

WASHINGTON HENRIQUE THEMOTEO DA SILVA

**EFEITO DE DOIS TIPOS DIFERENTES DE
PRÓPOLIS BRASILEIRA SOBRE BACTÉRIAS E
CÉLULAS PULPARES HUMANAS**

*Effect of two different types of brazilian propolis on bacteria and
human pulp cells*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do Título de Mestre em Odontologia
na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia

2023

WASHINGTON HENRIQUE THEMOTEO DA SILVA

**EFEITO DE DOIS TIPOS DIFERENTES DE PRÓPOLIS BRASILEIRA SOBRE
BACTÉRIAS E CÉLULAS PULPARES HUMANAS**

*Effect of two different types of brazilian propolis on bacteria and human pulp
cells*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do Título de Mestre em Odontologia
na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Turrioni Hidalgo

Coorientador: Carlos Henrique Gomes Martins

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Turrioni Hidalgo

Prof^a. Dr^a. Priscilla Barbosa Ferreira Soares

Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling Costa

Prof^a. Dr^a. Camilla Christian Gomes Moura

Prof. Dr. Marco Aurelio Benini Paschoal

UBERLÂNDIA

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
 Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.ppgoufu.com - copod@umarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, nº 418, PPGODONTO				
Data:	Sete de julho de dois mil e vinte e três	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:40
Matrícula do Discente:	12122ODO030				
Nome do Discente:	Washington Henrique Themoteo da Silva				
Título do Trabalho:	Efeito de dois tipos diferentes de própolis brasileira sobre bactérias e células pulpares humanas				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Processo de Reparo				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Processo de Reparo				

Reuniu-se em Web Conferência pela plataforma Zoom, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, assim composta: Professores Doutores: Josimeri Hebling Costa (UNESP); Priscilla Barbosa Ferreira Soares (UFU); Ana Paula Turroni Hidalgo (UFU); orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Ana Paula Turroni Hidalgo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por Priscilla Barbosa Ferreira Soares, Professor(a) do Magistério Superior, em 07/07/2023, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Ana Paula Turrioni Hidalgo, Professor(a) do Magistério Superior, em 07/07/2023, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Josimeri Hebling Costa, Usuário Externo, em 07/07/2023, às 16:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 4629620 e o código CRC A9F7E078.

Ficha catalográfica

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2023	Silva, Washington Henrique Themoteo da, 1998- Efeito de dois diferentes tipos de própolis brasileiras sobre bactérias e células pulpares humanas [recurso eletrônico] / Washington Henrique Themoteo da Silva. - 2023. Orientadora: Ana Paula Turroni. Coorientador: Carlos Henrique Gomes Martins . Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Odontologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.310 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Odontologia. I. Turroni, Ana Paula, 1985- (Orient.). II. , Carlos Henrique Gomes Martins, 1968- (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Odontologia. IV. Título. CDU: 616.314
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe Elisângela. Este trabalho é a prova que todo nosso esforço e dedicação valeram a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por manter o apoio e fé nos meus sonhos desde quando decidi entrar para o curso de odontologia e agora encerrando o curso de mestrado o suporte de vocês foi fundamental. Sou extremamente grato à minha mãe Elisângela por ter sido essencial em todo meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Agradeço o privilégio de ter cinco irmãos Bruno, Hélio, Mykael, Laisa e Gyovana, que sempre foram refúgio e conforto quando precisei. Ao meu príncipe Lucas por estar ao meu lado mesmo nos dias mais difíceis. Sou grato a todos os meus parentes próximos, em especial meu primo Michel, minhas tias Mariana e Jaqueline, e minha Avó Eliana por sempre estarem dispostos a me apoiar e vibrar com cada pequena conquista.

À minha querida orientadora Ana Paula, minha “chefinha” pela honra de ter seus brilhantes ensinamentos. Admiro sua capacidade de ser multifacetada e multitarefa, sempre muita paciência e excelência me incentivando e inspirando a ser um profissional, professor, cidadão e ser humano melhor. Agradeço meu co-orientador Carlos por ter sido extremamente necessário.

Serei eternamente grato a “Fernandona” que foi minha dupla nessa jornada, todos tiveram papel fundamental, entretanto, o seu com certeza foi indispensável. Agradeço também ao Caio, Gabriela, Bruna, Nilson, Camila e Valéria pela ajuda em algum momento do desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, bem como o Programa de pós-graduação e a Faculdade de Odontologia por todas oportunidades nos últimos 8 anos. Sou grato aos laboratórios CPBIO, ICBIM, PPIPA e LAMEV pela disponibilização de equipamentos e materiais necessários.

À CAPES pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Obrigado aos meus amigos e todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte desse percurso, cada um de vocês foi essencial para a realização dessa obra. A gratidão que sinto me acompanhará por toda a vida.

EPÍGRAFE

“I'll never be the same. This is a state of grace.”

(State of grace - Taylor Swift)

SUMÁRIO

Resumo	1
Palavras-chave.....	2
Abstract	3
1. Introdução e referencial teórico	4
2. Capítulo 1	7
Title page.....	8
Abstract.....	12
Introduction	14
Methods and materials.....	15
Results	21
Discussion.....	29
Conclusion	33
References.....	33
3. Referências	39
Anexo I	42

RESUMO

As própolis brasileiras tem ganhado notoriedade em virtude de seus benefícios e efeitos farmacológicos. Paralelamente, a adoção de técnicas endodônticas conservadoras como as terapias pulpares vitais tem sido priorizada na odontologia minimamente invasiva. Neste cenário, o presente estudo avaliou o impacto da aplicação direta dos extratos hidroalcoólicos das própolis verde e marrom brasileiras, PVB e PMB respectivamente, sobre células pulpares humanas e sobre patógenos endodônticos. Ambas as própolis, tem apresentado resultados positivos em outras linhagens celulares, porém pouco avaliadas sobre tecido pulpar. Após 24h do plantio celular as células foram submetidas à aplicação direta e contato por 24h dos materiais: PVB (5, 10 e 50 µg/mL), PMB (5, 10 e 50 µg/mL), DMEM (grupo controle), TNF-α 10µg/mL e DMSO 0,5%, Peróxido de Carbamida 0,018% (PC) contato por 30min. Após o período de contato foram avaliadas a viabilidade celular (MTT), a quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs, sonda DCFH-DA), óxido nítrico (ON, reagente de Griess) e morfologia celular (MEV). A mensuração do pH ocorreu antes e após 24h de contato com as células. O ensaio de migração celular (Wound healing) comparou o contato imediato e após 24h e 48h da aplicação dos materiais. Adicionalmente, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das duas própolis foram realizadas frente a um painel de nove bactérias envolvidas na infecção endodôntica primária. A análise de dados empregou os teste One e Two-Way ANOVA complementado por Tukey ($\alpha = 5\%$). A viabilidade celular e produção de ON não demonstrou diferença estatística entre os grupos PVB, PMB e DMEM ($p < 0,05$). Na produção de EROS, houve diferença entre TNF-α e os demais grupos. O grupo PC apresentou a menor média de pH inicial (7,90, DV=0,7). Sobre o efeito antibacteriano em concentrações ≤ 100 µg/mL a PMB apresentou para sete bactérias enquanto a PVB apenas para *P. micra*. Concluiu-se que as PVB e PMB apresentaram alta atividade antibacteriana, alta citocompatibilidade, ausência produção de estresse oxidativo e a PVB apresentou maior estimulação na migração celular em células da polpa

dentária humana.

Palavras-chave: Própolis; Polpa Dentária; atividade bactericida.

ABSTRACT

Brazilian propolis has gained notoriety due to its benefits and pharmacological effects. At the same time, the adoption of conservative endodontic techniques such as pulp therapy has been prioritized in minimally invasive dentistry. In this scenario, the present study evaluated the impact of direct application of hydroalcoholic extracts of Brazilian green and brown propolis, BGP and BBP respectively, on human pulp cells and endodontic pathogens. Both propolis, have shown positive results in other cell lines, but little evaluated on pulp tissue. After 24h of cell planting, the cells were kept in direct application and contact for 24h of the materials: BGP (5, 10 and 50 µg/mL), BBP (5, 10 and 50 µg/mL), DMEM (control group), TNF-α 10µg/mL and DMSO 0.5%, Carbamide Peroxide 0.018% (CP) contact for 30min. After period of contact, cell viability (MTT), quantification of reactive oxygen species (ROS, DCFH-DA probe), nitric oxide (NO, Griess reagent) and cell morphology (SEM) were evaluated. The pH measurement occurred before and after 24 hours of contact with the cells. The cell migration test (Wound heal) compared the immediate contact and after 24h and 48h of the application of the materials. In addition, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the two propolis were performed against a panel of new bacteria involved in primary endodontic infection. Data analysis used in the One and Two-Way ANOVA complemented by Tukey ($\alpha=5\%$). Cell viability and NO production showed no statistical difference between BGP, BBP and DMEM groups ($p<0.05$). In the production of ROS, there was difference between TNF-α and the other groups. The CP group had a lower mean initial pH (7.90, DV=0.7). Regarding the antibacterial effect at concentrations ≤ 100 µg/mL, BBP showed for seven bacteria while BGP only for *P. micra*. It was concluded that BGP and BBP showed high antibacterial activity, high cytocompatibility, absence of oxidative stress production and BGP showed greater stimulation of cell migration in human dental pulp cells.

Keywords: Propolis; Dental pulp; Anti-Bacterial Agents

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

O Brasil é um país com ampla biodiversidade de recursos naturais, que tem ganhado notoriedade na produção de conhecimento científico envolvendo suas aplicações em tratamentos medicinais¹. A medicina natural tem recebido elevada aceitação populacional tendo em vista que o uso de fitoterápicos demonstra citocompatibilidade, excelente atividade terapêutica e custos mais acessíveis¹. Diante disso, as própolis brasileiras têm se destacado nesse segmento de acordo com atividades farmacológicas características desses compostos mundialmente reconhecidas como ação antibacteriana² e antifúngica³, atividade antiviral⁴, antiinflamatória⁵, antitumoral⁶, antioxidante⁷ e inclusive anticâncer⁸.

As própolis são compostos resinosos que possuem em sua composição uma fonte primária de origem vegetal, podendo ser exsudatos de cascas de árvores, folhas, botões florais, balsâmos, óleos essenciais, pólen e minerais que são coletadas por abelhas e a partir da adição de cera e saliva sofrem uma biotransformação através da ação da enzima 13-glicosidase presente na saliva desses insetos garantindo a esse material uma composição química extremamente complexa⁹. Na colmeia as própolis de maneira geral possuem função de vedação e proteção da colônia contra invasores e microorganismos oportunistas, essa propriedade antimicrobiana é atribuída à presença de princípios ativos como flavonoides e ácidos fenólicos presentes nesses compostos¹⁰.

Foram categorizados pelo menos 14 tipos de própolis brasileiras de acordo com suas características físico-químicas e propriedades biológicas variando da coloração amarela, castanho, verde, marrom a avermelhada e suas variações que dependem da origem botânica utilizada por abelhas no momento de sua produção^{11,12}. Sofrendo também, influência de fatores como a localização geográfica da colmeia e vegetação circundante, estação do ano em que são coletados seus constituintes, pois os níveis pluviométricos impactam na sua disponibilidade botânica, além dos fenótipos individuais das abelhas produtoras¹³.

A própolis verde brasileira (PVB) possui como sua principal fonte vegetal a *Baccharis dracunculifolia* ou popularmente conhecida como vassourinha ou alecrim do campo, e sua principal espécie produtora é a espécie *Apis melífera*, que também é a principal abelha produtora da própolis marrom brasileira (PMB)^{14,15}. A PMB pode ser encontrada em diferentes regiões brasileiras e de acordo com seu posicionamento geográfico a sua fonte botânica primária irá ser alterada, no estado do Paraná é a *Araucária sp*, árvore típica do sul do país¹⁵.

Paralelamente, as infecções endodônticas continuam sendo um problema de saúde pública, com o aprimoramento da odontologia procedimentos preventivos e técnicas minimamente invasivas se fazem necessários, pois preservam ao máximo as estruturas dentais sadias sendo efetivas nos tratamentos odontológicos prevenindo essas infecções¹⁶. Nesse cenário as terapias pulpares vitais tem se destacado, em razão da sua ampla indicação em dentes vitais submetidos a injúrias no complexo dentino-pulpar, seja por cáries profundas, traumas dentários ou até mesmo exposição pulpar acidental no manejo clínico odontológico¹⁷.

As TPVs podem ser classificadas como capeamento pulpar indireto, quando não há exposição do tecido pulpar e o medicamento de escolha é posicionado sobre a superfície de dentina remanescente exposta mais próxima do teto da câmara pulpar¹⁷. Capeamento pulpar direto, quando há a exposição do conteúdo pulpar sem necessidade de remoção do mesmo^{17,18}. E pulpotomia, quando há a exposição da polpa dentária com necessidade de remoção da porção coronária sendo mantida a ausência de infecção bacteriana na polpa radicular garantindo assim a manutenção da sua vitalidade¹⁸.

Além disso, as TPVs quando bem executadas com indicação precisa, técnica adequada e com materiais eficientes geram excelente prognóstico e previsibilidade no tratamento de dentes permanentes jovens e decíduos, favorecendo na manutenção da vitalidade da polpa dentária e proporcionando o reparo tecidual^{18,19}. O sucesso das TPVs está atrelado aos materiais odontológicos empregados, que devem apresentar além da biocompatibilidade e manutenção da fisiologia pulpar, uma boa vedação coronal¹⁹. Assegurando

assim, a preservação da vitalidade, promoção e reparo tecidual, assim como prevenção de infecção da polpa dentária ¹⁹.

Nesse cenário, os diversos benefícios e propriedades farmacológicas das própolis sobre outras linhagens celulares já estão constatados na literatura, inclusive os efeitos positivos da própolis vermelha brasileira sobre células pulpares humanas ²⁰. No entanto, há uma lacuna na literatura ao que tange o impacto da PVB e PMB sobre células pulpares de dentes humanos. Este é um estudo preliminar que pode oferecer dados importantes para a condução de novos estudos em animais e clínicos visando o desenvolvimento de um novo material para o reparo pulpar, mais acessível à população e com mecanismo de ação citocompatível ao tecido pulpar superficial.

2. Capítulo 1

Effect of two different types of brazilian propolis on bacteria and human pulp cells

*Silva WHT, Guedes, Lins-Candeiro CL, Neto NFO, Ambrósio SR,
Veneziani RCS, Bastos JK, Martins CHG, Turrioni AP*

Type of article: Original

Title of the article: EFFECT OF BRAZILIAN GREEN AND BROWN PROPOLIS ON HUMAN PULP CELLS AND BACTERIA INVOLVED IN PRIMARY ENDODONTIC INFECTION

Running title: Cellular and bacterial response of Brazilian propolis

Keywords: Propolis; Dental pulp; Anti-Bacterial Agents, Oxidative Stresses, Cytotoxicity Tests

Author information:

1. Washington Henrique Themoteo da Silva - MS Student
2. Fernanda Rodrigues Guedes - PhD Student
3. Caio Luiz Lins-Candeiro - PhD Student
4. Nilson Ferreira de Oliveira Neto - PhD Student
5. Sergio Ricardo Ambrósio - Professor, PhD
6. Rodrigo Cassio Sola Veneziani - Professor, PhD
7. Jairo Kenupp Bastos - Professor, PhD
8. Mariana Brentini Santiago – PhD Student
9. Carlos Henrique Gomes Martins - Professor, PhD
10. Ana Paula Turrioni - Professor, PhD

Department(s), institution(s), and email address

1. Post-graduation Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. wash.odonto@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4684-309X>
2. Post-graduation Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. fernandaguedes@outlook.com

<https://orcid.org/0000-0001-7059-8499>

3. Post-graduation Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. caiocandeiro@yahoo.com.br
<https://orcid.org/0000-0001-5969-7170>

4. Post-graduation Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. nilsonetoufu@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8788-4141>

5. Nucleus of Research in Technological and Exact Sciences, University of Franca, Franca, São Paulo, Brazil. sergio.ambrosio@unifran.edu.br
<https://orcid.org/0000-0001-5032-3930>

6. Nucleus of Research in Technological and Exact Sciences, University of Franca, Franca, São Paulo, Brazil. rodrigo.veneziani@unifran.edu.br
<https://orcid.org/0000-0001-7057-9706>

7. School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. jkbastos@fcfrp.usp.br
<https://orcid.org/0000-0001-8641-9686>

8. Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. mari.brentini@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6060-379X>

9. Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. carlos.martins2@ufu.br
<https://orcid.org/0000-0001-8634-6878>

10. Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. apturrioni@gmail.com <https://orcid.org/0000-0002-6387-7411>

Institution to which the work should be attributed

Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, Av. Pará, 1720, Bloco 2G

Corresponding author

Prof. Dr. Ana Paula Turrioni

Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, Av. Pará, 1720, Bloco 2G ZIP code: 38405-320, Uberlândia, MG, Brazil. apturrioni@ufu.br

Sources of support

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001. We are also thankful for the support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Brazil (FAPEMIG) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Disclosure statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Patient consent statement

An Informed Consent Form (ICF) was obtained and signed by each donor.

Ethics approval statement and document

All the ethical precepts related to research involving human beings were respected (CAAE: 47122321.3.0000.5152).

Clinical relevance statement

Dental materials used in vital pulpal therapies must not only be biocompatible with pulpal and adjacent tissues but also capable of preventing bacterial contamination in the tissues. The pharmacological effects of Brazilian propolis have been already established in the literature and the acceptance of natural products by the population has grown. This study investigated if Brazilian green and brown propolis maintain their positive pharmacological effects when in

direct contact with human pulp cells. The study facilitates further studies on the potential of the above substances to serve as promising components for the development of an cytocompatible, antibacterial and low cost dental material.

ABSTRACT

The preservation of pulp tissue viable conservative endodontic procedures has gained widespread attention. Meanwhile, several studies have been conducted on finding natural products that are less cytotoxic, more affordable, and offer better therapeutic activity than the current products. Hence, this study evaluated the antibacterial effect and direct impact of Brazilian green propolis (BGP) and Brazilian brown propolis (BBP) on human pulp cells. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the two substances were evaluated against a panel of nine bacteria involved in primary endodontic infections. In addition, pulp cells were seeded in 96-well plates (10,000/well). After 24 h, the cells were exposed to the following substances: BGP (5, 10, and 50 $\mu\text{g/mL}$), BBP (5, 10, and 50 $\mu\text{g/mL}$), 0.5% DMSO, 0.018% carbamide peroxide (CP), 10 $\mu\text{g/mL}$ TNF- α , and DMEM (control group). The cell viability was evaluated via the MTT assay 24 h after the application of the substances. The pH of the samples was measured before and after 24 h of contact with the cells. Moreover, the production of reactive oxygen species (ROS, DCFH-DA probe) and nitric oxide (NO, Griess reagent) was quantified and cellular morphology was analyzed (scanning electron microscopy) 24 h after application of the substances. In the cell migration test (wound healing), we compared wound areas at 24 h, 48 h, and immediately after the application of the substances. For data analysis, we used the one-way ANOVA test complemented by the Tukey test ($\alpha = 5\%$). No statistical differences in cell viability and NO production were observed between the BGP, BBP, and DMEM groups ($p < 0.05$). ROS production in the TNF- α group was considerably different from that in the other groups. The CP group exhibited a lower average initial pH (7.90; detection value (DV) = 0.7), whereas the BBP group exhibited a lower average final pH (8.41; DV = 0.02), than other groups. The MIC values of the both propolis were in the range 1.56–400 $\mu\text{g/mL}$. Regarding the antibacterial effect at concentrations ≤ 100 $\mu\text{g/mL}$, BGP showed only for *P. micra* and BBP showed for seven bacteria while. The results revealed that BGP and BBP

showed high cytocompatibility, absence of ROS and NO production, BGP showed greater stimulation of cell in human dental pulp cells and BBP greater antibacterial activity.

INTRODUCTION

Dentistry is constantly improving, and the adoption of minimally invasive strategies is necessary to preserve a healthy tooth structure¹. Vital pulp therapy (VPT) is known to preserve the vitality of the remaining pulp tissue in deciduous or young permanent teeth². VPT has several indications, as it is suitable for teeth that have suffered injuries to the dentin-pulp complex, which may be caused by deep caries activity, dental trauma, or even iatrogenic events during clinical dental care³.

In dentistry, several studies have been conducted on finding natural products that are less cytotoxic, potentially more affordable, and offer better therapeutic activity than the current products, mainly owing to the increasingly wide acceptance of natural medicine⁴. Brazilian propolis has attracted the attention of researchers because of its currently recognized pharmacological properties of clinical interest, namely anti-caries effect⁵, antiviral⁶, antifungal⁷, antioxidant⁸, and anti-inflammatory⁹ activities, cytotoxicity against tumor cell lines¹⁰, and satisfactory antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*¹¹.

It is worth noting that propolis, in general, are resinous compounds produced by bees to establish a chemical-mechanical barrier for the sealing and protection of beehives from predators and external invading pathogens¹². These resinous compounds are derived from a wide variety of constituents, such as plant resins from barks, flower buds, balsams, essential oils, pollen, and minerals, which undergo biotransformation through the addition of wax and bee salivary enzymes¹².

Despite the beneficial effects of propolis on different cell lines, such as the positive effects of Brazilian red propolis on the viability and low free radical production of dental pulp cells¹³, the effect of this compound (especially BGP and BBP types) on pulp tissue is sparsely documented¹³. Therefore, this study evaluated the antibacterial effect and direct impact of BGP and BBP on human pulp cells. This is a preliminary study that may provide important data for

conducting new animal and clinical studies aimed at developing novel, accessible, and biocompatible materials for pulp repair.

METHODS AND MATERIALS

Propolis hydroalcoholic extract

BGP samples were provided by Apis Flora Industrial and Comercial Ltda (Ribeirão Preto/SP/Brazil) in May 2018 (lot number 65400918)¹⁴. Samples of BBP from *Apis mellifera* and *Araucaria* resin were collected in União da Vitória (State of Paraná, Brazil; 26°13'48"S, 51°5'9"W)¹⁵; after removing impurities, these resinous products were stored in an amber bottle at -20°C in a freezer. To prepare the propolis extracts, BGP (350.0 g) was macerated for 24 h with a mixture (4 L) of ethanol and water (7:3, v/v) at room temperature. The extract obtained was filtered, vacuum-concentrated, and lyophilized to obtain a crude hydroalcoholic extract¹⁶. BBP (50 g) was extracted via maceration for 24 h using a solution of ethanol and water (6 L; 7:3 (v/v)) to yield a crude hydroalcoholic extract of BBP (20.0 g) after removal of the solvent under vacuum¹⁷.

Dental pulp cell evaluation

Obtaining pulp cells from permanent teeth

The pulp tissue was obtained from a healthy third molar via the tissue explant technique, by which the pulp tissue was isolated after mechanically removing it from the molar using curettes and endodontic files¹⁸. Cells were expanded in a culture medium (Dulbecco's Modified eagle Medium (DMEM), LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (10000 U/mL, LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil). They were used between the sixth and ninth passages to preserve the phenotypic characteristics of the dental pulp cells¹⁹.

Half Maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀)

To determine IC₅₀, the pulp cells were seeded in 96-well plates (10,000 cells/well) after sowing the cells for 24 h. BGP and BBP samples of six different concentrations were applied (100, 200, 400, 600, 800, and 1000 µg/mL) and the contact was maintained for 24 h. Subsequently, each well of the plate received 90 µL of serum-free DMEM and 10 µL of methyl tetrazolium (MTT) (tetrazoline 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl bromide)¹³ solution (5 mg/mL in PBS-Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA). After incubating the plates for 4 h with 5% CO₂ and at 37°C, the supernatant was removed and 100 µL of DMSO (LGC Biotechnologia, Cotia, São Paulo, Brazil) was added to each compartment to dissolve the formazan crystals produced. Next, the optical density of the resulting solution was measured using a spectrophotometer and a GLOMAX® multimodal microplate reader (Promega Corporation, São Paulo, Brazil) using a 560-nm filter. The selectivity index (SI) was evaluated to determine whether BBP and BGP exhibited higher affinity for bacteria or pulp cells. IC₅₀, which is the concentration of the sample corresponding to a 50% reduction in cell viability, and MIC of the sample against the pathogens were used to calculate the SI, using the formula $SI = IC_{50}/MIC$ ¹³.

Preparation of material

Three concentrations (5, 10, 50 µg/mL) of BBP and BGP were selected because they were considered safe for application in pulp cells after conducting a pilot study. Thus, these solutions composed the experimental groups, along with the 0.5% DMSO (vehicle control), 0.018% carbamide peroxide (CP - negative control for cell viability), 10 µg/mL TNF-α (positive control for ROS production), and DMEM (positive control for cell viability) groups. To obtain samples of the aforementioned concentrations, 5.8 mg/mL BBP and 14 mg/mL BGP solubilized in 1 mL DMSO were diluted in a culture medium containing 1% antibiotic (penicillin/streptomycin 10,000 U/mL, LGC Biotechnologia, Cotia, São Paulo, Brazil)¹³. The DMSO, TNF-α and CP materials were also diluted in

DMEM culture medium containing 1% antibiotic until reaching the desired concentration. The 0.018% CP solution was also obtained from serial dilutions of the 22% carbamide peroxide whitening gel (Whitenees Perfect – FGM, lot: 100820, Whitess do Brasil Industria Ltda. Joiville, Santa Catarina, Brazil.)²⁰. All application solutions were prepared on the day of application and previously filtered using a sterile syringe filter with a diameter of 25 mm and a polyethersulfone membrane with a pore size of 0.22 µm.

Cell viability

The pulp cells were seeded in a 96-well plate (10000 cells/well). After 24 h, the substances were applied and the contact with the cells was maintained for 24 h, except for the 0.018% CP group with which the contact was maintained for only 30 m²⁰. Subsequently, the medium was aspirated and replaced by DMEM containing 1% antibiotic (penicillin/streptomycin 10000 U/mL, LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil). The protocols for the MTT test and spectrophotometer evaluation followed the patterns already mentioned.

The supernatant was aspirated and reserved in a 24-well plate for pH measurement.

pH measurement

To measure the initial pH, 400 µL of each group untouched by the cells was added to a 24-well plate. The reserved supernatants from the MTT assay were used to evaluate the final pH. The pH meter (H/mV /ISE/temperature meter, Adwa, Szeged, Hungary) was previously calibrated using standard potassium chloride solutions. The pH was measured in triplicates. After each measurement, the pH-meter electrode was washed with distilled water, dried with sterile gauze, and then calibrated.

Quantification of free radical production

The cells were sown in 96-well plates (10000 cells/well). After 24 h, the materials were applied. After maintaining the contact for 24 h (except for the 0.018% CP group wherein the contact was maintained for 30 minutes), 100 μ L of the supernatant was reserved for evaluating nitric oxide production. Reactive oxygen species (ROS) production was evaluated after applying 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; InvitroGen, San Diego, CA, USA)²¹. Subsequently, 100 μ L of a solution containing the probe (5 μ mol/L in PBS) was added to the compartments. After 5 m of incubation, cells were washed twice with PBS and analyzed using a GLOMAX® multimodal fluorescence microplate reader (Promega Corporation, São Paulo, Brazil) at the excitation wavelength of 475 nm.

Nitric oxide (NO) production was evaluated using the cell culture supernatant. Nitrites react with the Griess reagent via a diazotization reaction. The Griess reagent was prepared by dissolving 0.1 g N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (Merck KGaA), 2.5 mL orthophosphoric acid (Mallinckrodt Chemical, St. Louis, MO, USA), and 1 g sulfanilamide (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Germany) in 100 mL of deionized water. The supernatant (50 μ L) and then the Griess reagent (50 μ L) were poured into a compartment in a 96-well plate. After 10 minutes of incubation, the absorbance of the product was measured spectrophotometrically using a GLOMAX® multimodal microplate reader (Promega Corporation, São Paulo, Brazil) at a wavelength of 560 nm²².

Morphological Analysis and Elementary Microanalysis

The cells were seeded onto glass coverslips. After 24 h, the materials were applied. After 24 h of contact, the supernatant was aspirated and the samples were fixed for 1 h in 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich). After fixation, each pit was washed out thrice with 1 mL PBS (5 min per washing). The samples were then post-fixed for 60 min in 200 μ L of 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich). For post-fixation, the samples were dehydrated using ethanol (30%, 50%, 70%, twice in 95%, and twice in 100% with 30 min per solution) and 1,1,1,3,3,3-

hexamethyldisilazane (HMDS - ACROS Organics, Rutherford, NJ, USA). The samples were then kept in a desiccator for 14 days²³. The samples were placed onto stubs and metalized with gold coating for scanning electron microscopy (SEM, Tescan, Vega 3 LMU, Oxford Instruments, Abingdon, UK) analysis²⁴.

In contrast to other experimental groups, only 50 µg/mL of BBP was used for the migration test, morphological analysis, and elemental microanalysis.

Cell migration assay

Cell migration capacity was evaluated via the wound healing assay²⁵. The cells were seeded in 48-well plates at a concentration of 30.000 cells/well. After 24 h, a linear mechanical wound was created using the tip of a 1-mL micropipette. The cells were exposed to the different experimental groups for 24 and 48 h. The cultures were maintained in an incubator at 37°C. For each sample, three photographs of the different regions of the wound were obtained using an EVOS fl inverted microscope (Advanced microscopy Group (AMG)) at 4x magnification. Cell migration was assessed by measuring the wound area using Image J software (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Four replicates were evaluated in each group, and the results were expressed in µm².

Bacterial evaluation

Determination of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of BGP and BBP were determined against a panel of nine bacteria involved in primary endodontic infections. Five strains, from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), and four clinical isolates (CIs) of anaerobic endodontic pathogens were used in the

study: *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845), *Actinomyces viscosus* (ATCC 43146), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Veillonella parvula* (ATCC 17745), *Porphyromonas gingivalis* (CI), *Prevotella intermedia* (CI), *Parvimonas micra* (CI), and *Fusobacterium nucleatum* (CI). All the strains were stored at -20°C in the Laboratory of Antimicrobial Testing (LEA) at the Federal University of Uberlândia, in Schaedler broth supplemented with 5% defibrinated horse blood and 80% glycerol solution. The CIs from endodontic diseases were selected for the study based on previous clinical trials. The MIC was determined in triplicate using 96-well plates, via the microdilution method. Twelve samples of BBP and BGP, with concentrations ranging from 400.0 to 0.195 $\mu\text{g/mL}$, were arranged from left to right in decreasing concentration order. Subsequently, we determined the lowest concentration required for inhibiting the activity of the microorganisms. We used Schaedler agar (Difco, Kansas City, MO, USA), supplemented with hemin (5 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich, San Louis, Missouri, USA), menadione (1 $\mu\text{g/mL}$), and horse blood (5%), as the culture medium for the strains, as was recommended by the Clinical and Laboratories Standards Institute²⁵. The samples were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) (1 mg/mL, LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil) and diluted in the desired broth. Were used as *Bacteroides fragilis* and *B. thetaiotaomicron* for the technique control treated with DMSO (5% (v/v)) and metronidazole (0.0115–5.9 $\mu\text{g/mL}$, Sigma) were used as the negative and positive control groups, respectively. The microplates were incubated in an anaerobic chamber (Don Whitley Scientific, Bradford, United Kingdom) for 72 h under a suitable atmosphere containing 5–10% H_2 , 10% CO_2 , and 80–85% NO_2 . An aqueous solution of 0.02% resazurin (Sigma) was added to the wells of the microplates to indicate the viability of the microorganisms. The presence and absence of bacterial activity were respectively indicated by the pink and blue colors of the resazurin solution²⁷. To determine MBC, one aliquot of inoculum (10 μL) was removed from each well. Subsequently, we added resazurin, which was seeded in an appropriate culture medium. MBC was defined as the smallest concentration of the sample at which no bacterial growth was observed²⁸.

Statistical analysis

The data obtained were tabulated in Microsoft Excel version 2019 software and subsequently analyzed using JAMOV (version 1.6.23) and SPSS (version 22.0). We conducted the Shapiro–Wilk normality test and parametric analysis using one-way ANOVA and complemented the test with the Tukey test at a significance level of 5%.

RESULTS

Cell viability

As can be observed from the results of MTT formazan cell viability assay (Figure 1), the absorbance values observed for BBP and BGP at all concentrations (5, 10, and 50 $\mu\text{g/mL}$) are not significantly different from that observed for the DMEM group (positive control). However, the values show a considerable statistical difference with respect to that observed for the CP group (negative control).

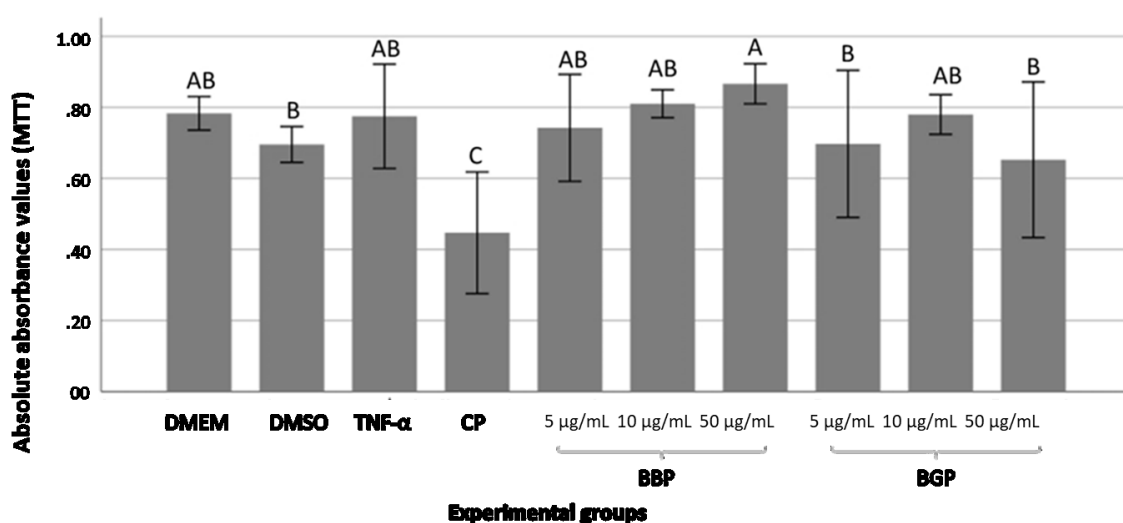


Figure 1: Mean absolute absorbance values obtained using a spectrophotometer at a wavelength of 570 nm during the MTT test for each group (N= 40 and n= 4). Different letters show statistically significant difference ($p < 0.01$), obtained using one-way ANOVA supplemented by the Tukey test.

pH measurement

The mean initial and final pH values (considering all evaluation times and all materials used in this study) are 7.90 and 8.86, respectively (Figure 2). The mean value obtained for the DMEM group ranged from 7.99 to 8.63, indicating that both BBP and BGP produce pH values within the ranges appropriate for maintaining homeostasis.

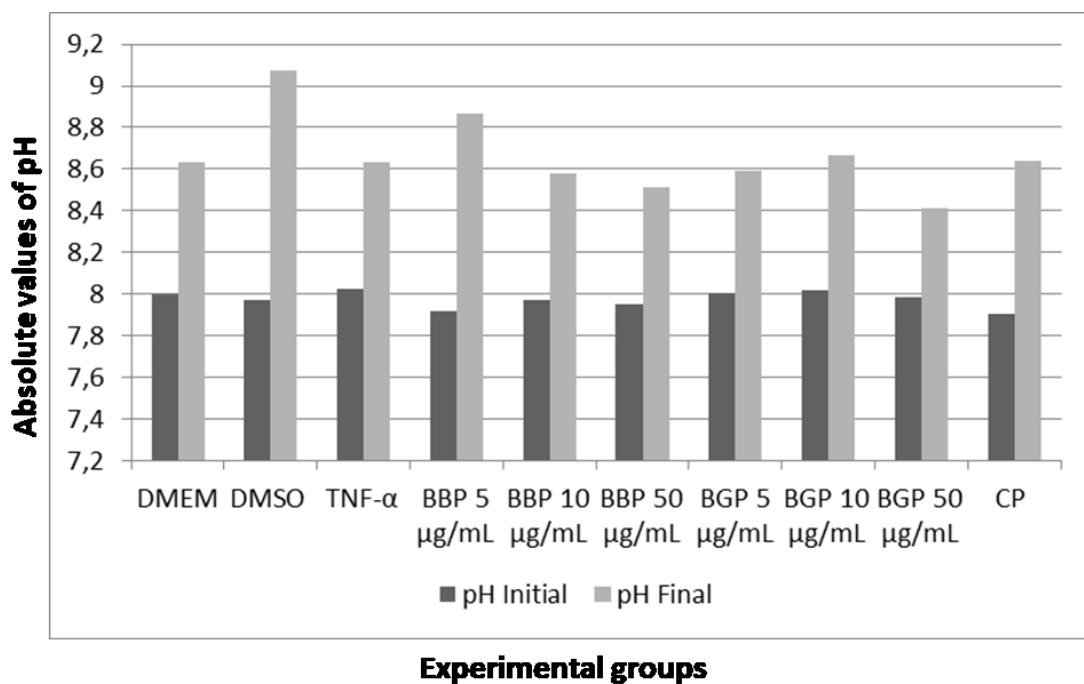


Figure 2: Mean initial and final pH of the supernatants measured using a benchtop pH meter (N=20 and n=2). Different letters show statistically significant difference ($p < 0.01$), obtained using two-way ANOVA supplemented by the Tukey test. * indicates statistically significant difference between different time.

Quantification of free radical production

As shown in Figure 3, the studied groups do not exhibit a statistically significant difference in the production of ROS. The mean absolute absorbance values exhibited by the 5 $\mu\text{g/mL}$ BBP, TNF- α , and DMEM groups are 1.49, 2.33, and 1.65, respectively. Figure 4 depicts the amount of nitric oxide produced in the groups. It shows similar results. No statistically significant difference is observed between the absorbance values exhibited by the propolis and DMEM groups. The absolute absorbance values observed for 5 $\mu\text{g/mL}$ BBP and 50 $\mu\text{g/mL}$ BBP are 0.073 and 0.085, respectively, whereas that for the DMEM group is 0.083. The difference between the absorbance values observed for TNF- α and DMEM is statistically significant ($p < 0.001$).

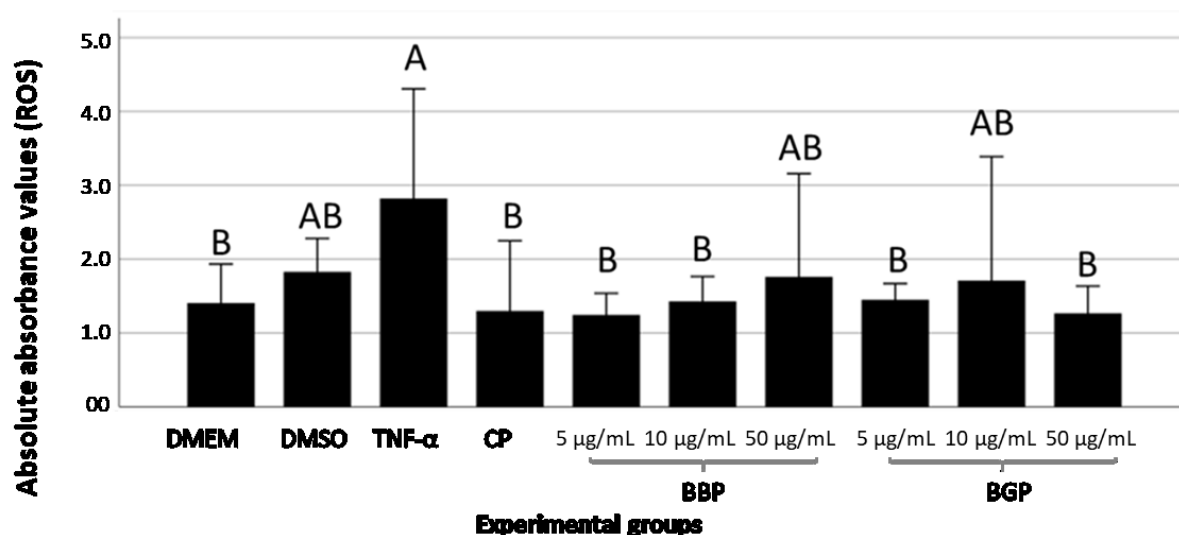


Figure 3: Mean absolute values and standard deviation of absorbance reflecting the production of reactive oxygen species in the experimental groups (N= 40 and n= 4). Different letters show statistically significant difference ($p < 0.05$), obtained using one-way ANOVA supplemented by the Tukey test.

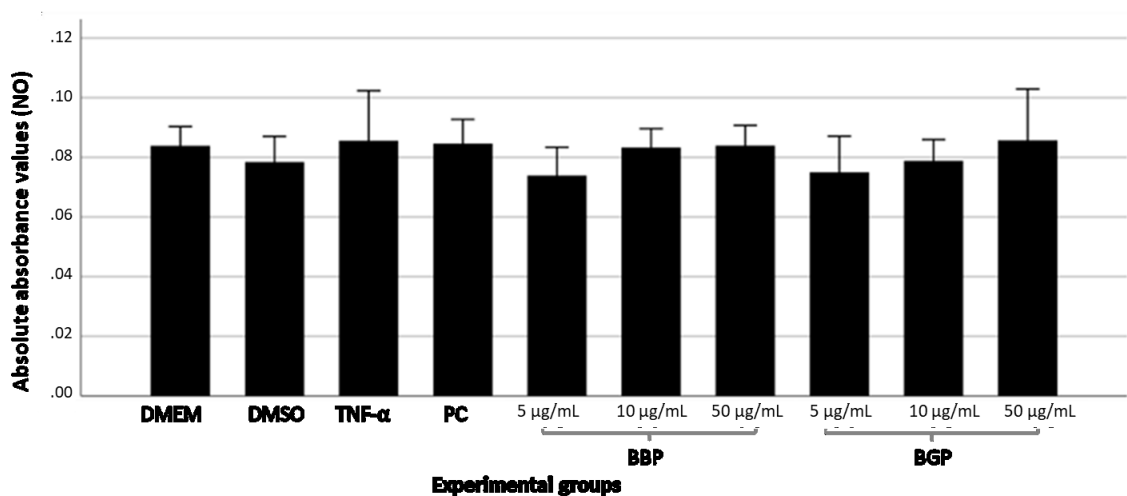


Figure 4: Mean absolute values and standard deviation of absorbance reflecting the production of reactive nitric oxide species in the experimental groups (N= 40 and n= 4).

Morphological Analysis and Elementary Microanalysis Results

The obtained SEM images are shown in Figure 5. As can be observed, both the 50 µg/mL BBP and BGP 50 µg/ml groups maintain the elongated and fusiform membrane morphology like of the fibroblasts, similarly to the DMEM group. However, the CP group shows a decrease in the number of cells in addition to morphological changes in the original membrane: the group shows an irregular morphology and increased distances between the cells.

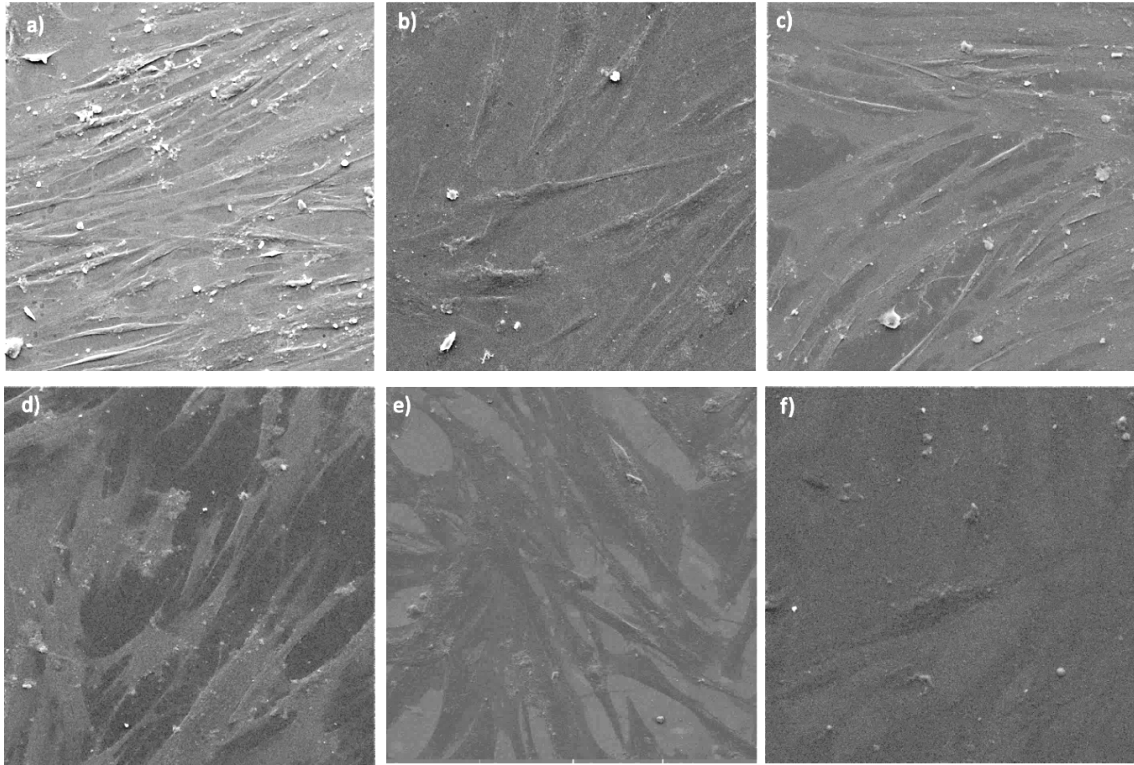


Figure 5: a) DMEM group b) 50 µg/mL BBP c) 50 µg/mL BGP d) DMSO 0.5% e) 10 µg/mL TNF-α f) 0.018% carbamide peroxide group (Scanning Electron Microscopy Images 500x).

The energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) results, shown in Figure 6, reveal that most groups exhibit a significant difference ($p < 0.5$) in the concentrations of C, Mg, and Ca ions. The element that has the highest mean concentration in the groups is C (30.87%, detection value (DV): 3.94%) and that with the lowest mean concentration is Mg (1.59%, DV: 0.14). The BBP group exhibits the highest concentration of Ca (4.11%, DV: 0.41).

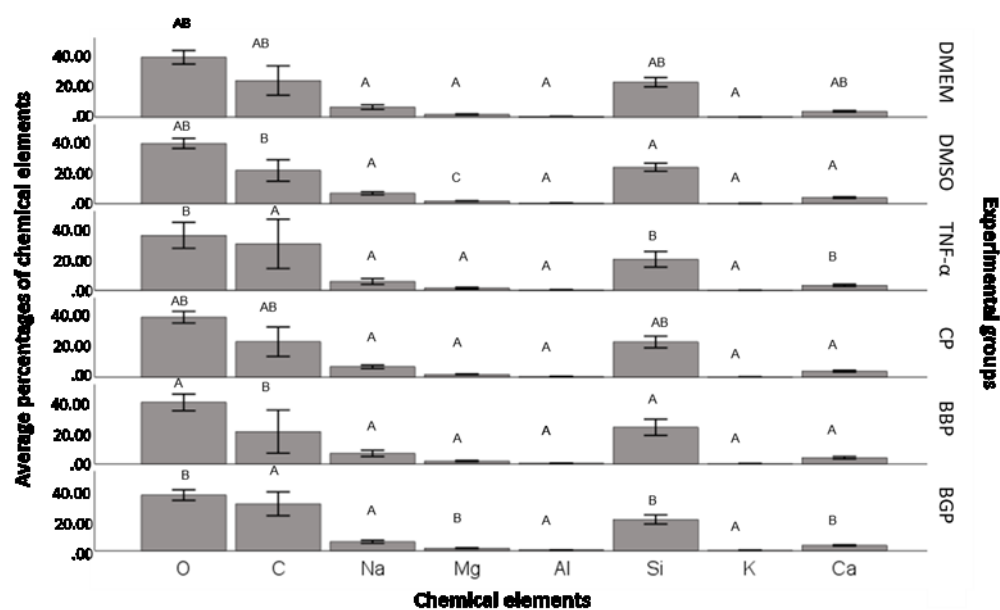


Figure 6: Percentage of chemical elements identified in the different samples, identified via energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS): oxygen (O), carbon (C), sodium (Na), magnesium (Mg), aluminum (Al), silicon (Si), potassium (K) and calcium (Ca) (N= 12 and n= 2). Different letters indicate statistically significant differences between the materials, for the same chemical element ($p < 0.05$, Tukey).

Cell migration assay

The qualitative cell migration test results (Figure 7) demonstrate progressive closure of the wound edges in most of the studied groups, as evidenced by their immediate, 24-h, and 48-h performances. The qualitative results exhibited by the groups are consistent with their respective quantitative results (Figure 8). There was a variation from 2428 μm^2 (immediate) and BGP to 1557 μm^2 (24 h) to 428 μm^2 (48 h). The wound areas observed for BBP after 24 h and 48 h were 1457 μm^2 and 592 μm^2 , respectively, whereas that observed for DMEM after 24 h and 48 h were 1278 μm^2 and 789 μm^2 , respectively. However, the CP group does not exhibit a considerable difference in the wound areas after 24 and 48 h, which are respectively 2038 μm^2 and 1461 μm^2 . This is attributed to the

significant change the group undergoes in morphology and cellular disposition, which produces largely irregular and acellularized wound regions.

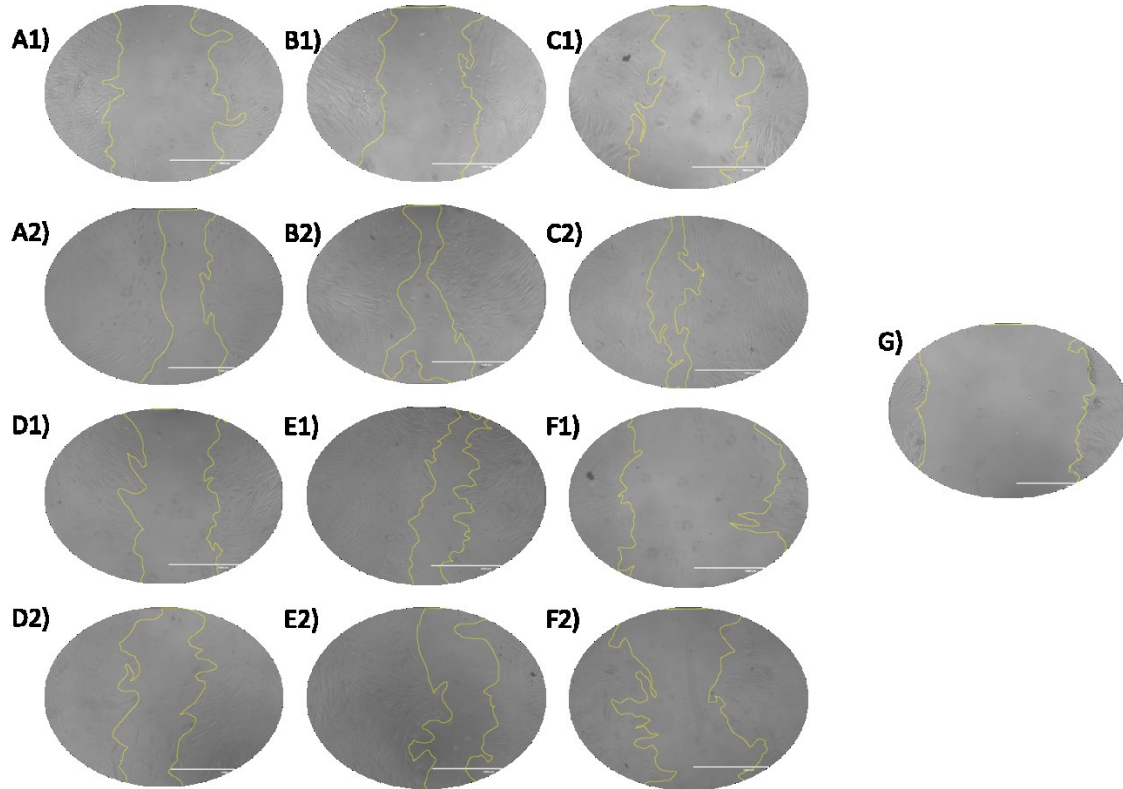


Figure 7: Wound healing assay results: immediate, 24, and 48 h (EVOS FL inverted microscopy digital images 4x). A1) DMEM 24 h, A2) DMEM 48 h, B1) BGP 24 h, B2) BGP 48 h, C1) BBP 24 h C2) BBP 48 h, D1) DMSO 24 h, D2) DMSO 48 h, E1) TNF 24 h, E2) TNF 48 h, F1) CP 24 h, F2) CP 48 h G) Immediate.

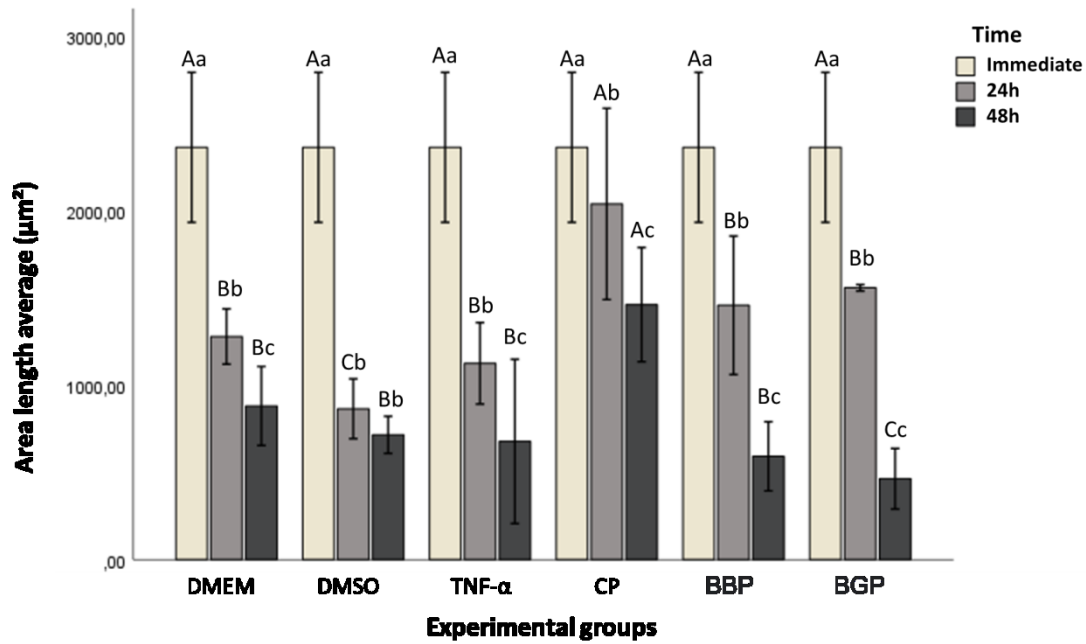


Figure 8: Mean absolute values of the wound area in μm^2 during the wound healing assay (N= 26 and n= 2). Different capital letters show statistically significant difference between different group in the same time, different lowercase letters show statistically significant difference between different time in the same group ($p < 0.05$) obtained via two-way ANOVA supplemented by the Tukey test.

Determination of MIC, MBC, and SI

Table 1 lists the MIC and MBC evaluated for BGP and BBP. BBP exhibits MIC values of less than 100 $\mu\text{g/mL}$ for *F. nucleatum* CI (22 $\mu\text{g/mL}$), *P. micra* CI (25 $\mu\text{g/mL}$), *P. intermedia* CI (1.56 $\mu\text{g/mL}$), *P. gingivalis* CI (12.5 $\mu\text{g/mL}$), *P. endodontalis* ATCC (100 $\mu\text{g/mL}$), *P. nigrescens* ATCC (25 $\mu\text{g/mL}$), and *P. melaninogenica* ATCC (3.12 $\mu\text{g/mL}$). Moreover, BBP demonstrates effective bactericidal activity, as evidenced by the MBC values against *P. micra* CI (25 $\mu\text{g/mL}$) and *F. nucleatum* CI (25 $\mu\text{g/mL}$). However, the MIC values of BBP are lower than its MBC for *P. micra* IC (25/25 $\mu\text{g/mL}$); *P. intermedia* CI (1.56/12.5 $\mu\text{g/mL}$); *P. gingivalis* CI (12.5/50 $\mu\text{g/mL}$); *P. endodontalis* ATCC (100/>400 $\mu\text{g/mL}$); *P. nigrescens* ATCC (25/50 $\mu\text{g/mL}$); and *P. melaninogenica* ATCC (3.12/6.25 $\mu\text{g/mL}$), indicating a bacteriostatic effect.

Table 1 lists the calculated SI values. They were obtained from IC50 values being 454.55 µg /ml and 646.83 µg /ml for BBP and, respectively. BGP exhibits SI values exceeding 10 for *P. micra* CI (414.6) and BBP exhibits SI values above 10 for *F. nucleatum* CI (18.1), *P. micra* CI (291.3), *P. gingivalis* CI (36.3), *P. nigrescens* ATCC (18.1), and *P. melaninogenica* ATCC (145.6).

Table 1: Pathogens involved in primary endodontic infection and the respective minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) (expressed in µg/mL), and selectivity index (SI) for Brazilian brown and green propolis

Bacteria	BGP MIC/MBC	BBP MIC/MBC	BGP SI	BBP SI
<i>Actinomyces viscosus</i> ATCC 43146	>400/>400	>400/>400	-	-
<i>Fusobacteria nucleatum</i> (CI)	400/400	25/25	1.61	18.18
<i>Parvimonas micra</i> (CI)	1.56/1.56	1.56/12.5	414.10	291.37
<i>Porphyromonas endodontalis</i> ATCC 35406	>400/>400	100/>400	-	4.54
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (CI)	200/>400	12.5/50	3.23	36.36
<i>Prevotella intermedia</i> (CI)	200/400	50/100	3.23	9.09
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	200/200	3.12/6.25	3.23	145.68
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563	200/200	25/50	3.23	18.18
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 17745	>400/>400	>400/>400	-	-
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 17745	>400/>400	>400/>400	-	-

- indicates that selectivity index (IC50/MIC) cannot be evaluated

DISCUSSION

Minimally invasive dentistry aims for the preservation of healthy teeth structures and pulp vitality. VPT has exhibited a high success rate when adequately indicated and conducted using proper techniques and safe and effective dental

tools². Concomitantly, the wide diversity of Brazilian natural resources has facilitated the study and introduction of natural medicine into the population. As mentioned earlier, Brazilian propolis offer many beneficial pharmacological effects¹⁴, which attract the attention of the scientific community.

With the aim of evaluating the cytocompatibility of both types of propolis in direct contact with human pulp cells, viability, pH, and cellular oxidative stress production (quantification of reactive oxygen and nitric oxide species) of the samples after direct contact with the dental pulp cells were estimated. It was observed that, regardless of the concentration (5, 10, or 50 µg/mL), the two types of propolis maintained cell vitality at levels similar to that observed in the DMEM control group. Contrary to the behaviors of BBP and BGP, the CP group showed a marked decrease in the number of metabolically active cells showing that carbamide peroxide at a concentration of 0.018% applied directly on pulp cells for 30 minutes was an excellent negative control agent for cell viability. There is inadequate information on the cytotoxicity of BBP against pulp cells. However, this study, which used BBP of *Araucaria origin* found in southeastern Brazil, clearly demonstrated that BBP at a concentration of 100 µg/ mL does not exhibit any cytotoxicity against normal renal cell lines even after 48 h of contact²⁹. Another study examined the effect of exposing a simultaneous culture of telomerase-immortalized gingival keratinocytes and *P. gigivalis* to 1.25-mg/mL BBP for 4 h. In contrast to the findings of this study, the above study reported a 20% reduction in viable bacteria and a 40% reduction in the vitality of the keratinocyte cells³⁰. Notably, another study, which put forward a proposal similar to that of the present study, compared the direct application of Brazilian red propolis and MTA dilutions. The above study showed that red propolis of a 10 µg/mL concentration, not only maintained but also positively stimulated 34.6% cell viability with respect to that in DMEM control group¹³. In addition, intra and extracellular pH acid–base imbalance and the chemical composition of new materials can negatively affect cell metabolism, function, proliferation, and repair³¹. Hence, the conditions followed in this study helped maintain the pH levels within the range suitable for homeostasis, without risking cell damage.

Excessive oxidative stress is detrimental to the maintenance of tissue

homeostasis. This is because high NO and ROS production can inhibit the action of the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme, which decreases the expression levels of the survivin protein and consequently induces programmed cell death (apoptosis) followed by tissue damage and destruction^{31,32}. In the present study, we observed that the production of oxidative stress was controlled and remained at levels similar to those observed in the control group for all BGP and BBP concentrations examined. This finding reinforces the result reported in a study that evaluated the positive effect of propolis, which was extracted from China, on the survival of and reduction of oxidative stress in neural cells³³. The result is also consistent with that of another study that observed a low production of free radicals in human pulp cells¹³ after direct contact with Brazilian red propolis. In the present study, the TNF- α group stood out from the other groups, demonstrating greater quantification in the production of ROS, however, cell viability and migration were not reduced. This finding can be explained because at moderate levels compatible with cellular adaptation, pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , act by maintaining a safe environment for pulp cells without inducing inflammation³⁴. Another important finding to be mentioned is the low levels of quantification of free radicals produced by the PC group, which theoretically should be a pro-inflammatory stimulator. This finding can be justified by the high reduction in cell viability after the application of carbamide peroxide, taking into account that the high harmful stimulus of the material occurred prior to the evaluation period of free radical production³².

It is worth noting that, in VTP, the material used is responsible for preserving the morphofunctionality of the pulp cells and ensuring cell proliferation to facilitate tissue regeneration in the remaining dental pulp². In this study, we observed that BGP and BBP had a positive influence on cell migration, which progressed gradually and similarly to the control group. The study that compared the cell migration in pulp cells after contact with Brazilian propolis and MTA reported that MTA stimulated greater proliferation; however, the propolis group exhibited behaviors similar to that of the control group³⁵. Similarly, a study that compared the wound closure behaviors with mediums of

concentrations 10% and 20% and without the presence of green propolis reported a lack of significant differences in cell proliferation between the studied groups, which indicated that green propolis did not inhibit cell migration³⁶. This result corroborates the present finding.

In addition to confirming the cytocompatibility of these materials, the present study verified the antibacterial activity of Brazilian green and brown propolis. We demonstrated the bacteriostatic and bactericidal activity of BBP and BGP against endodontic pathogens such as *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. micra*, and *F. nucleatum*. This finding

corroborates with of another study that evaluated the antimicrobial impact of the crude extract of Brazilian red propolis against the same panel of the nine endodontic pathogens examined in this study. BBP exhibited MIC and MBC values of less than 100 µg/mL against *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. micra*, and *F. nucleatum*¹³.

Sá et al. evaluated the antibacterial activity of an aqueous extract of BGP, reported that BGP exhibited an MIC of 55 mg/mL against the pathogens *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, and *F. nucleatum* and an MBC of 27.5 mg/mL for *P. micra* and *P. intermedia*. In the present study, BBP showed lower MIC and MBC values, in the range 1.56–400 µg/mL, than the values reported in the previous study for the same anaerobic bacteria³⁷. The difference in the values can be attributed to the presentation of the material. The previous study³⁷ used an aqueous extract, whereas this study used a hydroalcoholic crude extract. The antibacterial activity of both materials was assured regardless of the presentation. The mechanism of propolis antimicrobial activity needs further elucidation; however, studies propose that its bioactive constituents, such as flavonoids and phenolic acid, inhibit the synthesis of cell membranes and interfere with the expression of bacterial genes³⁸.

The Brazilian green and brown propolis extracts studied here demonstrated high cytocompatibility with human pulp cells, qualifying them as promising compounds. The cytocompatibility of BGP and BBP of different concentrations with pulp cells was indicated by the preservation of cell viability and the

absence of oxidative stress production: they did not induce the production of NO and ROS at high levels compared to the control group (DMEM). In addition, BGP and BBP with a 50 µg/mL concentration were found to maintain normal patterns of cell membrane morphology and induce cell proliferation. This study shares the limitations associated with an *in vitro* laboratory study. Hence, in-depth *in vitro* and *in vivo* studies are required to determine the potential of this compound as a promising dental material in VTP.

CONCLUSION

We observed the both exhibited of cytocompatibility and absence production of oxidative stress. The BGP showed higher stimulation of cell migration with respect to human pulp cells. The BBP showed higher antibacterial activity than BGP.

REFERENCES

1. Elnawam H, Abdelmougod M, Mobarak A, Hussein M, Aboualmakarem H, Girgis M & El Backly R (2022) Regenerative Endodontics and Minimally Invasive Dentistry: Intertwining Paths Crossing Over Into Clinical Translation. *Front Bioeng Biotechnol.* 10:837639. doi: 10.3389/fbioe.2022.837639.
2. Leong D & Yap A (2021) Vital pulp therapy in carious pulp–exposed permanent teeth: an umbrella review. *Clinical Oral Investigations.* doi:10.1007/s00784-021-03960-2
3. Cakici F & Koc-Vural U (2022) Vital pulp therapy: Causes, indications, and current concepts. *Journal of Dental Sciences*, 17(1), 1-7. DOI: 10.1016/j.jds.2021.04.001.
4. Frass M, Strassl R, Friehs H, Müllner M, Kundi M & Kaye AD (2012). Use and acceptance of complementary and alternative medicine among the general population and medical personnel: a systematic review. *Ochsner J.* 12(1):45-56.
5. De Castro R, De Souza L, Bezerra Filho C, Santiago G, Lopes A & Araújo L (2019) In vitro study of the antibacterial activity of propolis and chitosan combination against *Streptococcus mutans* biofilm. *Brazilian oral research*, 33, e034. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0034.
6. Da Silva A, Costa E, & Santos C (2021) Brazilian green propolis extract activity against SARS-CoV-2 in vitro. *Natural Product Research*, 1-6. doi: 10.1080/14786419.2021.1968973.
7. Deegan K, Fonseca M, Oliveira D, Santos L, Fernandez C, Hanna S, Machado B, Umsza-Guez M, Meyer R & Portela R. (2019) Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Clinical Isolates to Allopathic Antifungals and Brazilian Red, Green, and Brown Propolis Extracts. *Front Vet Sci.* 6:460. doi:10.3389/fvets.2019.00460
8. Song Y, Park E, & Hur G (2022) Antioxidant activity and phenolic composition of propolis extracts from different regions in Korea. *Preventive Nutrition and Food Science*, 27(1), 93-101. DOI: 10.3746/pnf.2022.27.1.93.
9. Khalil M & Alkhalidi H (2021) Anti-inflammatory effects of propolis in combination with triamcinolone acetonide on oral lichen planus. *Brazilian Oral*

Research, 35, e033. DOI: 10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0033.

10. Li L, Li B, Li J, Li Y, Yu C, Wang X & Chen X (2021) Brazilian green propolis suppresses gastric cancer cell proliferation and metastasis by targeting the PI3K/AKT signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111339. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111339.

11. Zhang W, Margarita GE, Wu D, Yuan W, Yan S, Qi S, Xue X, Wang K & Wu L (2022) Antibacterial Activity of Chinese Red Propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Molecules*. 27(5):1693. doi:10.3390/molecules27051693

12. Kunert O, & Crailsheim K (2021). The biology and evolution of propolis defenses. *Trends in Plant Science*, 26(12), 1198-1209. doi: 10.1016/j.tplants.2021.09.004.

13. Neto N, Bonvicini J, de Souza G, Santiago M, Veneziani R, Ambrósio S, Bastos J, Silva M, Martins C, Moura C & Turrioni A (2022) Antibacterial activity of Brazilian red propolis and in vitro evaluation of free radical production. *Arch. Oral Biol*. 143:105520. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105520

14. Berretta A, de Castro P, Cavalheiro A, Fortes V, Bom V, Nascimento A, Marquele-Oliveira F, Pedrazzi V, Ramalho L & Goldman GH (2013) Evaluation of Mucoadhesive Gels with Propolis (EPP-AF) in Preclinical Treatment of Candidiasis Vulvovaginal Infection. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:641480. doi: 10.1155/2013/641480.

15. Santos M, Oliveira L, Ribeiro V, Soares M, Morae G, Sartori A, Rosalen P, Bastos J, de Alencar S, Veneziani R & Ambrósio S (2021) Isolation of diterpenes from *Araucaria* sp Brazilian brown propolis and development of a validated high-performance liquid chromatography method for its analysis. *Journal of separation science*, 44(16), 3089–3097. doi: 10.1002/jssc.202100374

16. de Souza Silva T, Silva J, Braun G, Mejia J, Ccapatinta G, Santos M, Tanimoto MH, Bastos J, Parreira R, Orenha R, Borges A, Berretta A, Veneziani R, Martins C & Ambrósio S (2021) Green and Red Brazilian Propolis : Antimicrobial Potential and Anti-Virulence against ATCC and Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria. *Chem Biodivers*. (8):e2100307. doi: 10.1002/cbdv.202100307.

17. Trusheva B, Trunkova D & Bankova V (2007) Different extraction methods

of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem Cent J.*;1:13. doi: 10.1186/1752-153X-1-13.

18. Turrioni A, Oliveira Neto N, Xu Y, Morse L, Costa C, Battaglino R, & Hebling J (2021) Proliferation rate and expression of stem cells markers during expansion in primary culture of pulp cells. *Brazilian oral research*, 35, e128. vol35.0128. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021>

19. Klein-Junior C, Zimmer R, Dobler T, Oliveira V, Marinowic DR, Özkömür A & Reston E (2021) Cytotoxicity assessment of Bio-C Repair Ion+: A new calcium silicate-based cement. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 15(3):152-156. doi: 10.34172/joddd.2021.026

20. Vargas F, Soares D, Ribeiro A, Hebling J & Costa C (2014) "Protective Effect of Alpha-Tocopherol Isomer from Vitamin E against the H₂O₂ Induced Toxicity on Dental Pulp Cells", *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 895049, 5. <https://doi.org/10.1155/2014/895049>

21. Horsophonphong S, Kitkumthorn N, Sritanaudomchai H, Nakornchai S & Surarit R (2020) High Glucose Affects Proliferation, Reactive Oxygen Species and Mineralization of Human Dental Pulp Cells. *Braz Dent J*. 31(3):298-303. doi: 10.1590/0103- 6440202003120.

22. Wu H, Shen X, Huo D, Ma Y, Bian M, Shen C & Hou C (2020) Fluorescent and colorimetric dual-readout sensor based on Griess assay for nitrite detection. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 15;225:117470. doi: 10.1016/j.saa.2019.117470.

23. Guedes F, Bonvicini J, de Souza G, da Silva W, Moura C, Paranhos L, & Turrioni A (2021) Cytotoxicity and dentin composition alterations promoted by different chemomechanical caries removal agents: A preliminary in vitro study. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 13(8), e826–e834. <https://doi.org/10.4317/jced.58208>

24. Haupt F, Meinel M, Gunawardana A & Hülsmann M (2020) Effectiveness of different activated irrigation techniques on debris and smear layer removal from curved root canals: a SEM evaluation. *Aust Endod J*. 46(1):40-46. doi: 10.1111/aej.12342.

25. Basso F, Pansani T, Turrioni A, Soares D, Costa C & Hebling J (2016)

Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8 Impair In Vitro Migration and Induce Apoptosis of Gingival Fibroblasts and Epithelial Cells, Delaying Wound Healing. J Periodontol. 87(8):990-6. doi: 10.1902/jop.2016.150713.

26. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007) Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria, Approved Standard, seventh ed., M11-A7. Wayne, PA: USA.

27. Rampersad S (2012) Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors (Basel). 12(9):12347-60. doi: 10.3390/s120912347.

28. Pereira M, Monteiro C, de Oliveira W, Santos B, Fontes A & Cabral Filho P (2020) Resazurin-Based Assay to Evaluate Cell Viability After Quantum Dot Interaction. Methods Mol Biol. 2135:213-221. doi: 10.1007/978-1-0716-0463-2_12.

29. Ribeiro V, Arruda C, Aldana-Mejia J, Bastos J, Tripathi S, Khan S, Khan I & Ali Z (2021) Phytochemical, Antiplasmodial, Cytotoxic and Antimicrobial Evaluation of a Southeast Brazilian Brown Propolis Produced by Apis mellifera Bees. Chemistry & biodiversity, 18(9), e2100288. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100288>

30. Coluccia A, Matti F, Zhu X, Lussi A, Stähli A, Sculean A & Eick S (2022) In Vitro Study on Green Propolis as a Potential Ingredient of Oral Health Care Products. Antibiotics (Basel). 11(12):1764. doi: 10.3390/antibiotics11121764.

31. Benetti F, Gomes-Filho J, Ferreira L, Ervolino E, Briso A, Sivieri-Araújo G, Dezan-Júnior E & Cintra L (2017) Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo: Effects of the dental bleaching in pulp. Arch Oral Biol. 81:103-109. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.04.013

32. Han J, Shin E, Hong J & Cho N (2019) Nitric oxide-induced cytotoxicity and cell cycle arrest of LNCaP prostate cancer cells via reactive oxygen species-mediated inhibition of cyclooxygenase-2 and survivin. Journal of Cellular Physiology, 234(10), 17512–17523. <https://doi.org/10.1002/jcp.28401>

33. Kudo D, Inden M, Sekine S, Tamaoki N, Iida K, Naito E, Watanabe K,

- Kamishina H, Shibata T, Hozumi I. Conditioned medium of dental pulp cells stimulated by Chinese propolis show neuroprotection and neurite extension in vitro. *Neurosci Lett*. 2015 Mar 4;589:92-7. doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.035.
34. Liew F and Cox F (1991) Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today*. 12(3):A17-21. doi: 10.1016/S0167-5699(05)80006-4
35. Shi B, Zhao Y & Yuan X (2019) Effects of MTA and Brazilian propolis on the biological properties of dental pulp cells. *Brazilian Oral Research*, 33, e117. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0117>
36. Elkhenany H, El-Badri N & Dhar M (2019) Green propolis extract promotes in vitro proliferation, differentiation, and migration of bone marrow stromal cells. *Biomed Pharmacother*. 115:108861. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108861
37. Sá A, de Paula R, Abu H, de Queiroz T, Pereira T, Lima P, Berretta A, Marcucci M, Talge C & de Oliveira L (2022) Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Brazilian Green Propolis Aqueous Extract against Dental Anaerobic Bacteria. *Molecules*. 27(23):8128. Published 2022 Nov 22. doi:10.3390/molecules27238128
38. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Madheswaran T, Davamani F, Pichika M, Mak K, Fawzy A, Daood U & Pau A (2021) Effect of Propolis Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm in the Root Canal. *Molecules*. 30;26(3):715. doi: 10.3390/molecules26030715.

3. REFERÊNCIAS

1. Patel DK. Health Benefits, Therapeutic Applications, and Recent Advances of Cirsilineol in the Medicine: Potential Bioactive Natural Flavonoids of Genus *Artemisia*. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**. 2023;23(7):894-907. <https://doi.org/10.2174/1871530323666221122123456>
2. Kehribar L, Coşkun HS, Surucu S, Aydın M, Mahiroğulları M. The Antibacterial Effectiveness of Propolis on Medical Screws. **Cureus**. 2021;9;13(7):e16278 <https://doi.org/10.7759/cureus.16278>
3. Papp Z, Bouchelaghem S, Szekeres A, Meszéna R, Gyöngyi Z, Papp G. The Scent of Antifungal Propolis. **Sensors** (Basel). 2021;27;21(7):2334. <https://doi.org/10.3390/s21072334>
4. Demir S, Atayoglu AT, Galeotti F, Garzarella EU, Zaccaria V, Volpi N et al. Antiviral activity of different extracts of standardized propolis preparations against HSV. **Antivir Ther**. 2020;25(7):353-363. <https://doi.org/10.3851/IMP3383>
5. Silveira MAD, De Jong D, Berretta AA, Galvão EBDS, Ribeiro JC, Cerqueira-Silva T, Amorim TC, Conceição LFMRD, Gomes MMD, Teixeira MB, Souza SP et al. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. **Biomed Pharmacother**. 2021;138:111526 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111526>
6. Oliveira RD, Celeiro SP, Barbosa-Matos C, Freitas AS, Cardoso SM, Viana-Pereira M, et al. Portuguese Propolis Antitumoral Activity in Melanoma Involves ROS Production and Induction of Apoptosis. **Molecules**. 2022;27(11):3533 <https://doi.org/10.3390/molecules27113533>
7. Freitas AS, Cunha A, Oliveira R, Almeida-Aguiar C. Propolis antibacterial and antioxidant synergisms with gentamicin and honey. **J Appl Microbiol**. 2022;132(4):2733-2745. <https://doi.org/10.1111/jam.15440>

8. DE Luca MP, Freires IA, Gala-García A, Santos VR, Vale MP, Alencar SM, Rosalen PL. The anti-caries activity and toxicity of an experimental propolis-containing varnish. **Braz Oral Res.** 2017;31:e45. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0045>
9. Park YK, Ikegaki M, Abreu JA Da S, Alcici NMF. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Food Sci Technol.** 1998;18(3):313–8. <https://doi.org/10.1590/S0101-20611998000300011>
10. Pellati F, Prencipe FP, Bertelli D, Benvenuti S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. **J Pharm Biomed Anal.** 2013;81-82:126-32. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.003>
11. Nani BD, Sardi JCO, Lazarini JG, Silva DR, Massariolli AP, Cunha TM, et al. Antiinflammatory and anti-Candida Effects of Brazilian Organic Propolis, a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Food. **J. Agric. Food Chem.** 2019;68, 2861–2871 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07304>
12. PARK, Yong Kun et al. Comparação das características físico-químicas das própolis produzidas na região sub-tropical da América do Sul: evidência fitoquímica de sua origem botânica. **Análise.** 2001;13:8.
13. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxid Med Cell Longev.** 2018;7074209. <https://doi.org/10.1155/2018/7074209>
14. Berretta AA, Zamarrenho LG, Correa JA, De Lima JA, Borini GB, Ambrósio SR, et al. Development and Characterization of New Green Propolis Extract Formulations as Promising Candidates to Substitute for Green Propolis Hydroalcoholic Extract. **Molecules.** 2023;16;28(8):3510 <https://doi.org/10.3390/molecules28083510>

15. Santos MFC, Oliveira LC, Ribeiro VP, Soares MG, Morae GOI, Sartori AGO et al. Isolation of diterpenes from Araucaria sp Brazilian brown propolis and development of a validated high-performance liquid chromatography method for its analysis. **J Sep Sci.** 2021;44(16):3089-3097. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100374>
16. Ricucci D, Siqueira JF Jr, Li Y, Tay FR. Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. **J Dent.** 2019;86:41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.05.022>
17. Tewari N, Goel S, Mathur VP, O'Connell AC, Johnson RM, Rahul M, et al. Success of medicaments and techniques for pulpotomy of primary teeth: An overview of systematic reviews. **Int J Paediatr Dent.** 2022;32(6):828-842. <https://doi.org/10.1111/ipd.12963>
18. RojaRamya KS, Chandrasekhar R, Uloopi KS, Vinay C. Treatment Outcomes of Pulpotomy with Propolis in Comparison with MTA in Human Primary Molars: A 24-month Follow-up Randomized Controlled Trial. **Int J Clin Pediatr Dent.** 2022;15(Suppl 1):S3-S7. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-2120>
19. Wassel M, Hamdy D, Elghazawy R. Evaluation of four vital pulp therapies for primary molars using a dual-cured tricalcium silicate (TheraCal PT): one-year results of a non-randomized clinical trial. **J Clin Pediatr Dent.** 2023;47(2):10-22.
20. Neto NFO, Bonvicini JFS, de Souza GL, Santiago MB, Veneziani RCS, Ambrósio SR, et al. Antibacterial activity of Brazilian red propolis and in vitro evaluation of free radical production. **Arch Oral Biol.** 2022;143:105520. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105520>

ANEXO I:

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO DIRETO EM CÉLULAS PULPARES HUMANAS DE TRÊS DIFERENTES TIPOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRA

Pesquisador: Ana Paula Turroni Hidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47122321.3.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.955.919

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A pulpotomia consiste na remoção da polpa coronária de dentes decíduos e permanentes jovens em casos de exposição pulpar por lesões cáries extensas, traumas ou iatrogenias e, desta forma, atua na preservação da polpa radicular através da utilização de um material biocompatível¹. O agregado trióxido mineral (MTA) é o padrão ouro para pulpotomias, apresenta estímulo à diferenciação odontogênica e ausência de toxicidade.

Contudo, possui limitações relacionadas à alteração de cor, tempo de presa extenso, custo elevado e atividade anti-inflamatória reduzida^{2,3}. A própolis brasileira se trata de um conjunto de materiais resinosos coletados de diferentes fontes vegetais e elaborada por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de exsudatos resinosos de cascas e botões florais que são biomodificados pela adição de cera e pela ação da enzima 13- glicosidase presente nas secreções salivares das abelhas⁴⁻⁶. A composição química da própolis é complexa e varia de acordo com a flora da região de onde é produzida⁷, assim como a época da coleta e características genéticas da abelha produtora o que influencia diretamente nos princípios ativos presentes, refletindo na atividade biológica e farmacêutica que os diferentes produtos apresentam⁸. Os principais componentes da própolis brasileira consistem em resinas e bálsamos aromáticos, ceras, óleos essenciais, grãos de pólen, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), minerais e vitaminas. Apesar da ampla variedade da própolis brasileira a qual é classificada em diferentes tipos considerando

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.955.919

características químicas, espécie produtora e diversidade do clima no país, sendo do tipo 1 ao 13, a própolis vermelha, marrom e verde são alvos da maioria dos estudos relacionados às propriedades desse produto⁹. A própolis vermelha brasileira (PVB) encontrada no litoral nordestino difere dos demais tipos devido à sua origem, a qual se deriva principalmente do exsudato resinoso vermelho da superfície da *Dalbergia ecastophyllum*¹⁰. Atividade antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante e efeito citotóxico frente a linhagens tumorais já foram descritos^{11,12}. Acredita-se que tal potencial se dê em relação ao sinergismo existente entre os seus componentes da classe isoflavonóides, compostos estes que não são encontrados nas demais própolis¹³. A própolis verde brasileira (PVEB) é a espécie mais investigada e, também, a mais popular. É encontrada no sudeste brasileiro e possui como princípio ativo a artepentina C e se origina a partir da *Baccharis dracunculifolia*¹¹. Observou-se que a PVEB foi capaz de inibir a progressão de câncer pulmonar¹⁴, atividade antiviral¹⁵ e atividade anticariogênica contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus*

sobrinus, *Streptococcus salivaris*, *Streptococcus sanguinis* e *Lactobacillus casei*^{16,17}, assim como ação antifúngica em relação à *Candida albicans*¹⁸. Apesar de comprovada antigenotoxicidade^{19,20}, atividade antimicrobiana^{21,22} e antioxidante^{23,24}, a própolis marrom brasileira (PMB) não é tão investigada quanto à verde e vermelha. É encontrada no sul do Brasil, apresenta sua composição química principalmente em benzofenonas poli-isopreniladas e têm origem botânica a partir da *Clusiaceae* pertencente à família *Guttiferaceae*²⁵. Em ensaio *in vitro*³ com células pulpareas humanas, viu-se que a própolis brasileira exibiu viabilidade celular similar ao MTA e, além disso, mostrou-se capaz de induzir nódulos de mineralização e atividade anti-inflamatória superiores. A escolha do material nas pulpotomias irá influenciar na longevidade do dente afetado, portanto, o presente estudo pretende comparar as propriedades biológicas da PVB, PVEB e PMB e do MTA em contato direto com células pulpareas humanas, assim como testar a atividade bactericida das própolis em relação a nove bactérias envolvidas na infecção endodôntica primária.

Hipótese:

As própolis brasileiras testadas não apresentarão citotoxicidade às células pulpareas e terão alta atividade bactericida para as bactérias envolvidas na infecção endodôntica inicial.

Metodologia Proposta:

Obtenção das linhagens celulares Com o intuito de prevenir o contágio pelo novo coronavírus, a

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4131 E-mail: cep@propp.ufu.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO DIRETO EM CÉLULAS PULPARES HUMANAS DE TRÊS DIFERENTES TIPOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRA

Pesquisador: Ana Paula Turroni Hidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47122321.3.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.955.919

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A pulpotomia consiste na remoção da polpa coronária de dentes decíduos e permanentes jovens em casos de exposição pulpar por lesões cariosas extensas, traumas ou iatrogenias e, desta forma, atua na preservação da polpa radicular através da utilização de um material biocompatível¹. O agregado trióxido mineral (MTA) é o padrão ouro para pulpotomias, apresenta estímulo à diferenciação odontogênica e ausência de toxicidade.

Contudo, possui limitações relacionadas à alteração de cor, tempo de presa extenso, custo elevado e atividade anti-inflamatória reduzida^{2,3}. A própolis brasileira se trata de um conjunto de materiais resinosos coletados de diferentes fontes vegetais e elaborada por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de exsudatos resinosos de cascas e botões florais que são biomodificados pela adição de cera e pela ação da enzima 13- glicosidase presente nas secreções salivares das abelhas⁴⁻⁶. A composição química da própolis é complexa e varia de acordo com a flora da região de onde é produzida⁷, assim como a época da coleta e características genéticas da abelha produtora o que influencia diretamente nos princípios ativos presentes, refletindo na atividade biológica e farmacêutica que os diferentes produtos apresentam⁸. Os principais componentes da própolis brasileira consistem em resinas e bálsamos aromáticos, ceras, óleos essenciais, grãos de pólen, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), minerais e vitaminas. Apesar da ampla variedade da própolis brasileira a qual é classificada em diferentes tipos considerando

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.955.919

utilização de máscara PFF2/N95, óculos de proteção, gorro, luvas e avental descartável serão obrigatórios durante a anamnese e no momento de coleta das amostras, além de disponibilização de álcool em gel para higienização das mãos para toda a equipe. Após aprovação do presente estudo de cunho laboratorial ou "in vitro", os pesquisadores se direcionarão à Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, a qual possui pacientes cadastrados por demanda

espontânea para exodontia de terceiros molares, e assim, abordar-se-á três pacientes no momento da anamnese conduzida pelo aluno responsável com o Instrumento de coleta de dados e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para que um total de três terceiros molares possam ser obtidos. O dente será levado imediatamente ao laboratório imerso em solução apropriada. Com a utilização de alta- rotação e irrigação constante, os dentes serão submetidos a um desgaste cervical e levados ao fluxo laminar, onde serão divididos ao meio com o auxílio de dois fórceps. Os remanescentes dentais serão devidamente descartados e o tecido pulpar de cada dente será mecanicamente removido e, desta forma, submetido

ao isolamento das células, a partir da técnica de explante tecidual. Independentemente da condição pulpar, todos os dentes serão devidamente descartados em local apropriado. Àqueles tecidos que se apresentarem com aspecto necrótico,

não serão submetidos à técnica de isolamento das células pois a polpa de coloração avermelhada possui um maior número de células viáveis.

O número amostral de três participantes se justifica pelo fato de que as células pulpares humanas apresentam ótima taxa de proliferação. Diante disso, é possível utilizar as células de um mesmo doador para diferentes metodologias. Adicionalmente, estudos prévios têm utilizado número amostral semelhante 26-30.

Distribuição dos grupos experimentais

A PVEB, a PVB e a PMB serão utilizadas no presente estudo na concentração de 15 mg/mL aplicadas diretamente sobre as células pulpares humanas em diferentes concentrações. As células pulpares serão semeadas em placas de 96 poços (20.000/poço) e após 24 h, submetidas à aplicação direta dos materiais: PVEB, PVB e PMB, MTA (1:1, 1:2, 1:4 e 1:8), DMSO 0,5% e DMEM (grupo controle).

Cada grupo experimental será composto por células de todos os doadores, ou seja, em um total de 9 compartimentos por grupo, três compartimentos conterão as células do doador 1, três

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4131 E-mail: cep@propp.ufu.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO DIRETO EM CÉLULAS PULPARES HUMANAS DE TRÊS DIFERENTES TIPOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRA

Pesquisador: Ana Paula Turroni Hidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47122321.3.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.955.919

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A pulpotomia consiste na remoção da polpa coronária de dentes decíduos e permanentes jovens em casos de exposição pulpar por lesões cáries extensas, traumas ou iatrogenias e, desta forma, atua na preservação da polpa radicular através da utilização de um material biocompatível¹. O agregado trióxido mineral (MTA) é o padrão ouro para pulpotomias, apresenta estímulo à diferenciação odontogênica e ausência de toxicidade.

Contudo, possui limitações relacionadas à alteração de cor, tempo de presa extenso, custo elevado e atividade anti-inflamatória reduzida^{2,3}. A própolis brasileira se trata de um conjunto de materiais resinosos coletados de diferentes fontes vegetais e elaborada por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de exsudatos resinosos de cascas e botões florais que são biomodificados pela adição de cera e pela ação da enzima 13- glicosidase presente nas secreções salivares das abelhas⁴⁻⁶. A composição química da própolis é complexa e varia de acordo com a flora da região de onde é produzida⁷, assim como a época da coleta e características genéticas da abelha produtora o que influencia diretamente nos princípios ativos presentes, refletindo na atividade biológica e farmacêutica que os diferentes produtos apresentam⁸. Os principais componentes da própolis brasileira consistem em resinas e bálsamos aromáticos, ceras, óleos essenciais, grãos de pólen, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), minerais e vitaminas. Apesar da ampla variedade da própolis brasileira a qual é classificada em diferentes tipos considerando

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.955.919

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Em relação à exodontia de terceiros molares, tal procedimento pode acarretar em complicações ao paciente, como hemorragia, alveolite, infecção, fratura radicular, parestesia, fratura mandibular e lesão aos dentes vizinhos. Fatores que podem influenciar na origem de algum tipo de complicação como idade do paciente e seu estado de saúde, gênero, grau de impacção do dente, experiência do cirurgião, tabagismo, uso de medicação anticoncepcional, qualidade da higiene oral, técnica cirúrgica, entre outros, serão detectados durante a anamnese e caso algum fator agravante seja detectado, a cirurgia será contraindicada. Para que esses riscos sejam minimizados, a técnica cirúrgica será realizada de forma cautelosa, evitando a dilaceração dos tecidos e um longo período de exposição ao procedimento cirúrgico. Caso alguma das complicações citadas ocorra, os pesquisadores se responsabilizarão pelo atendimento e acompanhamento do caso até que o quadro do participante apresente melhoras. As células da polpa dentária serão utilizadas única e exclusivamente para o presente estudo e não serão realizados procedimentos com outras finalidades. Com

o objetivo de minimizar o risco de identificação dos pacientes, será atribuído um código numérico para cada participante/dente, o qual será utilizado para controle no armazenamento das células. Além disso, nenhum dado que favoreça a identificação dos pacientes será coletado (ex: nome, número de documento, endereço).

Benefícios:

Não há benefício direto ao participante da pesquisa, porém os testes realizados irão contribuir para que, futuramente, esses produtos naturais possam ser utilizados na clínica odontológica de modo a melhorar a reparação das células pulpares humanas afetadas por cárie ou trauma dental. O paciente é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem qualquer prejuízo ou coação. Até o momento da divulgação dos resultados, ele também será livre para solicitar a retirada dos seus dados da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pendências atendidas apontadas no parecer anterior:

1) Descrever as medidas tomadas para evitar o contágio pela COVID-19 (participante e equipe executora) durante o período de coleta de dados.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4131 E-mail: cep@propp.ufu.br

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Obrigado pela orientação, trata-se de algo extremamente importante. Abaixo, segue o trecho adicionado ao projeto:

Página 4, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, primeiro parágrafo: "Com o intuito de prevenir o contágio pelo novo coronavírus, a utilização de máscara PFF2/N95, óculos de proteção, gorro, luvas e avental descartável serão obrigatórios durante a anamnese e no momento de coleta das amostras, além de disponibilização de álcool em gel para higienização das mãos para toda a equipe."

2) Justificar o número amostral. Por que apenas 3 participantes?

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Página 5, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, terceiro parágrafo: "O número amostral de três participantes se justifica pelo fato de que as células pulpares humanas apresentam ótima taxa de proliferação. Diante disso, é possível utilizar as células de um mesmo doador para diferentes metodologias. Adicionalmente, estudos prévios têm utilizado número amostral semelhante 26-30".

Referências utilizadas na Pendência 2:

1. Bonvicini JFS, Basso FG, de Souza Costa CA, Soares CJ, Turroni AP. Photobiomodulation effect of red LED (630 nm) on the free radical levels produced by pulp cells under stress conditions. Lasers Med Sci. 2021 Apr 7. doi: 10.1007/s10103-021-03309-x. Epub ahead of print. PMID: 33826014.
2. de Souza GL, Moura CCG, Silva ACA, Marinho JZ, Silva TR, Dantas NO, Bonvicini JFS, Turroni AP. Effects of zinc oxide and calcium-doped zinc oxide nanocrystals on cytotoxicity and reactive oxygen species production in different cell culture models. Restor Dent Endod. 2020 Oct 19;45(4):e54. doi: 10.5395/rde.2020.45.e54. PMID: 33294419; PMCID: PMC7691257.

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4131 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.955.919

3. Oliveira LV, da Silva GR, Souza GL, Magalhães TEA, Barbosa GLR, Turroni AP, Moura CCG. A laboratory evaluation of cell viability, radiopacity and tooth discoloration induced by regenerative endodontic materials. *Int Endod J.* 2020 Aug;53(8):1140-1152. doi: 10.1111/iej.13308. Epub 2020 May 21. PMID: 32299123.

4. de Souza, G. L., Almeida Silva, A. C., Dantas, N. O., Silveira Turroni, A. P., & Moura, C. C. G. (2020). Cytotoxicity and Effects of a New Calcium Hydroxide Nanoparticle Material on Production of Reactive Oxygen Species by LPS-Stimulated Dental Pulp Cells. *Iranian Endodontic Journal*, 15(4), 227-235. <https://doi.org/10.22037/iej.v15i4.28942>

3) Em relação a metodologia, não está descrito o tipo de estudo que será realizado.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Página 4, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, primeiro parágrafo: "... Após aprovação do presente estudo de cunho laboratorial ou "in vitro", os pesquisadores se direcionarão à Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia ..."

4) Em relação aos participantes, apresentar um plano de abordagem e recrutamento dos doadores dos dentes: não há descrição de como eles serão convidados(as) para participar da pesquisa; em que momento os pacientes elegíveis serão abordados sobre a exodontia; descrever o local que ocorrerá essa abordagem e o registro de TCLE.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Página 4, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, primeiro parágrafo: "... Após aprovação do presente estudo de cunho laboratorial ou "in vitro", os pesquisadores se direcionarão à Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, a qual possui pacientes cadastrados por demanda espontânea para exodontia de terceiros molares, e assim, abordar-se-á três pacientes no momento da anamnese

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4131 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.955.919

conduzida pelo aluno responsável com o Instrumento de coleta de dados e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para que um total de três terceiros molares possam ser obtidos."

5) Considerando a descrição de coleta e armazenagem do material, o pesquisador irá utilizar o dente apenas para realizar a cultura de celular. Apresentar uma declaração de armazenamento de material do tipo Biorepositório, destacando o tempo de guarda antes do descarte.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

O documento foi apresentado.

6) Em relação aos métodos não está descrito qual o desfecho e/ou destino que será dado ao dente que apresentar o tecido pulpar não viável para análise;

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Todos os dentes são devidamente descartados em local apropriado logo após a remoção do tecido pulpar independente da condição que a polpa se apresente. O parágrafo abaixo foi reformulado para atender à demanda apresentada:

Página 4, Seção: Material e Métodos, Item 2.2 Obtenção das linhagens celulares, segundo parágrafo: "O dente será levado imediatamente ao laboratório imerso em solução apropriada. Com a utilização de alta- rotação e irrigação constante, os dentes serão submetidos a um desgaste cervical e levados ao fluxo laminar, onde serão divididos ao meio com o auxílio de dois fórceps. Os remanescentes dentais serão devidamente descartados e o tecido pulpar de cada dente será mecanicamente removido e, desta forma, submetido ao isolamento das células, a partir da técnica de explante tecidual. Independentemente da condição pulpar, todos os dentes serão devidamente descartados em local apropriado. Àqueles tecidos que se apresentarem com aspecto necrótico, não serão submetidos à técnica de isolamento das células pois a polpa de coloração avermelhada possui um maior número de células viáveis."

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4131 E-mail: cep@propp.ufu.br

Página 08 de 13

7) Em relação aos métodos não está descrito como que ocorrerá a randomização entre grupo controle e experimental.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Página 5, Seção: Material e Métodos, Item 2.3 Distribuição dos grupos experimentais, segundo parágrafo: "Cada grupo experimental será composto por células de todos os doadores, ou seja, em um total de 9 compartimentos por grupo, três compartimentos conterão as células do doador 1, três compartimentos conterão células do doador 2, e outros três compartimentos conterão células do doador 3. As mesmas células utilizadas para realizar o plaqueamento dos grupos experimentais serão as mesmas do controle. Os grupos experimentais e controles serão: PVB (DMEM sem soro + Própolis vermelha), PVEB (DMEM sem soro + Própolis verde), PMB (DMEM sem soro + Própolis marrom), MTA (DMEM sem soro + DMSO 0,5%), Controle negativo (DMEM sem soro + DMSO 0,5%), Controle positivo (DMEM sem soro)."

8) Em relação aos métodos, no item 2.4, não está descrito qual o desfecho e/ou destino será dado ao material com concentração não satisfatória.

RESPOSTA DO PESQUISADOR:

Para que possamos trabalhar com concentrações que mantenham as células pulpareis viáveis, se faz necessário realizar o teste de MTT para que se possa descobrir quais das concentrações poderão ser utilizadas nos experimentos sem prejuízo às células, portanto, a análise de IC50 é requerida para determinar o ótimo parâmetro e assim, prosseguir o estudo com a utilização de concentrações adequadas. Ao final de cada procedimento, a placa de 96 poços é descartada em local apropriado uma vez que a análise já foi realizada e os dados quantitativos obtidos. Portanto, segue a adição da sentença abaixo:

Página 6, Seção: Material e Métodos, Item 2.4 Testes, primeiro parágrafo: "... Após a realização de cada teste, as placas contendo as culturas celulares avaliadas serão descartadas em lixo próprio para material contaminado."

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO DIRETO EM CÉLULAS PULPARES HUMANAS DE TRÊS DIFERENTES TIPOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRA

Pesquisador: Ana Paula Turroni Hidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47122321.3.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.955.919

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A pulpotomia consiste na remoção da polpa coronária de dentes decíduos e permanentes jovens em casos de exposição pulpar por lesões cáries extensas, traumas ou iatrogenias e, desta forma, atua na preservação da polpa radicular através da utilização de um material biocompatível¹. O agregado trióxido mineral (MTA) é o padrão ouro para pulpotomias, apresenta estímulo à diferenciação odontogênica e ausência de toxicidade.

Contudo, possui limitações relacionadas à alteração de cor, tempo de presa extenso, custo elevado e atividade anti-inflamatória reduzida^{2,3}. A própolis brasileira se trata de um conjunto de materiais resinosos coletados de diferentes fontes vegetais e elaborada por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de exsudatos resinosos de cascas e botões florais que são biomodificados pela adição de cera e pela ação da enzima 13- glicosidase presente nas secreções salivares das abelhas⁴⁻⁶. A composição química da própolis é complexa e varia de acordo com a flora da região de onde é produzida⁷, assim como a época da coleta e características genéticas da abelha produtora o que influencia diretamente nos princípios ativos presentes, refletindo na atividade biológica e farmacêutica que os diferentes produtos apresentam⁸. Os principais componentes da própolis brasileira consistem em resinas e bálsamos aromáticos, ceras, óleos essenciais, grãos de pólen, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), minerais e vitaminas. Apesar da ampla variedade da própolis brasileira a qual é classificada em diferentes tipos considerando

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 4.955.919

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: AGOSTO/2022.

* Tolerância máxima de 01 mês para atraso na entrega do relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_1757687.pdf	13/07/2021 16:31:22		Aceito
Outros	Resposta_Parecer_CEP.docx	10/07/2021 09:25:36	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Outros	Instrumento_coleta_dados.docx	10/07/2021 09:24:52	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Biorrepositorio.pdf	10/07/2021 09:24:31	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_propolis_corrigido.docx	10/07/2021 09:24:16	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes.pdf	20/05/2021 14:35:04	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adulto.pdf	20/05/2021 14:34:41	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Equipe_Executora_assinaturas.pdf	20/05/2021 14:33:18	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinaturas.pdf	20/05/2021 14:31:51	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4131 E-mail: cep@propp.ufu.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO DIRETO EM CÉLULAS PULPARES HUMANAS DE TRÊS DIFERENTES TIPOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRA

Pesquisador: Ana Paula Turroni Hidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47122321.3.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.955.919

Apresentação do Projeto:

Introdução:

A pulpotomia consiste na remoção da polpa coronária de dentes decíduos e permanentes jovens em casos de exposição pulpar por lesões cáries extensas, traumas ou iatrogenias e, desta forma, atua na preservação da polpa radicular através da utilização de um material biocompatível¹. O agregado trióxido mineral (MTA) é o padrão ouro para pulpotomias, apresenta estímulo à diferenciação odontogênica e ausência de toxicidade.

Contudo, possui limitações relacionadas à alteração de cor, tempo de presa extenso, custo elevado e atividade anti-inflamatória reduzida^{2,3}. A própolis brasileira se trata de um conjunto de materiais resinosos coletados de diferentes fontes vegetais e elaborada por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de exsudatos resinosos de cascas e botões florais que são biomodificados pela adição de cera e pela ação da enzima 13- glicosidase presente nas secreções salivares das abelhas⁴⁻⁶. A composição química da própolis é complexa e varia de acordo com a flora da região de onde é produzida⁷, assim como a época da coleta e características genéticas da abelha produtora o que influencia diretamente nos princípios ativos presentes, refletindo na atividade biológica e farmacêutica que os diferentes produtos apresentam⁸. Os principais componentes da própolis brasileira consistem em resinas e bálsamos aromáticos, ceras, óleos essenciais, grãos de pólen, compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), minerais e vitaminas. Apesar da ampla variedade da própolis brasileira a qual é classificada em diferentes tipos considerando

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4131 **E-mail:** cep@propp.ufu.br