos dentre outros (COHEN *et al.*, 2014) e pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio, metilglioxal, leptosina, melanoidina e radicais livre que junto com a grande quantidade de carboidratos, estão relacionados com a atividade antimicrobiana do mel de abelha. Demonstrando assim vários mecanismos de ação distintos, diminuindo o desenvolvimento de resistência (BRUDZYNSKI; SJAARDA, 2015; LIU *et al.*, 2015). Algumas injurias, como úlceras crônicas de pacientes diabéticos, estão intimamente ligadas a colonização de bactérias como *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA) e *E. faecalis*. Ambos os microrganismos provaram-se sensíveis ao mel de abelha, sugerindo assim, a sua possível utilização clínica como agente antimicrobiano (COOPER; MOLAN; HARDING, 1999).

O mel de abelha da *A. mellifera*, utilizado ao redor do mundo para avaliação da atividade antimicrobiana, apresenta atividade antimicrobiana contra os microrganismos da cavidade oral como *S. mutans*. Apesar de serem microrganismos que fermentam o açúcar encontrado na cavidade oral, o mel de abelha através da grande quantidade de produtos presentes na sua composição, apresenta uma grande variedade de mecanismos de ação, assim, consegue eliminar estes microrganismos e ajudar no controle da doença. Além disso, estudos apontam para a incapacidade do mel de abelha de causar lesões erosivas no esmalte do dente devido ao baixo pH. Provavelmente os minerais presentes no mel como, cálcio, fosforo e fluoridos protegem os tecidos como esmalte e dentina de danos. Transformando assim o produto natural em um poderoso aliado no combate e controle de doenças como a cárie e controle dos microrganismos na cavidade bucal

(APARNA *et al.*, 2012 ; PATEL; THAKER; PATEL, 2011; GROBLER; DU TOIT; BASSON, 1994).

No Brasil é comum a meliponicultura, nome dado ao cultivo de abelhas nativas sem ferrão ou abelha indígena sem ferrão. Existem atualmente cerca de mais de 300 espécies distribuídas por todo o território nacional. Essas abelhas eram utilizadas pelos indígenas desde os tempos pré-colombianos para alimentação e para o tratamento de feridas (CARVALHO, 2005).

Estudos utilizando o mel de abelhas indígenas sem ferrão demonstram a atividade antimicrobiana do mel contra uma ampla variedade de microrganismos (GONÇALVES, A L.; FILHO; MENEZES, 2005; MERCÊS *et al.*, 2013; BOORN *et al.*, 2010). Ele também apresenta uma melhor atividade antimicrobiana contra cepas resistentes a antibióticos do que o mel tradicional da abelha *A. mellífera*, demonstrando a grande importância deste mel na medicina atual e como uma nova opção para o tratamento de microrganismos resistentes (EWNETU; LEMMA; BIRHANE, 2013; SILVA *et al.*, 2013).

Dentro desse cenário, a elaboração de uma formulação antisséptico bucal contendo mel de abelhas indígenas sem ferrão como agente antimicrobiano poderia oferecer um novo produto ao mercado, o qual não cause danos ao meio ambiente e com menos (ou nenhum) efeitos adversos oriundos do uso crônico.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver uma formula antisséptica bucal contendo mel de abelhas sem ferrão, da espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille 1807, bem como avaliar sua atividade antimicrobiana e citotoxicidade.

1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma formulação líquida, como base de um antisséptico bucal.
- Determinar a concentração ideal do produto para determinar a atividade antimicrobiana.
- Avaliar a toxicidade para as diferentes concentrações do produto.
- Avaliar os efeitos ultraestruturais do produto sobre *S. mutans*.

Referências da Introdução geral:

ALVES, T. *et al.* Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 91–97, 2011.

AMARAL, F. B. *et al.* Comparative evaluation of photodynamic therapy using LASER or light emitting diode on cariogenic bacteria: An in vitro study. **European Journal of Dentistry**, v. 8, n. 4, p. 509–514, 2014.

ANDUALEM, B. Combined antibacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 9, p. 725–731, 2013.

ANSARI, M. J. *et al.* Effect of jujube honey on *Candida Albicans* growth and biofilm formation. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 5, p. 352–360, 2013.

APARNA, S. *et al.* A comparative evaluation of the antibacterial efficacy of honey in vitro and antiplaque efficacy in a 4-day plaque regrowth model in vivo: preliminary results. **Journal of periodontology**, v. 83, n. 9, p. 1116–21, 2012.

BOANERGES, R. *et al.* Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BioMed Central**, v. 13, p. 151, 2013.

BOORN, K. L. *et al.* Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 5, p. 1534–1543, 2010.

BORBA, R. S. *et al.* Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. **Journal of Experimental Biology**, p. 1-34. October, 2015.

BRUDZYNSKI, K.; SJAARDA, C. Honey Glycoproteins Containing Antimicrobial Peptides, Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, Are Responsible for the Cell Wall Lytic and Bactericidal Activities of Honey. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. 2–21, 2015.

BUMB, S. S. *et al.* Assessment of Photodynamic Therapy (PDT) in Disinfection of Deeper Dentinal Tubules in a Root Canal System: An In Vitro Study. ***Journal of Clinical and Diagnostic Research***, v. 8, n. 11, p. 67–71, 2014.

CARNWATH, R. *et al.* The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates. ***The Veterinary Journal***, v. 199, n. 1, p. 110–114, 2014.

CARVALHO, C. A. L. DE. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. ***Bahia: Universidade Federal da Bahia***, 2005.

CHEVALIER, M. *et al.* Antiseptic mouthwashes could worsen xerostomia in patients taking polypharmacy. ***Acta Odontologica Scandinavica***, v. 73, n. 4, p. 267–273, 2015.

CHINAKWE, E. Antibacterial effect of honey formulation on bacteria isolated from wounds. ***Nigerian Journal of Microbiology***, v. 20, n. 3, 2006.

COHEN, S. *et al.* Antimicrobial Properties of Honey. ***American Journal of Therapeutics*** 21, v. 21, n. 4, p. 1160–1163, 2014.

COOKE, J. *et al.* The antimicrobial activity of prototype modified honeys that generate reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide. ***BMC Research Notes***, v. 8, n. 1, p. 20, 2015.

COOPER, R.; MOLAN, P.; HARDING, K. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. ***Journal of the Royal Society of Medicine***, v. 92, p. 283–285, 1999.

DALMASSO, M. *et al.* Isolation of a Novel Phage with Activity against *Streptococcus mutans* Biofilms. ***Plos One***, p. 1–18, 2015.

DE MOURA, C. D. V. S. *et al.* Microbiological assessment of the effectiveness of chlorhexidine mouthrinse before taking impressions of the oral cavity. ***Revista Odonto Ciencia***, v. 27, n. 2, p. 156–160, 2012.

DE ROSSI, A. *et al.* Antimicrobial activity of toothpastes containing natural extracts, chlorhexidine or triclosan. ***Brazilian Dental Journal***, v. 25, n. 3, p. 186–190, 2014.

ELEY, B. M. Periodontology: Antibacterial agents in the control of supragingival plaque — a review. **British Dental Journal**, v. 186, n. 6, p. 286–296, 1999.

ESRAFIL BALAEI, G. *et al.* Microbial Flora of Root Canals of Pulpally-infected Teeth: Enterococcus faecalis a Prevalent Species. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 3, n. 1, p. 24–27, 2009.

EWNETU, Y.; LEMMA, W.; BIRHANE, N. Antibacterial effects of Apis mellifera and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumoniae in Gondar, Northwest Ethiopia. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 269, 2013.

FALSETTA, M. L. *et al.* Symbiotic relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. **Infection and immunity**, v. 82, n. 5, p. 1968–81, maio 2014.

FARDIN, R. F. *et al.* Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microrganismos da cavidade oral. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 13, n. 3, p. 10–16, 2011.

FAUZI, A. N.; NORAZMI, M. N.; YAACOB, N. S. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 871–878, 2011.

FEDOROWICZ, Z. *et al.* Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, n. 4, 2010.

FORAN, C. M.; BENNETT, E. R.; BENSON, W. H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: Triclosan. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 153–156, 2000.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee Trigona spp. and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. **Thermochimica Acta**, v. 415, n. 1-2, p. 99–106, 2004.

GONÇALVES, A L.; FILHO, A A.; MENEZES, H. Atividade Antimicrobiana Do Mel Da Abelha Nativa Sem Ferrão Nannotrigona Testaceicornis (Hymenoptera : Apidae , Meliponini). **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 455–459, 2005.

GONÇALVES, E. D. A. Avaliação da eficácia antimicrobiana dos enxaguatórios bucais contendo como princípios ativos o triclosan , cloreto de cetilpiridínio e óleos essenciais Composição dos colutórios bucais comercialmente disponíveis. **HU Revista, Juiz de Fora**, v. 39, p. 45–50, 2013.

GONNET, M.; LAVIE, P.; NOGUEIRA-NETO, P. Etude de quelques caracteristiques des miels recoltés por certains Meliponines bresiliens. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 258, p. 3107–3109, 1964.

GROBLER, S. R.; DU TOIT, I. J.; BASSON, N. J. The effect of honey on human tooth enamel in vitro observed by electron microscopy and microhardness measurements. **Archives of oral biology**, v. 39, n. 2, p. 147–153, 1994.

GUNSOLLEY, J. C. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. S6–S10, 2010.

GURSOY, H.; OZCAKIR-TOMRUK, C.; TANALP, J. Photodynamic therapy in dentistry : a literature review. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, p. 1113–1125, 2013.

HAAPASALO, M.; UDNÆS, T.; ENDAL, U. Persistent , recurrent , and acquired infection of the root canal system post-treatment. **Endodontic Topics**, p. 29–56, 2003.

HEGDE, A. M. Prevalence of selected microorganisms in the pulp space of human deciduous teeth with irreversible pulpitis. **Endodontology**, v. 25, n. 1, p. 107–111, 2013.

JAKUBOVICS, N. S. Intermicrobial interactions as a driver for community composition and stratification of oral biofilms. **Journal of Molecular Biology**, 2015.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontology 2000**, v. 15, p. 55–62, 1997.

JONES, R. D. *et al.* Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. **American journal of infection control**, v. 28, n. 2, p. 184–196, 2000.

KAUR, G.; RAJESH, S.; PRINCY, S. Plausible Drug Targets in the Streptococcus mutans Quorum Sensing Pathways to Combat Dental Biofilms and Associated Risks. **Indian Journal of Microbiology**, v. 4, p. 349–356, 2015.

KOLOSOWSKI, K. P. *et al.* Qualitative Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Root Dentin Irrigated with Sodium Hypochlorite, EDTA, or Chlorhexidine. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 10, p. 1672–1677, 2015.

LIU, M. *et al.* Antibiotic-specific differences in the response of Staphylococcus aureus to treatment with antimicrobials combined with manuka honey. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. January, p. 1–9, 2015.

LUSBY, P. E.; COOMBES, A. L.; WILKINSON, J. M. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 5, p. 464–467, 2005.

MANDAL, M. D.; MANDAL, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154–160, 2011.

MCLOONE, P.; WARNOCK, M.; FYFE, L. Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1–7, 2015.

MERCÊS, M. D. *et al.* Antimicrobial activity of honey from five species of Brazilian stingless bees. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 43, n. 4, p. 672–675, 2013.

MOLAN, P. C.; BETTS, J. A. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. **Journal of wound care**, v. 13, n. 9, p. 353–356, 2004.

MOLAN, P.; RHODES, T. Honey: A Biologic Wound Dressing. **Wounds A Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 27, 2015.

NISHIO, E. K. *et al.* Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: Scaptotrigona bipunctata Lepeletier, 1836, and S. postica Latreille, 1807. **Scientific Reports**, v. 6, n. August 2015, p. 21641, 2016.

ODA, Y.; HAYASHI, F.; OKADA, M. Longitudinal study of dental caries incidence associated with Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in patients with intellectual disabilities. **BMC Oral Health**, p. 1–5, 2015.

- PAPAIIOANNOU, W. *et al.* A comparison of a new alcohol-free 0.2% chlorhexidine oral rinse to an established 0.2% chlorhexidine rinse with alcohol for the control of dental plaque accumulation. ***International Journal of Dental Hygiene***, n. 2, p. 1–5, 2015.
- PATEL, R. V.; THAKER, V. T.; PATEL, V. K. Antimicrobial activity of ginger and honey on isolates of extracted carious teeth during orthodontic treatment. ***Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine***, v. 1, n. 1, p. S58–S61, 2011.
- PITHON, M. M. *et al.* Avaliação in vitro da citotoxicidade de enxaguatórios bucais Listerine. ***Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial***, v. 11, n. 4, p. 83–88, 2011.
- PRASAD, K. A. R. V. *et al.* Anti-Plaque Efficacy of Herbal and 0.2% Chlorhexidine Gluconate Mouthwash : A Comparative Study. ***Journal of International Oral Health***, v. 7, n. April, p. 98–102, 2015.
- RANI, A.; CHOPRA, A. Isolation and Identification of Root Canal Bacteria From Symptomatic Nonvital Teeth With Periapical Pathosis. ***Endodontology***, v. 18, p. 12–17, 2006.
- REIDY, J.; MCHUGH, E.; STASSEN, L. F. A. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. ***The Surgeon***, v. 9, n. 5, p. 278–283, 2011.
- REISS, R. *et al.* An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. ***Environmental toxicology and chemistry / SETAC***, v. 21, n. 11, p. 2483–2492, 2002.
- SANTOS, A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. ***Journal of clinical periodontology***, v. 30, n. Suppl 5, p. 13–16, 2003.
- SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. ***Journal of Endodontics***, v. 32, n. 2, p. 104–109, 2006.
- SILVA, I. A. A. DA *et al.* Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. ***Food Chemistry***, v. 141, n. 4, p. 3252–3258, 2013.

SOUZA, E. A. DE *et al.* Acta Scientiarum Influence of seasonality and production method on the antibacterial activity of propolis. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 36, n. 1, p. 49–53, 2014.

TENNERT, C. *et al.* Effect of photodynamic therapy (PDT) on Enterococcus faecalis biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. **BMC Oral Health**, v. 14, p. 1–8, 2014.

WANG, L.; ASIMAKOPOULOS, A. G.; KANNAN, K. Accumulation of 19 environmental phenolic and xenobiotic heterocyclic aromatic compounds in human adipose tissue. **Environment International**, v. 78, p. 45–50, 2015.

WANG, L.-S. *et al.* Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Environmental toxicology**, v. 24, n. 3, p. 296–303, 2009.

WANG, Q.-Q. *et al.* Prevalence of Enterococcus faecalis in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. **International Journal of Oral Science**, v. 4, n. 1, p. 19–23, 2012.

WATANABE, E. *et al.* Antiseptic mouthwashes: In vitro antibacterial activity. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 28, p. 180–184, 2015.

ZAINOL, M.; MOHD YUSOFF, K.; MOHD YUSOF, M. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 129, 2013.

ZAMORA-PEREZ, A. L. *et al.* Increased number of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells from people exposed to alcohol-containing mouthwash. **Drug and chemical toxicology**, v. 36, n. 2, p. 255–60, 2013.

ZHANG, C.; DU, J.; PENG, Z. Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1–7, 2015.

Artigo formatado nas normas da revista American Journal of Dentistry

Avaliação de formulações antissépticas bucais contendo mel de abelhas indígenas sem ferrão (*Scaptotrigona postica*, Latreille 1807)

Juliani, FA.

Departamento de Microbiologia – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina.

Clínica Odontológica Universitária – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Estadual de Londrina

Endereço para correspondência:

Felipe Augusto Juliani

Rua Abílio Eufrásio Silva, 64 – PR

E-mail: felipe.juliani@gmail.com

Resumo

Resumo: **Propósito:** Avaliar a atividade antimicrobiana e viabilidade celular de uma formulação antisséptica contendo 5%, 10% e 20% (v/v) de mel de abelhas indígenas sem ferrão contra os microrganismos *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. **Metodologia:** Para os testes, foi utilizado o mel puro e confeccionadas 6 formulações, uma base, a base acrescida de mel de abelhas indígenas sem ferrão nas porcentagens de 5%, 10% e 20% v/v e dois controles, triclosan a 0,05% (p/p) e clorexidina a 0,12% (p/p). Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado o teste de difusão em ágar. A curva de crescimento e morte celular foi testada nos tempos 1, 15, 30, 45, 60 e 120 segundos, 30 minutos e 1 hora. Para avaliação da viabilidade celular, foram utilizadas células FaDu nos mesmos tempos da curva de crescimento e morte celular. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para visualizar os danos do antisséptico bucal a 20% (v/v) contra o microrganismo *S. mutans* nos tempos de 1,15 e 30 minutos. **Resultados:** Para o teste de difusão em ágar, o mel puro apresentou halo de inibição de $30\pm 0,27$ mm para *E. coli*, $16\pm 0,93$ mm para *E. faecalis* e $26\pm 0,33$ mm para *S. mutans*. Em relação aos produtos, *E. coli* apresentou um halo de inibição de $12\pm 0,2$ mm somente com a formulação de 10% (v/v) de mel. Para *E. faecalis*, 10% e 20% (v/v) demonstraram halo de inibição de $17\pm 0,58$ mm e $21\pm 0,33$ mm, respectivamente e para *S. mutans*, 10% e 20% (v/v) demonstraram halo de inibição de $19\pm 0,20$ mm e $25\pm 0,60$ mm, respectivamente. Os antissépticos contendo 10% e 20% (v/v) de mel apresentaram efeito bactericida ao longo do tempo para *E. faecalis* e *S. mutans*. Entretanto, o produto não apresentou efeito algum contra *E. coli*. Em relação à citotoxicidade, as 3 concentrações de antisséptico bucal apresentaram perda de viabilidade celular inferior a 50%. Na microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a formação de vesículas na parede celular, desarranjo celular e queda na população. Todos os dados foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). **Significado clínico:** Este estudo demonstra que uma formulação antisséptica com 20% de mel de abelhas indígenas sem ferrão, pode ser utilizado no controle microbiano da cavidade bucal, sem o risco de danos aos tecidos dentinários e adjacentes.

Palavras chave: antisséptico bucal, atividade antimicrobiana, viabilidade celular, mel de abelha sem ferrão.

2.1 Introdução

A microbiota bucal é rica em microrganismos como bactérias, fungos e vírus. É de extrema importância que ocorra o controle populacional destes microrganismos, em especial as bactérias, para evitar que no futuro, o desenvolvimento de patologias como a cárie, doença periodontal e doenças pulpares. A doença cárie está fortemente relacionada ao microrganismo *Streptococcus mutans*, um coco gram positivo, anaeróbio facultativo. Esta bactéria apresenta vários fatores que influenciam na patogenicidade da doença como a acidogenicidade, aciduricidade, capacidade de adesão e o metabolismo de uma vasta quantidade de açúcares (DALMASSO *et al.*, 2015; ODA; HAYASHI; OKADA, 2015; KAUR; RAJESH; PRINCY, 2015).

Outro importante microrganismo que habita a cavidade bucal é a bactéria *Enterococcus faecalis*, um coco gram positivo, anaeróbio facultativo. Na odontologia este microrganismo está intimamente relacionado ao insucesso do tratamento dos canais radiculares. Este microrganismo apresenta mecanismos de sobrevivência extremamente eficientes, como a habilidade de penetrar nos túbulos dentinários dos canais radiculares e sobreviver por longos períodos (AMARAL *et al.*, 2014; BUMB *et al.*, 2014; GURSOY; OZCAKIR-TOMRUK; TANALP, 2013; TENNERT *et al.*, 2014). Em alguns casos foram encontradas colonizações por bactérias do gênero *Eschechricia* em dentes com indicação endodôntica. Em decorrência do caráter poli microbiano da doença pulpar, bactérias deste gênero já foram isoladas e identificadas por técnicas moleculares. Entretanto, não há indícios de que as bactérias do gênero *Eschechricia* contribuam para a formação e desenvolvimento de doenças pulpares ou são simplesmente achados clínicos. (ESRAFIL BALAEI *et al.*, 2009; FARDIN *et al.*, 2011; HEGDE, 2013).

Uma opção no controle destes microrganismos é a utilização de antissépticos bucais. Os antissépticos contendo clorexidina ou triclosan são amplamente utilizados pela população. Ambos apresentam eficiente atividade antimicrobiana contra os microrganismos da cavidade bucal. Contudo, a clorexidina pode causar danos aos tecidos bucais como, manchamento dentário e lingual, sensação de queimação e perda de paladar (PAPAIOANNOU *et al.*, 2015; ELEY, 1999). Por sua vez, o triclosan pode acumular-se em tecidos como adipócitos e epidídimo, podendo

desencadear distúrbios endócrinos e de fertilidade (WANG, L.; ASIMAKOPOULOS; KANNAN, 2015; FORAN; BENNETT; BENSON, 2000).

Com o advento da descoberta da atividade antimicrobiana do mel e em especial do mel de abelhas indígenas sem ferrão, este produto natural pode ser utilizado como substituto dos princípios ativos na formulação de um antisséptico bucal, sem causar danos aos tecidos bucais e dentários. A atividade antimicrobiana do mel de abelhas indígenas sem ferrão está associada a uma série de componentes, como a grande quantidade de açúcares, baixo pH e a presença em menor quantidade de peróxido de hidrogênio, metilglioxal, leptosina e radicais livres. Em decorrência da grande quantidade de componentes, o mel de abelhas indígenas sem ferrão apresenta uma série de mecanismos de ação, dificultando a formação de resistência por parte dos microrganismos (BRUDZYNSKI; SJAARDA, 2015; MERCÊS *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2015). Além disso, este produto apícola apresenta atividade antimicrobiana contra cepas multiresistentes a antibióticos, reforçando seu potencial antimicrobiano (ALVES *et al.*, 2011; GONÇALVES, A. L.; FILHO; MENEZES, 2005; MERCÊS *et al.*, 2013; BOORN *et al.*, 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um antisséptico bucal contendo mel de abelhas indígenas sem ferrão, da espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille 1807 bem como, determinar sua atividade antimicrobiana e avaliar a citotoxicidade do novo produto.

2.2 Metodologia

2.2.1 Formulação da base do antisséptico bucal:

A formulação do antisséptico bucal foi desenvolvida da seguinte maneira: 1) Base: formula base: sem antisséptico; 2) Tri: fórmula padrão contendo triclosan (0,05%; p/p); 3) Clx: fórmula padrão contendo digluconato de clorexidina (0,12%; p/p); 4) MEL 5%: fórmula contendo mel (5,0%; v/v); 5) MEL 10%: fórmula contendo mel (10,0%; v/v); 6) MEL 20%: fórmula contendo mel (20,0%; v/v). Todas as amostras foram produzidas em ambiente estéril a temperatura ambiente (25°C ± 5°C).

2.2.2 Coleta do mel:

A amostra de mel utilizados neste estudo foi coletada do Meliponário da Unidade de Conservação Monte Sinai (Mauá da Serra - PR, Brasil), nos dias 18/02/2015 e 15/11/2015. A amostra de mel foi obtida a partir da abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica*, Latreille, 1807. Após a coleta, o mel foi mantido refrigerado a 8°C para manutenção de suas propriedades.

2.2.3 Cultivo dos microrganismos:

Foram utilizadas para os testes três bactérias, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Streptococcus mutans* UA159 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As placas contendo estes microrganismos foram mantidas a uma temperatura de 4°C a 8°C em placas de BHI-ágar (Brain heart infusion Ágar). Para a realização dos testes, foram coletadas 5 colônias de cada microrganismo com alça descartável em ambiente estéril em falcon de 50 mL contendo dentro do tubo 10 mL de BHI-caldo (Brain heart infusion brought). Em seguida, os microrganismos *E. faecalis* e *E. coli* foram incubados em um shaker por 16 horas com temperatura constante de 37°C a 150 rpm. Já o microrganismo *S. mutans* foi incubado por 16 horas em uma estufa a temperatura constante de 37°C com 5% de CO₂ sem agitação.

2.2.4 Teste da atividade antimicrobiana por difusão em ágar:

Após 16 horas de crescimento, os inóculos foram lavados três vezes com PBS e preparada uma suspensão bacteriana diluída com PBS com turbidez semelhante à da escala de McFarland 0,5 em tubo de vidro transparente, em ambiente estéril, totalizando $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, foi colocado uma fina camada de Agar bacteriológico (Kasvi) no fundo da placa. Após, uma camada de 20 mL BHI-ágar (1%), contendo 150 μ l da suspensão de microrganismos avaliados, foi depositada sobre o ágar bacteriológico. Em seguida, a camada de BHI-ágar foi perfurada 4 vezes para a confecção dos poços com uma pipeta de mil microlitros, em seguida foi removido o tampão de cada poço, assim tendo como fundo a camada de ágar bacteriológico. Então foi adicionado em cada poço uma das formulações antissépticas bucais contendo mel 5%, 10% e 20% (v/v). O último poço de cada placa foi preenchido com um dos controles (Base, Triclosan ou Clorexidina). O teste com o mel puro também foi realizado, utilizando 4 poços por placa para cada microrganismo. Após 24 horas, os halos de inibição foram medidos com o auxílio de um paquímetro eletrônico. Em seguida foi realizada a subtração do halo de inibição pelo poço. Os resultados foram expressos em milímetros.

2.2.5 Ensaio de viabilidade celular:

A citotoxicidade dos antissépticos foi avaliada com base na oxidação mitocondrial do MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio; azul de tiazolilo) (Sigma) (MOSMANN, 1983). Células FaDu, foram cultivadas em placas de 96 poços (3×10^4 células / poço / 200 μ L), durante 1, 15, 30, 45, 60, 120 segundos, meia hora e uma hora em meio RPMI com 10% de soro bovino fetal a 37°C em 5% de CO₂. Os tratamentos recebidos foram: somente meio de cultura RPMI, salina tamponada com fosfato (PBS), TRITON a 0,1%, a base do antisséptico bucal e antissépticos bucais contendo 5%, 10% e 20% do mel. Após os tratamentos, os sobrenadantes foram removidos e as células receberam 10 μ L de MTT (5mg/mL) durante 3 horas a 37°C em 5% de CO₂. Os cristais de formazan foram solubilizados em 10% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e 50% de Dimetil Formamida (DMF), e após 30 minutos de absorvância foi mensurada a 570 nm em um leitor de placas (Leitor de TP, Thermo Placa Thermo Plate –TP-Reader). Os resultados foram expressos como

porcentagem relativa da redução de MTT para o grupo controle calculada da seguinte forma:

Células viáveis (%) = (DO da célula tratada/DO da célula não tratada) x 100.

2.2.6 Curva de crescimento e morte

Após 16 horas de crescimento, os inóculos foram lavados três vezes com PBS e preparada uma suspensão bacteriana diluída com PBS com turbidez semelhante à da escala de McFarland 0,5 em tubo de vidro transparente, em ambiente estéril, totalizando $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para realização da curva de crescimento e morte celular, cada composto foi testado nos tempos de 1, 15, 30, 45, 60, 120 segundos, 30 minutos e 1 hora, utilizando para isto um microtubo contendo 995 μ l do composto e 5 μ l do microrganismo. Para cada tempo foi utilizado um microtubo novo. Após o microrganismo entrar em contato com o composto, o microtubo foi vortexado e colocado na estufa a 37°C até o término do tempo. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 10 μ l e diluída 1:10, 1:100 e 1:1000. Na última diluição foram retirados 10 μ l para plaqueamento em BHI ágar e colocado na estufa por 24 horas. Após o tempo de incubação, as colônias foram contadas.

2.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para a microscopia eletrônica de varredura, as lamínulas foram lavadas com detergente neutro, imersas em álcool 50% por 1 hora, imersas em álcool 100% até total evaporação e esterilizadas por autoclavação. Após, as lamínulas foram tratadas com 20 μ L de Poly-L-Lisina (Sigma, 0,1%) e adicionadas em uma placa de 24 poços. A solução fixadora foi preparada no dia do experimento e continha glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato a 0,1 M, com pH 7,2. Para o experimento, foram colhidas 5 colônias de *S. mutans* UA 159 da placa de cultura com alça descartável em ambiente estéril, adicionadas a 10 mL de BHI-caldo em um falcon de 50 mL e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ sem agitação por 16 horas. Após este tempo, o inóculo foi lavado 3 vezes com PBS e preparada uma suspensão bacteriana diluída com a formulação base do antisséptico bucal (sem adição de mel) com turbidez semelhante a escala de Mc Farland nº1 em um tubo de vidro transparente estéril. No microtubo foi adicionado 90 μ L da formulação antisséptica

bucal a 20% (v/v) ou da base (controle negativo) mais 10 µL do inóculo citado acima. Os tubos foram vortexados e incubados a 37°C com 5% de CO₂ sem agitação por 3 tempos distintos: 1 minuto, 15 minutos e 30 minutos. Os grupos antisséptico e base foram fixados separadamente, colocando 20 µL em cada lamínula e 20 µL do fixador, respeitando os tempos já citados acima. Após, as amostras foram levadas para a estufa para evaporação de parte do líquido por 40 minutos a 40°C. Cada poço contendo uma lamínula foi acrescentado com 480 µL da solução fixadora (descrita acima). A amostra ficou por 12 horas coberta com papel alumínio a temperatura ambiente antes da desidratação. As amostras foram desidratadas dentro de uma capela, a solução fixadora foi removida e as amostras foram lavadas com 500 µL de tampão cacodilato 0,1 M por 3 vezes por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a pós fixação com Tetróxido de Ósmio a 1% e cacodilato a 0,1 M com ± 80 µl por lamínula por 1 hora em local escuro. Após este passo o Tetróxido de Ósmio foi removido e as amostras foram lavadas novamente com 500 µL de tampão cacodilato a 0,1 M por 3 vezes, 15 minutos cada. Em seguida o cacodilato foi removido e as amostras foram desidratadas com álcool 70, 80, 90 e 100% por 3 vezes de 15 minutos e então as amostras foram estocadas em álcool 100% até o processamento. As amostras foram analisadas pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da Universidade Estadual de Londrina, utilizando um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200.

Após as amostras passarem pelo ponto crítico (troca do álcool 100% pelo CO₂) as amostras foram colocadas em um stub de acrílico e fixadas com uma fita de carbono. Depois estes foram metalizados na sua superfície com uma fina camada de ouro, utilizando vácuo com Argônio com corrente de 40mA por 100s. Depois este foi levado ao microscópio eletrônico de varredura utilizando um aumento de 2.500, 5.000 e 40.000 vezes para análise.

2.2.8 Análise estatística:

Todos os dados apresentados representam valores médios de três experimentos em tréplica.

Para os testes de atividade antimicrobiana por ágar difusão, foram utilizados o Anova de uma via e o teste de Tukey para analisar a diferença entre as médias.

Já para os testes de curva de crescimento e morte celular e de viabilidade celular foram utilizados os testes de Anova de duas vias e teste de Bonferroni para analisar a diferença entre as médias.

Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism 5.0.

2.3 Resultados:

2.3.1 Teste da atividade antimicrobiana por difusão em ágar:

A Fig. 1 demonstra o resultado do teste de ágar difusão realizado com as bactérias *S. mutans*, *E. faecalis* e *E. coli*. Observou-se que o mel de abelha sem ferrão puro tem atividade antimicrobiana para os três microrganismos testados, porém apresenta uma maior atividade para o microrganismo *E. coli* ($p < 0,05$) com halo de inibição de 30 mm (Fig. 1).

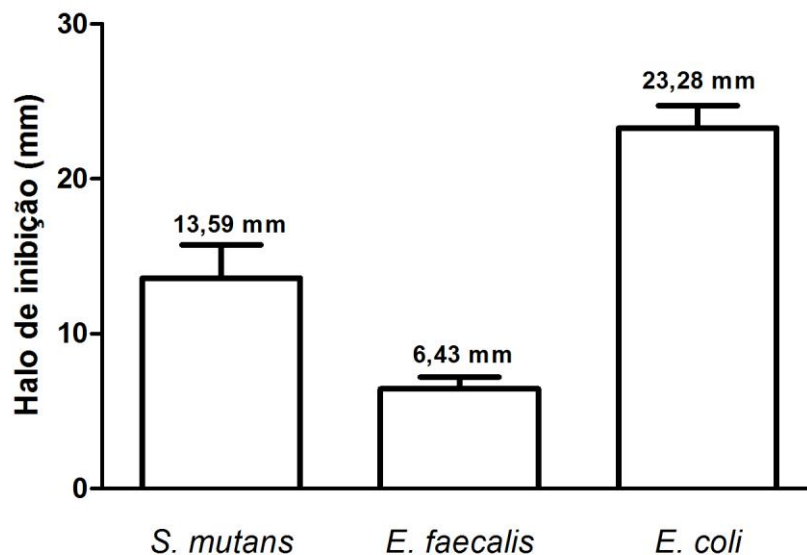


Figura 1 - Atividade antimicrobiana do mel de abelha sem ferrão.

A Fig. 2 demonstra o resultado do teste de ágar difusão realizado com *E. faecalis*. Assim, foi observado que a Base do produto sem mel e o antisséptico a 5% (v/v) não apresentaram atividade antimicrobiana. Já os controles Triclosan e Clorexidina apresentaram elevada atividade antimicrobiana. Os antissépticos nas

concentrações de 10% (v/v) e 20% (v/v) apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactéria, porém com atividade menor que os controles positivos ($p < 0,05$).

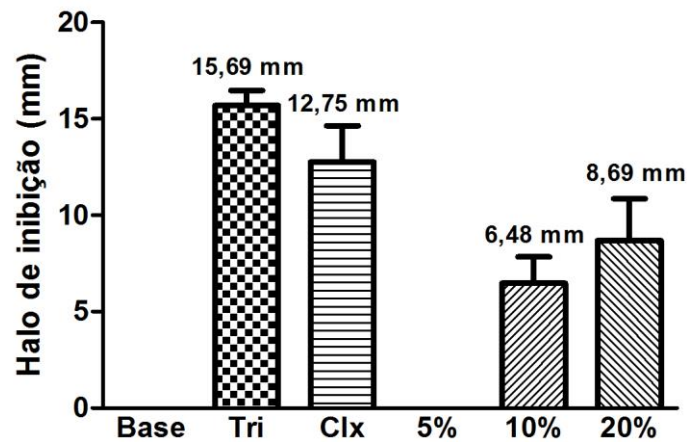


Figura 2 - Avaliação antimicrobiana da Base, Tri e Clx e do antisséptico bucal nas concentrações 5%, 10% e 20% (v/v) para *E. faecalis*.

A Fig. 3 apresenta o teste de difusão em ágar difusão para a bactéria *E. coli*. É possível observar que a Base e o antisséptico nas concentrações de 5 e 20% não apresentaram atividade antimicrobiana para este microrganismo, já os controles Triclosan, Clorexidina e o antisséptico na concentração de 10% demonstra uma discreta atividade antimicrobiana.

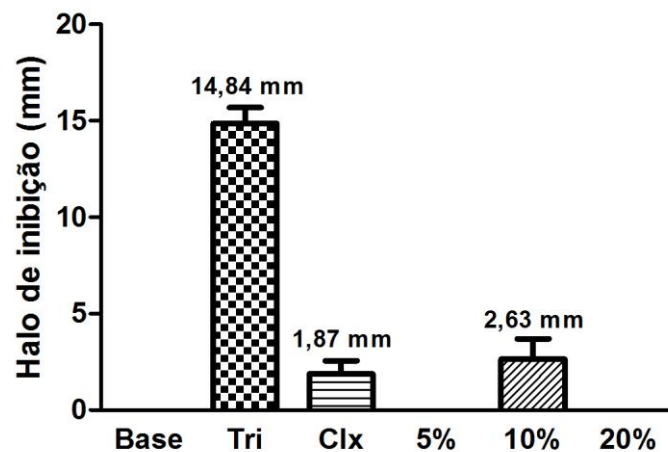


Figura 3 - Avaliação antimicrobiana da Base, Tri e Clx e do antisséptico bucal nas concentrações 5%, 10% e 20% (v/v) para *E. coli*.

A Fig. 4 apresenta o teste antimicrobiano para a bactéria *S. mutans*, onde observamos que a Base e o antisséptico a 5% não apresentaram atividade antimicrobiana, já o antisséptico bucal nas concentrações de 10 e 20% e ambos os controles Triclosan e Clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana. Entretanto,

a melhor atividade antimicrobiana contra esta bactéria foi apresentada pela formulação contendo 20% do mel.

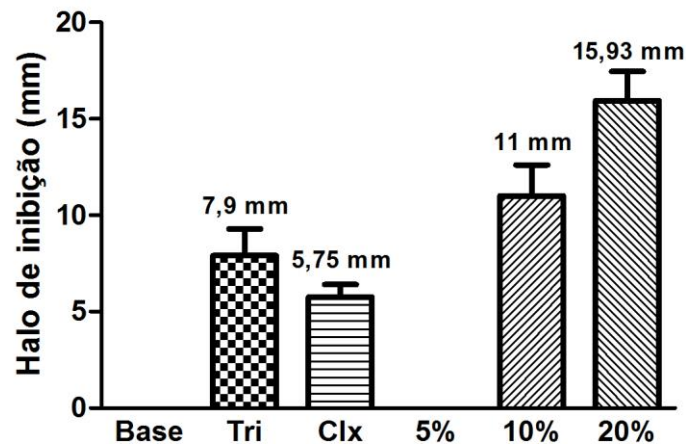


Figura 4 - Avaliação antimicrobiana da Base, Tri e Clx e do antisséptico bucal nas concentrações 5%, 10% e 20% (v/v) para *S. mutans*.

2.3.2 Curva de crescimento e morte

A Fig. 5 apresenta os resultados do teste da curva de sobrevivência e morte para o microrganismo *E. faecalis*. As concentrações de 10% (v/v) e 20% (v/v) do antisséptico bucal demonstram atividade antimicrobiana nos tempos testados, porém o antisséptico a 20% (v/v) apresenta um melhor resultado com 120 segundos se comparado com o antisséptico a 10% (v/v) ($p < 0,05$). A base e o antisséptico a 5% não demonstraram atividade antimicrobiana. Já o triclosan e a clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana e total eliminação do microrganismo a partir de 30 minutos.

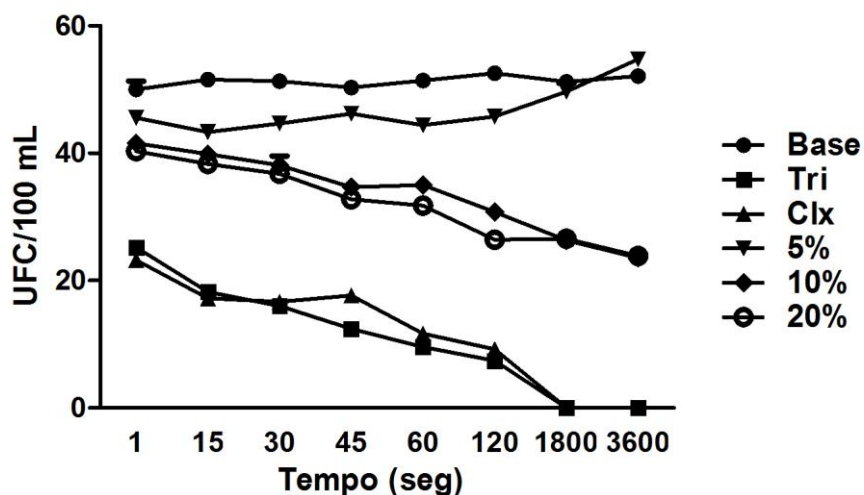


Figura 5 - Curva de sobrevivência para as formulações controle Base, Tri e Clx e as formulações acrescidas de mel 5%, 10% e 20% (v/v) para *E. faecalis*.

A Fig. 6 apresenta os resultados do teste da curva de sobrevivência e morte para o microrganismo *E. coli*. A formulação base e antisséptica não apresenta atividade antimicrobiana. Já o triclosan e a clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana e total eliminação do microrganismo a partir de 30 minutos.

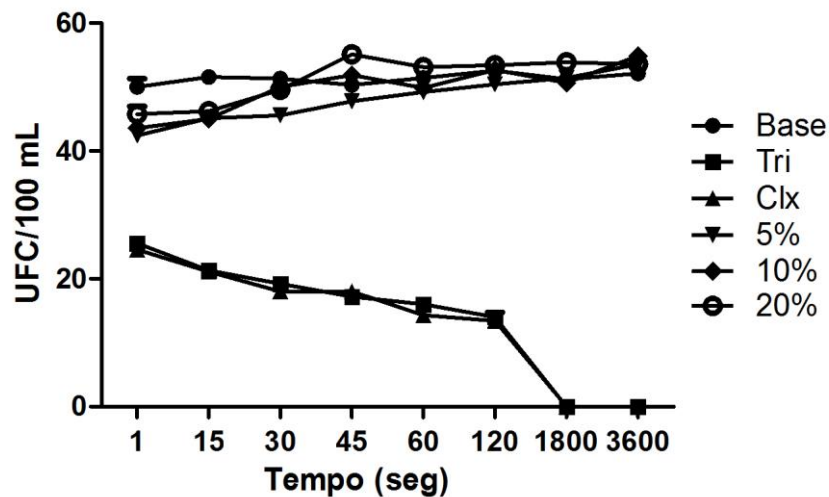


Figura 6 - Curva de sobrevivência para as formulações controle Base, Tri e Clx e as formulações acrescidas de mel 5%, 10% e 20% (v/v) para *E. coli*.

A Fig. 7 apresenta os resultados do teste da curva de sobrevivência e morte para o microrganismo *S. mutans*. As concentrações do antisséptico bucal a 10% (v/v) e 20% (v/v) apresentam atividade antimicrobiana nos tempos testados, porém sem diferença entre eles ao longo do tempo ($p < 0,05$). Tanto a base como o antisséptico a 5% (v/v) não demonstraram atividade antimicrobiana. Clorexidina e Triclosan obtiveram os melhores resultados ($p < 0,05$) e eliminaram completamente os microrganismos nos tempos de 30 minutos e 1 hora.

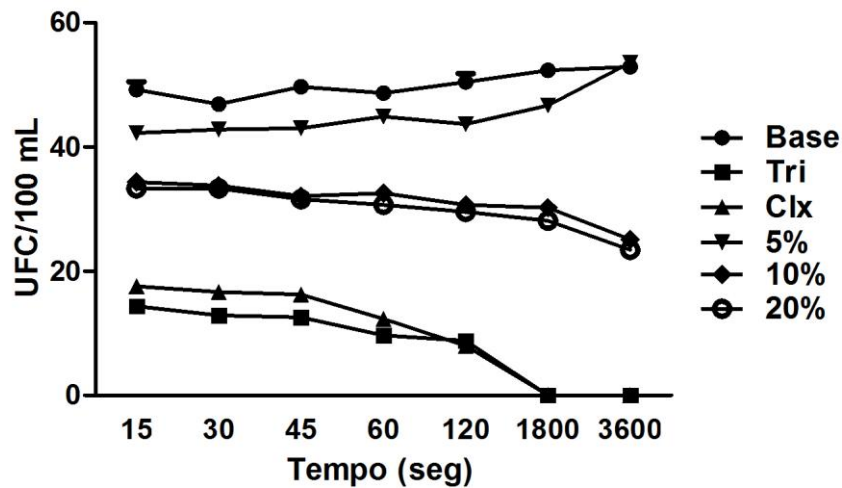


Figura 7 - Curva de sobrevivência para as formulações base, acrescida de mel (5%, 10% e 20% v/v) e os controles Tri e Clx para *S. mutans*.

2.4.3 Ensaio de viabilidade celular

A figura Fig. 8 demonstra o efeito do tratamento com a Base comparada com diferentes controles ($p < 0,05$). Mesmo a Base apresentando diferença estatística significativa se comparado com o meio de cultura das células ($p < 0,05$), a Base do produto não apresenta efeito citotóxico como o Triton ($p < 0,05$) ou o PBS ($p < 0,05$), ficando bem acima dos 50% da viabilidade celular.

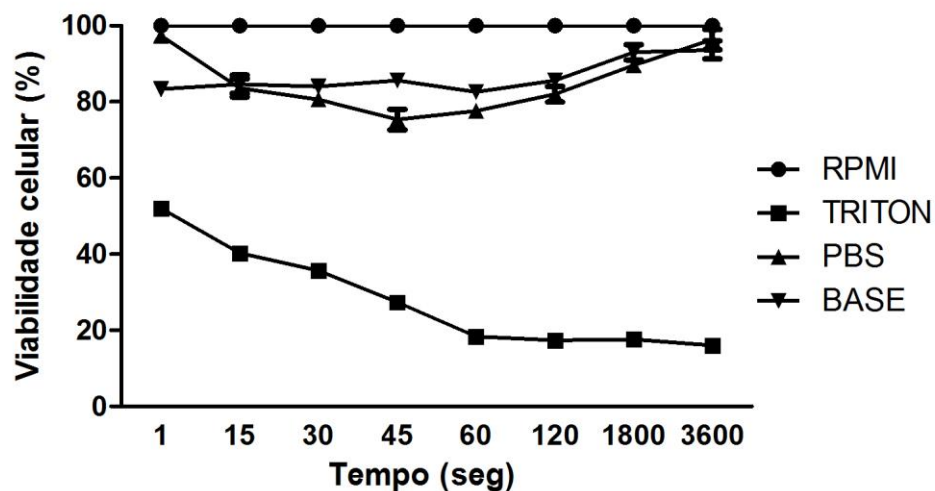


Figura 8 - Ensaio de viabilidade celular com células FaDu testadas em RPMI, TRITON, PBS e Base.

A Fig. 9 demonstra o efeito do tratamento com os antissépticos a base de mel de abelha sem ferrão comparados com RPMI, Triton e Base ($p < 0,05$). O teste

demonstrou que mesmo com uma ligeira queda da viabilidade celular, o antisséptico bucal a 5% (v/v), 10% (v/v) e 20% (v/v) com 45 segundos do teste, as três concentrações não apresentaram efeito citotóxico para esta linhagem celular se comparados com o Triton ($p < 0,05$).

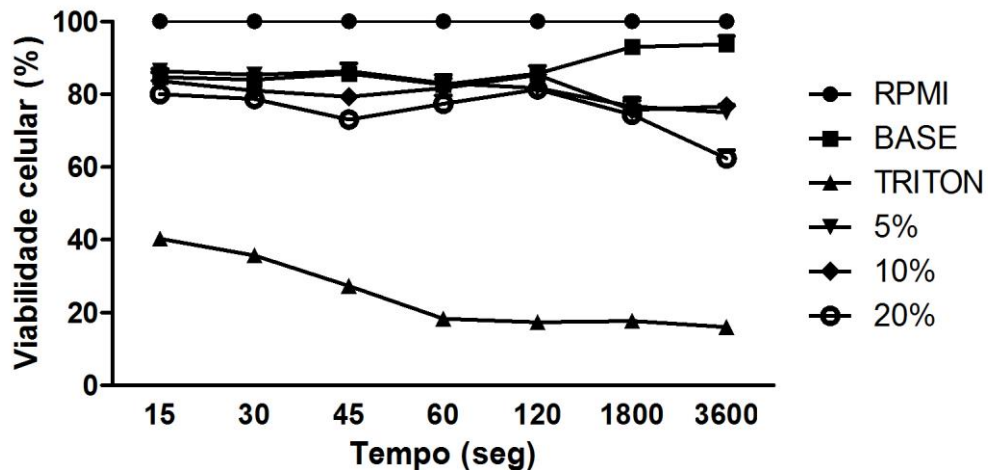


Figura 9 - Ensaio de viabilidade celular com células FaDu testados em RPMI, antisséptico bucal contendo mel à 5% ,10% e 20% (v/v).

2.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

A Fig 10 apresenta os danos causados ao microrganismo *S. mutans* através da microscopia eletrônica de varredura em diferentes tratamentos de 1 minuto, 15 minutos e 30 minutos com antisséptico bucal contendo de mel de abelha a 20% (v/v) e a base do produto. O antisséptico bucal a 20% (v/v) foi capaz de causar danos a parede celular do microrganismo, desorganização celular e queda na quantidade de microrganismos (Figura 10 B, D e F). Já a base do produto (Fig 10, A, C e D) não causou nenhum tipo de alteração visível ao microrganismo.

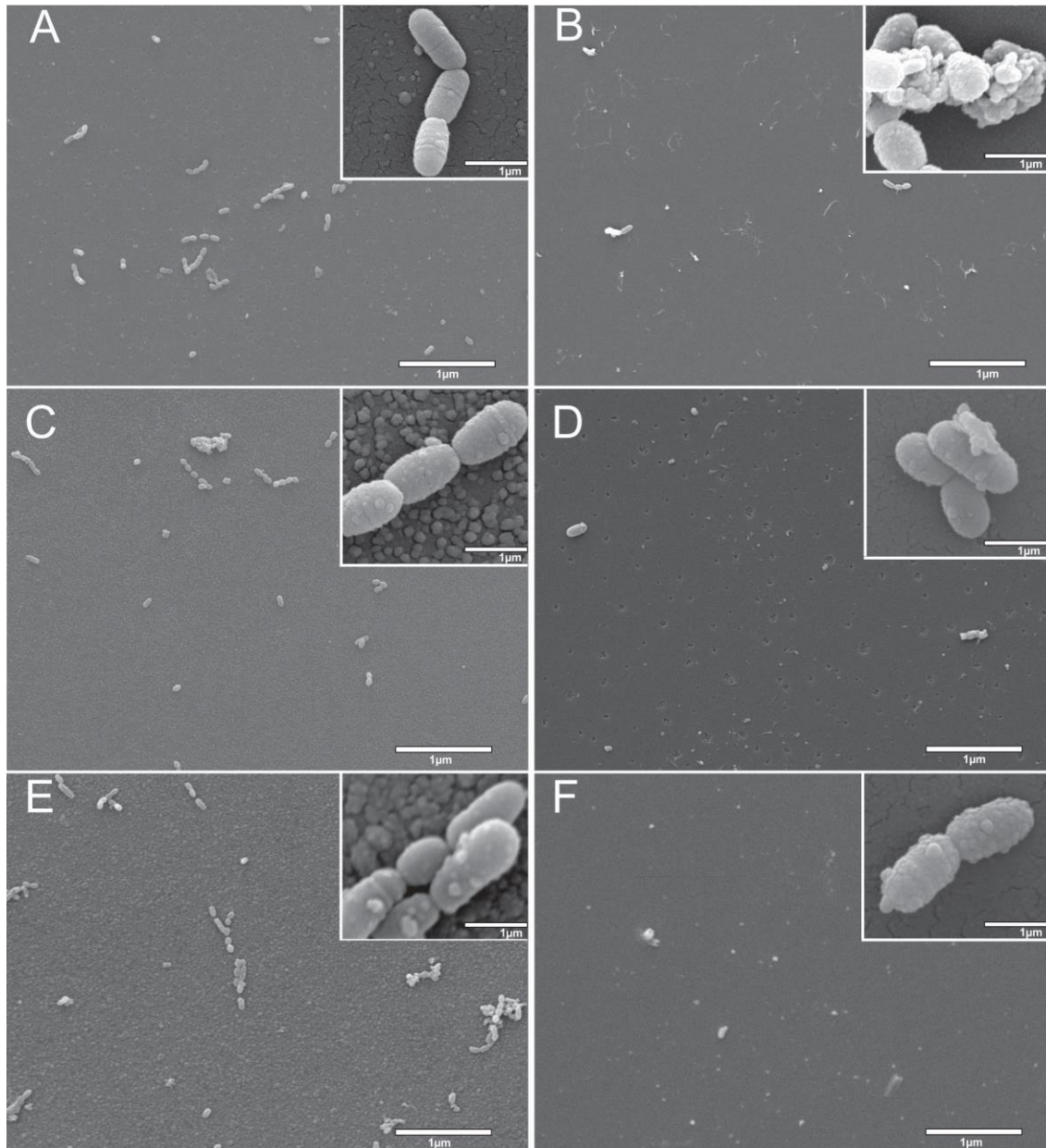


Figura 10 - Imagem da atividade antimicrobiana do antisséptico bucal contendo de mel de abelha a 20% (v/v), através da microscopia eletrônica de varredura. A, C e E: Controle negativo, tratamento com a base por 1, 15 e 30 minutos. B, D e E: Tratamento com antisséptico bucal nos mesmos tempos.

2.5 Discussão

Os primeiros estudos avaliando a atividade antimicrobiana do mel de abelhas sem ferrão começaram com Gonnet e colaboradores (1964). Desde então, pesquisas são realizadas no intuito de encontrar um ou desenvolver um produto a base de mel de abelhas sem ferrão que apresentem propriedades antimicrobianas capazes de eliminar um amplo espectro de microrganismos (BOANERGES *et al.*, 2013; BOORN *et al.*, 2010; ANDUALEM, 2013; ZAINOL; MOHD YUSOFF; MOHD

YUSOF, 2013). A formulação de um antisséptico bucal contendo mel de abelhas indígenas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona postica*, (Latreille, 1807) é inédita, no mercado de cosméticos e higiene pessoal. Fato esse que justifica a realização do presente estudo.

Os resultados apresentados com o teste de difusão em ágar demonstram que o mel puro de abelhas indígenas sem ferrão (Fig. 1), apresenta atividade antimicrobiana para as bactérias testadas. Os efeitos antimicrobianos do mel de abelhas indígenas sem ferrão devem-se, em parte a alta concentração de açúcares e o baixo pH, causando estresse osmótico e desfavorecendo o crescimento bacteriano, levando os microrganismos a morte (MCLOONE; WARNOCK; FYFE, 2015; CARNWATH *et al.*, 2014).

Ao desenvolver-se a formulação base do antisséptico bucal, é importante que a mesma não influencie na atividade antimicrobiana quando adicionamos o mel de abelhas indígenas sem ferrão. As figuras 2 a 7 demonstram que a formulação base não apresenta atividade antimicrobiana em nenhum dos tempos testados, comprovando que o mel adicionado a base é responsável pela atividade antimicrobiana. Ao adicionar o mel de abelhas sem ferrão à base do produto, ocorre uma diluição dos açúcares presentes, diminuindo o efeito da osmolaridade na atividade antimicrobiana. Mesmo assim, a atividade antimicrobiana das formulações antissépticas a 10% e 20% (v/v) foi maior se comparada com o mel puro frente aos microrganismos *S. mutans* e *E. faecalis*. Nossos resultados vão de encontro com o trabalho de Chinakwe (2006), onde o autor explica que, adição de água ao mel, aumenta a atividade antimicrobiana devido a enzima glucose-oxidase. Quando o mel é diluído, a enzima glucose-oxidase, que produz o peróxido de hidrogênio, é ativada, ocorrendo assim uma maior produção do peróxido de hidrogênio e eliminando os microrganismos (MOLAN, P. C.; BETTS, 2004). Demonstrando assim, a variedade dos mecanismos de ação presentes do mel de abelhas (COHEN *et al.*, 2014; BRUDZYNSKI; SJAARDA, 2015 ; BOANERGES *et al.*, 2013 ; COOKE *et al.*, 2015).

O teste de sobrevivência e morte bacteriana, realizado com bactérias *E. faecalis* e *S. mutans* (Fig. 5 e 7), apresentou uma significativa queda na taxa de microrganismos ao longo do tempo com as formulações a 10% e 20% (v/v), ao contrário dos controles triclosan e clorexidina que demonstraram atividade antimicrobiana mais acentuada. A clorexidina apresenta dois importantes mecanismos de ação, como a desestabilização da membrana plasmática pela

ligação de moléculas de clorexidina aos fosfolipídios, liberando assim moléculas de baixo peso molecular como íons de potássio, impedindo que ocorram importantes reações como a respiração celular e concomitante a isto, ocorre a coagulação das macromoléculas da célula (PRASAD *et al.*, 2015; ELEY, 1999; JONES *et al.*, 1997). Já o triclosan, tem como mecanismos de ação a difusão pela parede da célula e o rompimento da membrana citoplasmática, do RNA, lipídeos e proteínas (JONES, R. D. *et al.*, 2000). Podemos supor que, o mecanismo de ação de ambos os produtos controles, agem de maneira direta, em locais de grande importância para sobrevivência do microrganismo. Já as formulações testadas nas concentrações de 10% e 20% (v/v) eliminaram os microrganismos, em menor quantidade quando comparados com os controles utilizados neste trabalho. Isto provavelmente ocorra, devido ao sítio de atuação dos compostos antimicrobianos presentes no mel, devendo atingir outros locais importantes para sobrevivência do microrganismo mas levando maior tempo para apresentar efeito antimicrobiano (GAREDEW; SCHMOLZ; LAMPRECHT, 2004; GAREDEW; SCHMOLZ; LAMPRECHT, 2004).

A formulação antisséptica contendo mel de abelhas indígenas sem ferrão a 5%, 10% e 20% (v/v) não demonstrou efeito para a bactéria *E. coli* (Fig. 6). Provavelmente a sazonalidade pode ter interferido na atividade antimicrobiana da formulação. O mel coletado no dia 18/02/2015, onde foram realizados os testes de difusão em ágar (Fig. 2) apresentou atividade antimicrobiana apenas na concentração de 10% (v/v). Porém, com a coleta realizada no inverno no dia 15/11/2015, no início de novembro, a formulação antisséptica bucal nas três concentrações perdeu efeito para o microrganismo *E. coli*. Provavelmente as plantas da qual o pólen foi coletado no começo do ano não são as mesmas da do mês de novembro, modificando assim as suas propriedades antimicrobianas e como consequência, as abelhas deixaram de coletar algum componente ou uma série de componentes, comprometendo a atividade antimicrobiana da formulação antisséptica. Como consequência demonstrando que outros componentes no mel estão envolvidos na atividade antimicrobiana (BOANERGES *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2014; BORBA *et al.*, 2015).

O teste de viabilidade celular utilizando células FaDu (Fig. 8 e 9) demonstrou que a formulação Base e antisséptica bucal nas concentrações 5%, 10% e 20% (v/v) não apresentam citotoxicidade nos tempos testados para esta linhagem celular. Os tempos utilizados de 1 até 120 segundos, foram baseados no trabalho de Pithon e

colaboradores (2011), onde esta faixa de tempo foi elegida como os tempos máximo e mínimo que um paciente realiza o bochecho com antisséptico bucal. Os tempos de meia hora e uma hora simulam o tempo do produto em contato direto com as células do epitélio bucal de pacientes com xerostomia. Atualmente os antissépticos bucais presentes no mercado, apresentam efeito citotóxico para células da cavidade bucal de pacientes com ou sem xerostomia (CHEVALIER *et al.*, 2015). Pensando nisto, o teste de viabilidade celular demonstra que, seria possível pacientes utilizarem a formulação antisséptica bucal a base de mel de abelhas indígenas sem ferrão da espécie *S. postica*, sem que ocorra o risco do desenvolvimento de lesões na cavidade bucal de pacientes, principalmente dos pacientes com xerostomia. Os resultados do presente trabalho diferem do resultado autor FAUZI e colaboradores (2011), onde foi demonstrado a atividade citotóxica do mel de abelha sem ferrão de outra espécie. As diferenças entre os trabalhos devem-se, aos tempos utilizados e a espécies de abelhas diferentes. Até o presente momento, nenhum mel de abelha sem ferrão foi testado nos mesmos moldes do nosso trabalho.

A microscopia eletrônica de varredura (Fig. 10), demonstra os efeitos do antisséptico bucal contendo mel de abelhas indígenas sem ferrão a 20% no microrganismo *S. mutans* em diferentes tempos de 1,15 e 30 minutos. É possível notar que com 1 minuto danos expressivos são encontrados no microrganismo, como a formação de vesículas na parede celular, provavelmente estes são indícios do microrganismo tentando expulsar o produto para fora do citoplasma (fig 9 B), desorganização celular e queda brusca na quantidade de microrganismos. Este padrão se repete, porém com maior intensidade nos tempos de 15 e 30 minutos (fig 10 D e F). Nossos resultados vão ao encontro com outras pesquisas que utilizaram a microscopia eletrônica como é o caso do mel de abelha *jujube* onde ele causou mais de 40% de inibição do biofilme do fungo *Candida albicans*, encolhimento do microrganismo e formação de vesículas na parede celular (ANSARI *et al.*, 2013). Já outro trabalho demonstrou danos como remoção parcial da parede celular e diferentes alterações morfológicas no microrganismo *Staphylococcus aureus* (NISHIO *et al.*, 2016).

2.6 Conclusão

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que, o mel de abelhas indígenas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona postica*, (Latreille 1807) apresenta atividade antimicrobiana. A concentração a 5% (v/v) e a base. As formulações a 10% e 20% (v/v) apresentam atividade antimicrobiana para os microrganismos *S. mutans* e *E. faecalis*, A formulação a 10% (v/v) apresenta atividade antimicrobiana com o teste de difusão em ágar para o microrganismo *E. coli*, mas com a segunda coleta, as formulações perderam atividade para este microrganismo, devido a sazonalidade. A melhor concentração testada foi a de 20% para *S. mutans* e *E. faecalis* e a formulação base e antisséptica nas 3 concentrações, não apresentam efeito citotóxico. A microscopia eletrônica de varredura mostrou a capacidade do produto na eliminação da população microbiana e severos danos causados ao microrganismo *S. mutans*.

2.7 Referências do artigo:

ALVES, T. *et al.* Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 91–97, 2011.

AMARAL, F. B. *et al.* Comparative evaluation of photodynamic therapy using LASER or light emitting diode on cariogenic bacteria: An in vitro study. **European Journal of Dentistry**, v. 8, n. 4, p. 509–514, 2014.

ANDUALEM, B. Combined antibacterial activity of stingless bee (*Apis mellipodae*) honey and garlic (*Allium sativum*) extracts against standard and clinical pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 9, p. 725–731, 2013.

ANSARI, M. J. *et al.* Effect of jujube honey on *Candida Albicans* growth and biofilm formation. **Archives of Medical Research**, v. 44, n. 5, p. 352–360, 2013.

APARNA, S. *et al.* A comparative evaluation of the antibacterial efficacy of honey in vitro and antiplaque efficacy in a 4-day plaque regrowth model in vivo: preliminary results. **Journal of periodontology**, v. 83, n. 9, p. 1116–21, 2012.

BOANERGES, R. *et al.* Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. ***BioMed Central***, v. 13, p. 151, 2013.

BOORN, K. L. *et al.* Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. ***Journal of Applied Microbiology***, v. 108, n. 5, p. 1534–1543, 2010.

BORBA, R. S. *et al.* Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. ***Journal of Experimental Biology***, n. October, 2015.

BRUDZYNSKI, K.; SJAARDA, C. Honey Glycoproteins Containing Antimicrobial Peptides, Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1, Are Responsible for the Cell Wall Lytic and Bactericidal Activities of Honey. ***Plos One***, v. 10, n. 4, p. 2–21, 2015.

BUMB, S. S. *et al.* Assessment of Photodynamic Therapy (PDT) in Disinfection of Deeper Dentinal Tubules in a Root Canal System: An In Vitro Study. ***Journal of Clinical and Diagnostic Research***, v. 8, n. 11, p. 67–71, 2014.

CARNWATH, R. *et al.* The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates. ***The Veterinary Journal***, v. 199, n. 1, p. 110–114, 2014.

CARVALHO, C. A. L. DE. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. ***Bahia: Universidade Federal da Bahia***, 2005.

CHEVALIER, M. *et al.* Antiseptic mouthwashes could worsen xerostomia in patients taking polypharmacy. ***Acta Odontologica Scandinavica***, v. 73, n. 4, p. 267–273, 2015.

CHINAKWE, E. Antibacterial effect of honey formulation on bacteria isolated from wounds. ***Nigerian Journal of Microbiology***, v. 20, n. 3, 2006.

COHEN, S. *et al.* Antimicrobial Properties of Honey. ***American Journal of Therapeutics*** 21, v. 21, n. 4, p. 1160–1163, 2014.

COOKE, J. *et al.* The antimicrobial activity of prototype modified honeys that generate reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide. ***BMC Research Notes***, v. 8, n. 1, p. 20, 2015.

COOPER, R.; MOLAN, P.; HARDING, K. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. ***Journal of the Royal Society of Medicine***, v. 92, p. 283–285, 1999.

DALMASSO, M. *et al.* Isolation of a Novel Phage with Activity against *Streptococcus mutans* Biofilms. ***Plos One***, p. 1–18, 2015.

DE MOURA, C. D. V. S. *et al.* Microbiological assessment of the effectiveness of chlorhexidine mouthrinse before taking impressions of the oral cavity. ***Revista Odonto Ciencia***, v. 27, n. 2, p. 156–160, 2012.

DE ROSSI, A. *et al.* Antimicrobial activity of toothpastes containing natural extracts, chlorhexidine or triclosan. ***Brazilian Dental Journal***, v. 25, n. 3, p. 186–190, 2014.

ELEY, B. M. Periodontology: Antibacterial agents in the control of supragingival plaque — a review. ***British Dental Journal***, v. 186, n. 6, p. 286–296, 1999.

ESRAFIL BALAEI, G. *et al.* Microbial Flora of Root Canals of Pulpally-infected Teeth: *Enterococcus faecalis* a Prevalent Species. ***Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects***, v. 3, n. 1, p. 24–27, 2009.

EWNETU, Y.; LEMMA, W.; BIRHANE, N. Antibacterial effects of *Apis mellifera* and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, Northwest Ethiopia. ***BMC complementary and alternative medicine***, v. 13, n. 1, p. 269, 2013.

FALSETTA, M. L. *et al.* Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. ***Infection and immunity***, v. 82, n. 5, p. 1968–81, maio 2014.

FARDIN, R. F. *et al.* Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microrganismos da cavidade oral. ***Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde***, v. 13, n. 3, p. 10–16, 2011.

FAUZI, A. N.; NORAZMI, M. N.; YAACOB, N. S. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. ***Food and Chemical Toxicology***, v. 49, n. 4, p. 871–878, 2011.

FEDOROWICZ, Z. *et al.* Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, n. 4, 2010.

FORAN, C. M.; BENNETT, E. R.; BENSON, W. H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: Triclosan. **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, p. 153–156, 2000.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp. and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. **Thermochimica Acta**, v. 415, n. 1-2, p. 99–106, 2004.

GONÇALVES, A L.; FILHO, A A.; MENEZES, H. Atividade Antimicrobiana Do Mel Da Abelha Nativa Sem Ferrão *Nannotrigona Testaceicornis* (Hymenoptera : Apidae , Meliponini). **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p. 455–459, 2005.

GONÇALVES, E. D. A. Avaliação da eficácia antimicrobiana dos enxaguatórios bucais contendo como princípios ativos o triclosan , cloreto de cetilpiridínio e óleos essenciais Composição dos colutórios bucais comercialmente disponíveis. **HU Revista, Juiz de Fora**, v. 39, p. 45–50, 2013.

GONNET, M.; LAVIE, P.; NOGUEIRA-NETO, P. Etude de quelques caracteristiques des miels recoltés por certains Meliponines bresiliens. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 258, p. 3107–3109, 1964.

GROBLER, S. R.; DU TOIT, I. J.; BASSON, N. J. The effect of honey on human tooth enamel in vitro observed by electron microscopy and microhardness measurements. **Archives of oral biology**, v. 39, n. 2, p. 147–153, 1994.

GUNSOLLEY, J. C. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. **Journal of Dentistry**, v. 38, n. v. 1, p. S6–S10, 2010.

GURSOY, H.; OZCAKIR-TOMRUK, C.; TANALP, J. Photodynamic therapy in dentistry : a literature review. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, p. 1113–1125, 2013.

HAAPASALO, M.; UDNÆS, T.; ENDAL, U. Persistent , recurrent , and acquired infection of the root canal system post-treatment. **Endodontic Topics**, p. 29–56, 2003.

HEGDE, A. M. Prevalence of selected microorganisms in the pulp space of human deciduous teeth with irreversible pulpitis. **Endodontology**, v. 25, n. 1, p. 107–111, 2013.

JAKUBOVICS, N. S. Intermicrobial interactions as a driver for community composition and stratification of oral biofilms. **Journal of Molecular Biology**, 2015.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontology 2000**, v. 15, p. 55–62, 1997.

JONES, R. D. *et al.* Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. **American journal of infection control**, v. 28, n. 2, p. 184–196, 2000.

KAUR, G.; RAJESH, S.; PRINCY, S. Plausible Drug Targets in the Streptococcus mutans Quorum Sensing Pathways to Combat Dental Biofilms and Associated Risks. **Indian Journal of Microbiology**, v. 4, p. 349–356, 2015.

KOLOSOWSKI, K. P. *et al.* Qualitative Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Root Dentin Irrigated with Sodium Hypochlorite, EDTA, or Chlorhexidine. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 10, p. 1672–1677, 2015.

LIU, M. *et al.* Antibiotic-specific differences in the response of Staphylococcus aureus to treatment with antimicrobials combined with manuka honey. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. January, p. 1–9, 2015.

LUSBY, P. E.; COOMBES, A. L.; WILKINSON, J. M. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 5, p. 464–467, 2005.

MANDAL, M. D.; MANDAL, S. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154–160, 2011.

MCLOONE, P.; WARNOCK, M.; FYFE, L. Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, p. 1–7, 2015.

MERCÊS, M. D. *et al.* Antimicrobial activity of honey from five species of Brazilian stingless bees. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 43, n. 4, p. 672–675, 2013.

MOLAN, P. C.; BETTS, J. A. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. **Journal of wound care**, v. 13, n. 9, p. 353–356, 2004.

MOLAN, P.; RHODES, T. Honey: A Biologic Wound Dressing. **Wounds A Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 27, 2015.

NISHIO, E. K. *et al.* Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific Reports**, v. 6, n. August 2015, p. 21641, 2016.

ODA, Y.; HAYASHI, F.; OKADA, M. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in patients with intellectual disabilities. **BMC Oral Health**, p. 1–5, 2015.

PAPAIIOANNOU, W. *et al.* A comparison of a new alcohol-free 0.2% chlorhexidine oral rinse to an established 0.2% chlorhexidine rinse with alcohol for the control of dental plaque accumulation. **International Journal of Dental Hygiene**, n. 2, p. 1–5, 2015.

PATEL, R. V.; THAKER, V. T.; PATEL, V. K. Antimicrobial activity of ginger and honey on isolates of extracted carious teeth during orthodontic treatment. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. S58–S61, 2011.

PITHON, M. M. *et al.* Avaliação in vitro da citotoxicidade de enxaguatórios bucais Listerine. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 11, n. 4, p. 83–88, 2011.

PRASAD, K. A. R. V. *et al.* Anti-Plaque Efficacy of Herbal and 0.2% Chlorhexidine Gluconate Mouthwash : A Comparative Study. **Journal of International Oral Health**, v. 7, n. April, p. 98–102, 2015.

RANI, A.; CHOPRA, A. Isolation and Identification of Root Canal Bacteria From Symptomatic Nonvital Teeth With Periapical Pathosis. **Endodontology**, v. 18, p. 12–17, 2006.

REIDY, J.; MCHUGH, E.; STASSEN, L. F. A. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. **The Surgeon**, v. 9, n. 5, p. 278–283, 2011.

REISS, R. *et al.* An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. ***Environmental toxicology and chemistry / SETAC***, v. 21, n. 11, p. 2483–2492, 2002.

SANTOS, A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. ***Journal of clinical periodontology***, v. 30, n. Suppl 5, p. 13–16, 2003.

SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. ***Journal of Endodontics***, v. 32, n. 2, p. 104–109, 2006.

SILVA, I. A. A. DA *et al.* Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. ***Food Chemistry***, v. 141, n. 4, p. 3252–3258, 2013.

SOUZA, E. A. DE *et al.* Acta Scientiarum Influence of seasonality and production method on the antibacterial activity of propolis. ***Acta Scientiarum. Animal Sciences***, v. 36, n. 1, p. 49–53, 2014.

TENNERT, C. *et al.* Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. ***BMC Oral Health***, v. 14, p. 1–8, 2014.

WANG, L.; ASIMAKOPOULOS, A. G.; KANNAN, K. Accumulation of 19 environmental phenolic and xenobiotic heterocyclic aromatic compounds in human adipose tissue. ***Environment International***, v. 78, p. 45–50, 2015.

WANG, L.-S. *et al.* Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. ***Environmental toxicology***, v. 24, n. 3, p. 296–303, 2009.

WANG, Q.-Q. *et al.* Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. ***International Journal of Oral Science***, v. 4, n. 1, p. 19–23, 2012.

WATANABE, E. *et al.* Antiseptic mouthwashes: In vitro antibacterial activity. ***Acta Odontológica Latinoamericana***, v. 28, p. 180–184, 2015.

ZAINOL, M.; MOHD YUSOFF, K.; MOHD YUSOF, M. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, n. 1, p. 129, 2013.

ZAMORA-PEREZ, A. L. *et al.* Increased number of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells from people exposed to alcohol-containing mouthwash. *Drug and chemical toxicology*, v. 36, n. 2, p. 255–60, 2013.

ZHANG, C.; DU, J.; PENG, Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 8, p. 1–7, 2015.

Anexo A

Normas da Revista American Journal of Dentistry

Information for Authors

The **AMERICAN JOURNAL OF DENTISTRY** is published six times a year in February, April, June, August, October and December by *Mosher & Linder, Inc.*

The **AJD** invites submission of research manuscripts and reviews related to the clinical practice of dentistry. Manuscripts are considered for publication with the understanding that they have not been published elsewhere in any form or any language, are submitted solely to the **AJD**, and if accepted for publication in the **AJD**, they will not be published elsewhere in the same form or in any other language, without the consent of the Editor. Manuscripts are reviewed by at least two referees.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the Editor, Managing Editor, Editorial Board members or publisher of the **AMERICAN JOURNAL OF DENTISTRY**.

All correspondence from the Editorial Office will be made with the designated Corresponding Author unless otherwise specified in a letter by the authors.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS. Papers should be written in proper American English, double spaced, with liberal margins, and **only submitted by E-mail to the Editor**, with the text and tables in Microsoft Word files and illustrations in JPEG image format.

Papers reporting results of original research should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements (if any), and References.

CLINICAL RESEARCH PAPERS. Need to follow the CONSORT Statement (Needleman I, *et al. Am J Dent* 2008;21: 7-12).

DISCLOSURE STATEMENT. The *American Journal of Dentistry* is instituting a policy to disclose conflicts of interest, as well as sponsorship of studies published in the Journal. Please provide information regarding any conflict of interest relationships of all authors, or state that each author has no conflict.

Examples of common financial relationships include: employment, consultancies, stock ownership, honoraria, and paid expert testimony. You can read more about other potential conflict of interests and the general policy at: <http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/supplements.html> and <http://www.icmje.org/#conflicts>

COPYRIGHT RELEASE. The following statement, signed by all authors, should accompany all manuscripts: "*All manuscript's copyright ownership is transferred from the author(s) of the article (title of article), to the American Journal of Dentistry in the event the work is published. The manuscript has not been published in any form or any language and is only submitted to the American Journal of Dentistry*".

TITLE PAGE should include the title of the manuscript, all authors' full names and degrees, affiliations to institution or private practice, designation and address of corresponding author, telephone and fax numbers and e-mail address.

Disclosure statement

ABSTRACT PAGE should follow the title page and only contain: the title of the manuscript, the abstract and the clinical significance sections. On the abstract page, the name(s) of the author(s) should not appear. The abstract should have the following sections: Purpose, Methods, and Results.

CLINICAL SIGNIFICANCE. As a separate sentence after the abstract, a short statement should highlight the clinical significance of the manuscript.

REFERENCES. All references and only those cited in the text should appear in the list of references. They should be numbered consecutively as they appear in the text of the paper. Reference formatting programs should not be used.

When a paper cited has three or more authors, it should appear in the text thus: Gwinnett *et al.*¹ In the Reference section, article references must include the names and initials of all the authors, the full title of the paper, the abbreviated title of the journal, year of publication, the volume number, and first and last page numbers, *e.g.*:

Journals:

1. Thornton JB, Retief DH, Bradley EA. Marginal leakage of two glass ionomer cements: Ketac-Fil and Ketac-Silver. *Am J Dent* 1988; 1: 35-38.

Abstracts:

2. Alpeggiani M, Gagliani M, Re D. Operator influence using adhesive systems: One bottle vs. multi bottles. *J Dent Res* 1998;77: 942 (Abstr 2487).

Online abstracts:

3. Bayne SC, Wilder Jr AD, Perdigão J, Heymann HO, Swift EJ. 4-year wear and clinical performance of packable posterior composite. *J Dent Res* 2003;86 (Sp Is A): (Abstr 0036).

Papers in the course of publication should only be entered in the references if they have been accepted for publication by a journal and then given in the standard manner in the text and in the list of references with the journal title, accompanied by "In press," *e.g.*:

3. Crim GA, Abbott LJ. Effect of curing time on marginal sealing by four dentin bonding agents. *Am J Dent*, In press.

Book and monograph references should include author, title, city, publisher, year of publication, and page numbers, *e.g.*:

4. Malone WFP, Koth DL. *Tylman's theory and practice of fixed prosthodontics*. St. Louis: Ishiyaku Euro-America, 1989; 110-123.

5. Ripa LW, Finn SB. The care of injuries to the anterior teeth of children. In: Finn SB. *Clinical pedodontics*. 4th ed, Philadelphia: WB Saunders, 1973; 125.

Personal communications should only appear in parentheses in the text and not in the list of references.

ILLUSTRATIONS. Illustrations should be numbered, provided with suitable legends, and kept to the minimum essential for proper presentation of the results. Color illustrations will be published at the authors' expense. Contact the Managing Editor at (954) 888-9101 or amjdent@amjdent.com.

Legends are required for all illustrations and should be typed as a group on a separate page. For photomicrographs, legends must specify original magnification and stain (if used).

TABLES should be logically organized and should supplement the information provided in the text. Each table should be typed on a separate page with the number, title and footnotes. Tables should be kept to the minimum essential for proper presentation of the results.

Permissions from author and publisher must be obtained for the direct use of previously published material including text, photographs, drawings, etc. The original permission should be then included with the manuscript.

REPRINTS. For reprints contact the Business Office at (954) 888-9101 or amjdent@amjdent.com.

ADDRESS. All manuscripts should be sent to the Editor by e-mail only to: godoy@amjdent.com

6/09