



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



**Efeito das própolis verde e marrom na migração de células pulpare e em
bactérias envolvidas na infecção endodôntica primária**

UBERLÂNDIA

2024

MARIA EDUARDA PUGA REZENDE

Efeito das própolis verde e marrom na migração de células pulpare e em bactérias envolvidas na infecção endodôntica primária

Trabalho de conclusão de curso apresentado
a Faculdade de Odontologia da UFU, como
requisito parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

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

UBERLÂNDIA

2024

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Daiane e Marco por sempre acreditarem em mim, por não medirem esforços para tornar a minha caminhada possível. Toda minha gratidão, amor e admiração por vocês. Se estou aqui hoje, é por vocês.

Agradeço ao meu noivo Gabriel, por sempre estar ao meu lado, por me encorajar e ajudar em tudo desde sempre. Por ser abrigo, carinho e amizade. Todo meu amor por você. Muita gratidão por te ter ao meu lado, você foi essencial neste sonho.

Aos meus avôs por sempre estarem torcendo por mim. Em especial meu vô Luiz e minha vó Sônia que cuidou de mim igual filha durante anos, e o exemplo do meu avô que estudo é o que ninguém pode tirar de você, e isso é um mantra em minha vida.

A minha irmã Isabela por ser minha inspiração na vida acadêmica e na sua determinação, mesmo distantes fisicamente nossa conexão na vida é pra sempre.

Aos meus tios por todo carinho e dedicação comigo. Em especial a minha tia Mi que é minha inspiração nessa profissão linda. A minha tia Dan que sempre me fez parte da família dela e cuidou de mim como filha. E aos meus padrinhos Dri e Jana pelo carinho.

Aos meus sogros Ita e Selma, e minha cunhada Lídia por todo amor e carinho que tem comigo e que por minha parte é recíproco, e por me ajudar tanto na rotina da vida. Gratidão por tudo, e todo meu amor e carinho por vocês.

A minha dupla e amiga Ana Clara por sempre estar ao meu lado, nossos caminhos se cruzaram de surpresa e foi a melhor coisa da faculdade, estarei sempre aqui, você foi uma parte muito importante nessa caminhada e agora ficará na vida.

A minha amiga Ana Laura por todo companheirismo, cumplicidade e por sempre me ouvir sobre todos os assuntos possíveis, sem você esses últimos anos não seriam os mesmos, estarei sempre esperando a sua visita.

A minha amiga Raiane por estar sempre ao meu lado, e ser uma das melhores pessoas que me acompanhou esses anos, todo meu amor e carinho por você Rai.

Aos meus melhores amigos Giovana e Vitor por ter tornado a caminhada mais leve com muito companheirismo, memórias, cumplicidade e amor. Em especial a Gi por sempre me ouvir, acalmar, aconselhar e por ser a melhor amiga que eu poderia ter.

Aos meus amigos do “Almoço em Família” Laura, Emanuelle, Suellen, Julianderson, Filipe, Ana Laura, Yasmim, por toda caminhada percorrida juntos e pelo carinho.

A minha orientadora Ana Paula por todo carinho, dedicação e paciência que teve comigo para a realização deste trabalho. Você me mostrou um lado da odontopediatria incrível que é o SAD, e este sempre estará em meu coração. Gratidão por tudo.

SUMÁRIO

Resumo.....6

Introdução 8

Materiais e Métodos 10

Resultados 14

Discussão 18

Conclusão 21

Referências bibliográficas 22

Resumo

A terapia pulpar vital (TPV) com biomateriais naturais, como própolis brasileira, é foco de estudos devido às suas propriedades regenerativas e antimicrobianas. O presente estudo buscou avaliar o efeito antibacteriano e de proliferação celular de células pulpares após contato direto com as própolis verde brasileira (PVB) e própolis marrom brasileira (PMB). Para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), a PVB e PMB foram definidas contra um painel de nove bactérias comumente envolvidas em infecção endodôntica primária. As cepas foram incubadas em uma câmara anaeróbica por 72h. Foram aplicadas as diferentes concentrações dos materiais: PMB, PVB, controle negativo (DMSO de 5%) e controle positivo (metronidazol). Após 24h de contato, as soluções foram diluídas para indicar a viabilidade dos microrganismos. Já para capacidade de migração celular, utilizou-se o ensaio Wound Healing. As células foram semeadas em placas de 48 poços em concentração de 30.000 células/poço, 24 horas após, foi realizada uma ferida mecânica linear com a ponta de uma micropipeta de 1ml. As células foram expostas às diferentes soluções de acordo com os grupos experimentais por 24 e 48 horas, armazenadas em uma incubadora a 37°C. Valores de CIM ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$ foram encontrados para diferentes bactérias: *F. nucleatum* IC (25 $\mu\text{g/ml}$), *P. micra* IC (1,56 $\mu\text{g/ml}$) para PVB e *P. micra* IC (1,56 $\mu\text{g/ml}$), *P. intermedia* IC (50 $\mu\text{g/ml}$), *P. gingivalis* IC (12,5 $\mu\text{g/ml}$), *P. endodontalis* ATCC (100 $\mu\text{g/ml}$), *P. nigrescens* ATCC (25 $\mu\text{g/ml}$), *P. melaninogenica* ATCC (3,12 $\mu\text{g/ml}$) para PMB. A eficácia bactericida, pode ser vista com base nos valores de CBM concomitantes em *P. micra* IC (1,56 / 1,56 $\mu\text{g/ml}$) para PVB e *F. nucleatum* IC (50 / 50 $\mu\text{g/ml}$) para PMB. Ambas apresentaram estimulação da migração celular em relação às células pulpares. Os resultados sugerem que as própolis têm potencial antibacteriano, com destaque para a PMB.

Palavras-chave: Própolis, Atividade bactericida, Ensaio de Migração Celular.

Abstract

Vital pulp therapy (VPT) with natural biomaterials, such as Brazilian propolis, is the focus of studies due to its regenerative and antimicrobial properties. The present study aimed to evaluate the antibacterial and cell proliferation effects of pulp cells after direct contact with Brazilian green propolis (BGP) and Brazilian brown propolis (BBP). To evaluate the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), BGP and BBP were evaluated against a panel of nine bacteria commonly involved in primary endodontic infection. The strains were incubated in an anaerobic chamber for 72h. Different concentrations of the materials were applied (BGP and BBP), negative control (5% DMSO) and positive control (metronidazole). After 24h of contact, the solutions were diluted to indicate the viability of the microorganisms. The Wound Healing assay was used to assess cell migration capacity. The cells were seeded in 48-well plates at a concentration of 30,000 cells/well. 24 hours later, a linear mechanical wound was performed using a micropipette tip of 1 ml. The cells were exposed to the different solutions according to the experimental groups for 24 and 48 hours, stored in an incubator at 37°C. MIC values ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$ were found for different bacteria: *F. nucleatum* IC (25 $\mu\text{g/ml}$), *P. micra* IC (1.56 $\mu\text{g/ml}$) for PVB and *P. micra* IC (1.56 $\mu\text{g/ml}$), *P. intermedia* IC (50 $\mu\text{g/ml}$), *P. gingivalis* IC (12.5 $\mu\text{g/ml}$), *P. endodontalis* ATCC (100 $\mu\text{g/ml}$), *P. cens* ATCC (25 $\mu\text{g/ml}$), *P. melaninogenica* ATCC (3.12 $\mu\text{g/ml}$) for PMB. The bactericidal efficacy was observed based on the concomitant MBC values in *P. micra* IC (1.56 / 1.56 $\mu\text{g/ml}$) for PVB and *F. nucleatum* IC (50 / 50 $\mu\text{g/ml}$) for PMB. Both propolis showed stimulation of cell migration on to pulp cells.

Key-words: Propolis, Bactericidal Activity, Cell Migration Assays

Introdução

O tratamento pulpar vital (TPV) é indicado quando a polpa está exposta devido a um trauma ou uma atividade profunda de cárie, limitando ao tratamento de dentes imaturos com formação radicular incompleta ou decíduos (Duncan HF, 2022). O TPV é uma abordagem minimamente invasiva permitindo uma função normal do dente, manutenção da sensibilidade e propriocepção, aumentando a sua durabilidade, e mantendo a sua função. Tal abordagem é essencial, principalmente em dentes jovens ou decíduos da Silva et al., 2024). O tratamento nestes dentes possui excelentes taxas de sucesso, quando executado da maneira adequada. No entanto, para obter uma eficácia ainda maior, é essencial selecionar a técnica adequada e os materiais certos para que ocorra o procedimento da melhor forma possível (da Silva et al., 2024).

A manutenção dos dentes decíduos na cavidade bucal, evitando sua perda precoce, é de grande importância. Uma vez que a perda precoce pode levar a uma perda importante de espaço, prejudicando o irrompimento adequado dos dentes permanentes subjacentes (Kratunova & Silva, 2018).). Desta forma, a decisão pela extração de um dente decíduo deve ser cuidadosamente analisada, levando-se em consideração a idade da criança e o desenvolvimento da sua oclusão, sempre priorizando a realização de intervenções minimamente invasivas, quando corretamente indicadas. Nos casos de dentes imaturos, a manutenção da vitalidade pulpar é essencial pois, se a vitalidade for perdida, o desenvolvimento radicular é interrompido, levando a um comprimento dentário desfavorável.(Kratunova & Silva, 2018).

Os recursos medicinais naturais são no geral a riqueza natural de um país, são substâncias que são encontradas na natureza que foram produzidas especialmente por plantas ou animais (Ziemska et al., 2019). Atualmente, existem cada vez mais produtos químicos de origem sintética, e por este motivo há necessidade de buscar condutas não farmacológicas, explorando fontes naturais de cura, que melhor se adaptem ao corpo humano. A maior vantagem destes recursos naturais é a baixa manifestação de efeitos colaterais negativos no organismo (Ziemska et al., 2019). Neste estudo, iremos dar atenção para a própolis, especialmente a brasileiro verde e marrom que são produzidos por abelhas.

A própolis brasileira vem ganhando muita visibilidade pois apresenta diversas propriedades farmacológicas de interesse clínico principalmente para uso odontológico, entre essas funções estão efeito anticárie (De Castro et al., 2019), atividade antiviral (Da Silva et al., 2021), antifúngica (Deegan et al., 2019), antioxidante (Song et al., 2022), anti-inflamatória (Alkhalidi H, 2021), citotóxica contra linhagens celulares tumorais (Li L et al., 2021), atividade antibacteriana e bioestimuladora de células pulpares (Silva et al, 2022). É válido lembrar que a própolis é principiada de substâncias gomosas, balsâmicas e resinosas, adquirida pelas abelhas, de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas irão acrescentar secreções salivares, cera e pólen. (HEIMBACH et al., 2016). Apesar dos resultados animadores, os dados a respeito da atuação destes componentes naturais sobre as células pulpares ou sobre as bactérias envolvidas em infecções odontogênicas são escassos.

Diante do exposto, o presente estudo teve como foco a avaliação do efeito antibacteriano e impacto direto em células pulpares humanas da própolis verde brasileira (PVB) e própolis marrom brasileira (PMB). Este é um estudo inicial que pode trazer resultados que serão importantes para o comando de novos estudos em animais e clínicos visando desenvolver um novo material para reparo pulpar, que seja mais natural e biocompatível com o tecido pulpar, além de um custo menor para a população.

Materiais e métodos

Extrato hidroalcoólico de própolis

As amostras de PVB foram fornecidas pela Apis Flora Industrial e Comercial Ltda (Ribeirão Preto/SP/Brasil) em maio de 2018, número de lote 65400918 (Berretta A. et al, 2013). Amostras de PMB de *Apis mellifera* e resina de *Araucária* foram coletadas em União da Vitória (Estado do Paraná, Brasil; 26°13'48" S, 51°5'9" W) (Santos M. et al, 2021); após a remoção das impurezas, esses produtos resinosos foram armazenados em um frasco âmbar e mantidos a -20°C em um freezer. Para preparar os extratos de própolis, aproximadamente 350,0 g de PVB foram macerados por 24 horas com 4 L de uma mistura contendo etanol-água (7:3, v/v) à temperatura ambiente. O extrato obtido foi filtrado, concentrado a vácuo e liofilizado para obter o extrato hidroalcoólico bruto (de Souza S.T. et al, 2021). Cinquenta gramas de PMB foram extraídos com seis litros de uma solução de etanol-água 7:3 (v/v) por 24 h por maceração, produzindo 20,0 g de extrato hidroalcoólico bruto de BBP após remoção do solvente sob vácuo (Trusheva B, 2007).

Avaliação bacteriana

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

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de ambos os tipos de própolis foram determinadas contra um painel de nove bactérias envolvidas na infecção endodôntica primária: cinco cepas de patógenos endodônticos anaeróbicos da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA) e quatro isolados clínicos (IC), respectivamente: *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845), *Actinomyces viscosus* (ATCC 43146), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Veillonella parvula* (ATCC 17745), *Porphyromonas gingivalis* (IC), *Prevotella intermedia* (IC), *Parvimonas micra* (IC), *Fusobacterium nucleatum* (IC). Todas as cepas foram mantidas no Laboratório de Testes Antimicrobianos (LTA) da Universidade Federal de Uberlândia a -20°C, em caldo Schaedler suplementado com 5% de sangue de

cavalo desfibrinado e solução de glicerol a 80%. Os isolados clínicos de doenças endodônticas selecionados para o estudo de ensaios clínicos anteriores. A CIM foi determinada em triplicata em placas de 96 poços, usando o método de microdiluição, no qual 12 concentrações de PMB e PVB, variando de 400,0 a 0,195 µg/ mL foram dispostas da esquerda para a direita com uma gradual diminuição nas concentrações dos materiais, então definida a menor concentração na inibição da atividade dos microrganismos. O meio de cultura usado para cepas relacionadas a infecções endodônticas foi o ágar Schaedler (Difco, Kansas City, MO, EUA), suplementado com hemina (5 µg/ mL, Sigma Aldrich, San Louis, Missouri, EUA), menadiona (1 µg/ mL) e sangue de cavalo (5%), conforme recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2007). As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (1 mg/ mL, DMSO, LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) e diluídas no caldo desejado. O grupo controle negativo foi DMSO 5% (v/v) enquanto o controle positivo foi metronidazol 0,0115 µg/mL a 5,9 µg/ mL (Sigma). As microplacas foram incubadas em uma câmara anaeróbica (Don Whitley Scientific, Bradford, Reino Unido) por 72 horas sob uma atmosfera adequada contendo 5-10% de H₂, 10% de CO₂ e 80-85% de N₂. Foram adicionados aos poços das microplacas 0,02% de resazurina (Sigma) diluída em solução aquosa para indicar a viabilidade dos microrganismos. A indicação de atividade bacteriana ou ausência de atividade foi dada pela observação das cores rosa e azul, respectivamente (Rampersad S, 2012). Para MBC, uma alíquota de inóculo (10 µl) foi removida de cada poço, antes da adição de resazurina que foi semeada em meio de cultura apropriado. Um CBM foi determinado como a menor concentração da amostra onde bactérias não se desenvolverão (Pereira M. et al, 2020).

Avaliação das células da polpa dentária

Obtenção de células pulpaes de dentes permanentes

O tecido pulpar foi obtido de um terceiro molar hígido com prévia indicação de extração pela técnica de explante tecidual, na qual o tecido pulpar é isolado por meio de remoção mecânica com auxílio de curetas e limas endodônticas (Turroni et

al,2021) . As células foram expandidas em meio de cultura (DMEM (Dulbecco's Modified eagle Medium - LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 10000 U/MI - LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). Elas foram utilizadas entre a sexta e a nona passagens garantindo características fenotípicas das células-tronco da polpa dentária (Klein-Junior C. et al, 2021).

Viabilidade celular

As três concentrações de própolis (5, 10, 50 µg/ml) foram selecionadas por serem consideradas seguras para aplicação em células pulpares após realização de estudo piloto. As soluções dos respectivos grupos testados: DMSO 0,5%, Peróxido de carbamida 0,018% (PC), TNF- α 10 µg/ml, e DMEM (controle) foram testadas. As células pulpares foram semeadas em placas de 96 compartimentos (10.000 células/poço). Após 24h, as soluções foram aplicadas e o contato com as células foi mantido por 24 h. com exceção do PC 0,018%, que foi mantido apenas por 30 minutos. O meio de cultura foi aspirado e substituído por 90 µl de DMEM sem SFB e 10 µl de MTT (5 mg/ml em PBS). Após 4 h de incubação a 5% de CO₂ e 37°C, o sobrenadante foi removido e 100 µl de DMSO foi utilizado para diluição dos cristais. A densidade ótica das soluções foi medida utilizando espectrofotômetro GLOMAX em filtro 560 nm.

Ensaio de migração celular

A capacidade de migração celular foi avaliada pelo ensaio Wound Healing (Basso F. et al, 2016) . Elas foram semeadas em placas de 48 poços a uma concentração de 30.000 células/poço. Vinte e quatro horas após a semeadura das células, uma ferida mecânica linear foi criada com a ponta de uma micropipeta de 1ml. As células foram expostas às diferentes soluções de acordo com os grupos experimentais por 24 e 48 horas. As culturas foram mantidas em uma incubadora a 37°C. Três fotografias de diferentes regiões da ferida foram tiradas em cada amostra usando o microscópio invertido EVOS fl (Advanced microscopy Group (AMG) em ampliação de 4x. A migração celular foi avaliada medindo a área da ferida de cada amostra usando o software Image J (US National Institutes of Health, Bethesda,

Maryland, EUA). Quatro réplicas foram avaliadas em cada grupo, e os resultados expressos em μm^2 .

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados no software Microsoft Excel versão 2019 e posteriormente analisados no programa JAMOV, versão 1.6.23 e SPSS, versão 22.0. Foram utilizados o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a análise paramétrica usando os testes One Way ANOVA, complementados por Tukey com nível de significância de 5%.

Resultados

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Índice de Seletividade (IS)

Em relação à CIM e à CBM (Tabela 1), os valores de CIM ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$ foram identificados para *F. nucleatum* IC (25 $\mu\text{g/ml}$), *P. micra* IC (1,56 $\mu\text{g/ml}$) para . E *P. micra* IC (1,56 $\mu\text{g/ml}$), *P. intermedia* IC (50 $\mu\text{g/ml}$), *P. gingivalis* IC (12,5 $\mu\text{g/ml}$), *P. endodontalis* ATCC (100 $\mu\text{g/ml}$), *P. nigrescens* ATCC (25 $\mu\text{g/ml}$), *P. melaninogenica* ATCC (3,12 $\mu\text{g/ml}$) para BBP. Além disso, o MIC demonstrou atividade bactericida eficaz com base em valores de MBC concomitantes em *P. micra* IC (1,56 / 1,56 $\mu\text{g /ml}$) para e *F. nucleatum* IC (50 / 50 $\mu\text{g /ml}$) para BBP. No entanto, um efeito bacteriostático foi observado em valores de MIC menores que MBC em *P. micra* IC (1,56 / 12,5 $\mu\text{g /ml}$), *P. intermedia* IC (50 / 100 $\mu\text{g /ml}$), *P. gingivalis* IC (12,5 / 50 $\mu\text{g /ml}$), *P. endodontalis* ATCC (100 / ≥ 400 $\mu\text{g /ml}$), *P. nigrescens* ATCC (25 / 50/ $\mu\text{g /ml}$), *P. melaninogenica* ATCC (3,12 / 6,25 $\mu\text{g /ml}$) para BBP. O índice de seletividade (Tabela 1) foi realizado com base nos resultados da concentração que reduziu 50% da viabilidade celular (IC₅₀), sendo 454,55 $\mu\text{g/ml}$ e 646,83 $\mu\text{g/ml}$ para BBP e, respectivamente. Níveis relevantes de índice de seletividade foram encontrados (IS ≥ 10) em *P. micra* IC (414,6) para e em *F. nucleatum* IC (18,1) *P. micra* IC (291,3), *P. gingivalis* IC (36,3), *P. nigrescens* ATCC (18,1), *P. melaninogenica* ATCC (145,6) para BBP.

Tabela 1: Tabela representando painel de nove patógenos envolvidos na infecção endodôntica primária e suas respectivas concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínimo (CBM) e índice de seletividade para as própolis marrom e verde brasileiras.

BACTÉRIA	PVB	PMB	IS (PVB)	IS (PMB)
PREVOTELLA MELANINOGENICA ATCC 25845	200/200	3,12/6,25	3,2	145,6
ACTINOMYCES VISCOSUS ATCC 43146	>400/>400	>400/>400	1,6	1,1
PREVOTELLA NIGRESCENS ATCC 33563	200/200	25/50	3,2	18,1
PORPHYROMONAS ENDODONTALIS ATCC 35406	>400/>400	100/>400	1,6	4,5
VEILLONELLA PARVULA ATCC 17745	>400/>400	>400/>400	1,6	1,1
PORPHYROMONAS GINGIVALIS (ISOLADO CLÍNICO)	200/>400	12,5/50	3,2	36,3
PREVOTELLA INTERMEDIA (ISOLADO CLÍNICO)	200/400	50/100	3,2	9,0
PARVIMONAS MICRA (ISOLADO CLÍNICO)	1,56/1,56	1,56/12,5	414,6	291,3
FUSOBACTERIUM NUCLEATUM (ISOLADO CLÍNICO)	400/400	25/25	1,6	18,1

Viabilidade celular

Os resultados de MTT podem ser observados na Figura 1. Os valores de viabilidade observados para ambas as propolis, em todas as concentrações testadas (5, 10, e 50 µg/mL) não se diferiram de forma estatisticamente significativa do grupo DMEM (controle positivo). Entretanto, as células demonstraram maior viabilidade, com diferença estatística, em relação ao grupo controle negativo (peróxido de carbamida).

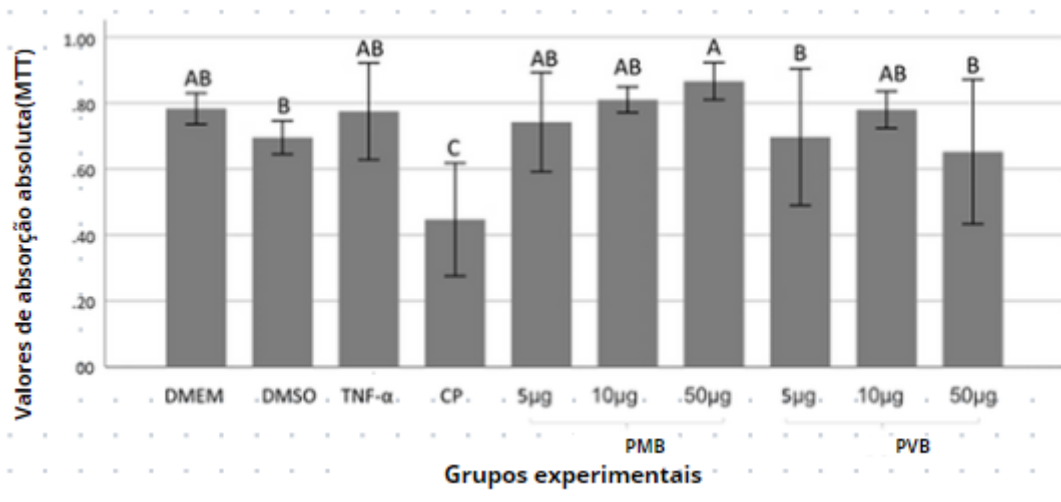


Figura 1: Valores absolutos de absorvância para viabilidade celular (teste de MTT). Letras diferentes demonstram valores estatisticamente diferentes ($p < 0,01$). Teste one-way ANOVA complementado por Tukey.

Ensaio de migração celular

Em relação ao resultado do teste qualitativo de migração celular (Figura 1), foi demonstrado fechamento progressivo das bordas da ferida ao comparar o imediato, 24 e 48 horas após sua realização para a maioria dos grupos estudados, coincidindo com seus respectivos resultados quantitativos (Figura 2). Houve variação de 2428 μm^2 (imediato) a 1557 μm^2 (24h) a 428 μm^2 (48h), 1457 μm^2 (BBP 24 h) a 592 μm^2 (BBP 48h), 1278 μm^2 (DMEM 24h) a 789 μm^2 (DMEM 48h). O mesmo não foi observado no grupo PC, onde foi possível observar uma alta mudança na morfologia e disposição celular, revelando regiões amplamente irregulares e acelularizadas variando de 2038 μm^2 a 1461 μm^2 em 24 e 48 horas.

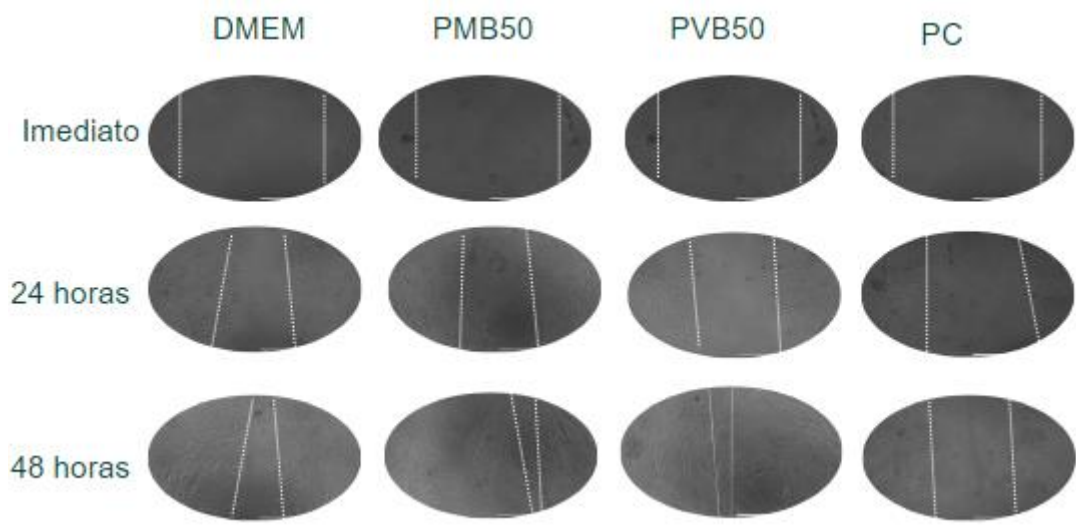


Figura 2: Teste de Wound Healing: imediato, 24 e 48 horas (Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão 4x)

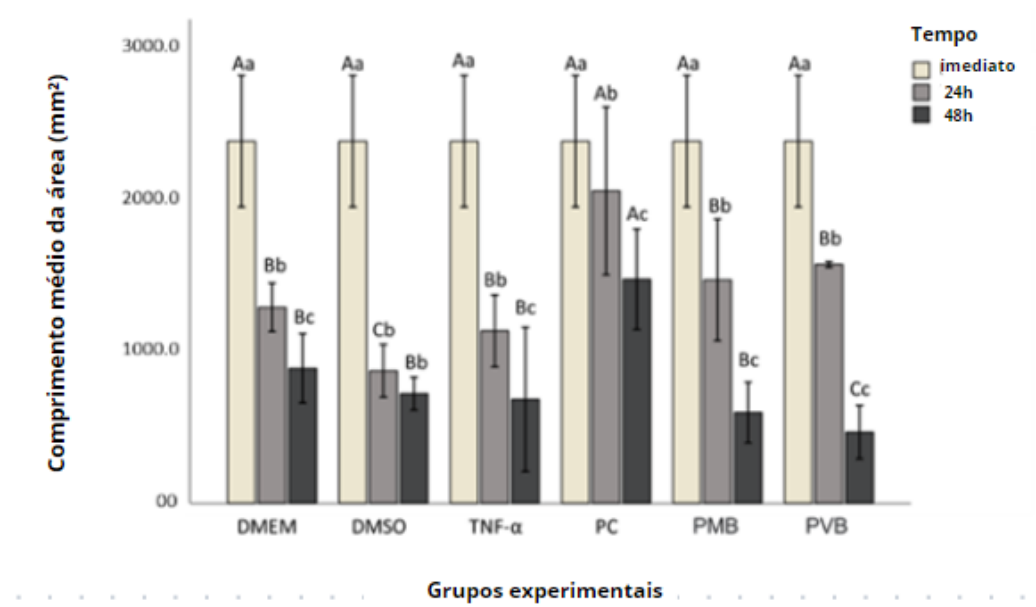


Figura 3: Gráfico representando valores absolutos médios do comprimento da área da ferida em μm^2 no ensaio de Cicatrização de Feridas de grupos experimentais. Letras diferentes mostram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), ANOVA unidirecional, suplementado por Tukey.

Discussão

A odontologia minimamente invasiva tem como objetivo a preservação das estruturas dentárias sadias e da vitalidade pulpar. Neste contexto, as terapias pulpares vitais têm apresentado uma alta taxa de sucesso quando adequadamente bem indicadas e, conduzidas com técnicas adequadas e materiais odontológicos seguros e eficazes (Leong D, 2021). Concomitantemente, a grande diversidade de recursos naturais brasileiros tem facilitado o estudo e a introdução da medicina natural entre a população (Berretta A et al, 2013).

O presente estudo verificou a atividade antibacteriana da própolis verde e marrom brasileira. Demonstramos a atividade bacteriostática e bactericida de PVB e PMB contra patógenos endodônticos como *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. micra* e *F. nucleatum* em concentrações $\leq 100 \mu\text{g/ml}$ de PMB. Este achado corrobora com o de outro estudo com proposta semelhante que avaliou o impacto antimicrobiano do extrato bruto de própolis vermelha brasileira contra o mesmo painel dos nove patógenos endodônticos examinados aqui, assim como no presente estudo, a propolis vermelha brasileira exibiu valores de MIC e MBC menores que $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ contra *P. melaninogenica*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. micra* e *F. nucleatum* (Oliveira et al., 2021).

Além disso, outro estudo, que avaliou a atividade antibacteriana de um extrato aquoso de PVB, relatou que a propolis exibiu um CIM de 55 mg/mL contra os patógenos *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *F. nucleatum* e além de uma CBM de 27,5 mg/mL para *P. micra* e *P. intermedia* (Sa et al., 2022). No nosso estudo, a PMB e PVB apresentaram valores de CIM e CBM menores quando comparados, na faixa de 1,56– a 400 $\mu\text{g/mL}$. Essa diferença de assimetria nos valores e concentrações pode ser atribuída à apresentação do material, que no estudo anterior em questão foi utilizado como extrato aquoso, enquanto que neste estudo presente foi utilizado um extrato bruto hidroalcoólico. Independentemente da apresentação da própolis, a atividade antibacteriana de ambos os materiais foi assegurada. O mecanismo da atividade antimicrobiana do própolis ainda precisa ser mais elucidado, estudos propõem que seus constituintes bioativos, como flavonoides e ácido fenólico, atuam inibindo a síntese de

membranas celulares, além de interferir na expressão de genes bacterianos (Parolia et al., 2021).

Este estudo, que utilizou PMB de origem Araucária encontrada no sudeste do Brasil, demonstrou claramente que PMB em uma 100 µg/mL não exibe nenhuma citotoxicidade contra linhagens celulares renais normais mesmo após 48 h de contato³¹. Outro estudo examinou o efeito da exposição de uma cultura simultânea de ceratinócitos gengivais imortalizados por telomerase e *P. gigivalis* a 1,25 mg/mL de BBP por 4 h. Em contraste com os achados deste estudo, o estudo acima relatou uma redução de 20% em bactérias viáveis e uma redução de 40% na vitalidade das células de queratinócitos³². Notavelmente, outro estudo, que apresentou uma proposta semelhante à do presente estudo, comparou a aplicação direta de própolis vermelha brasileira e diluições de MTA. O estudo acima mostrou que a própolis vermelha de uma concentração de 10 µg/mL, não apenas manteve, mas também estimulou positivamente 34,6% da viabilidade celular em relação ao grupo controle DMEM¹³. Além disso, o desequilíbrio ácido-base do pH intra e extracelular pode afetar negativamente o metabolismo, a função, a proliferação e o reparo celular³³. Portanto, as condições seguidas neste estudo ajudaram a manter os níveis de pH dentro da faixa adequada para a homeostase, sem risco de danos celulares.

Os extratos de própolis verde e marrom brasileiros estudados aqui demonstraram alta biocompatibilidade com células de polpa humana, qualificando-os como compostos promissores. Foi observado que, independentemente da concentração (5, 10 ou 50 µg/mL), os dois tipos de própolis mantiveram a vitalidade celular em níveis semelhantes aos observados no grupo controle DMEM. Contrariamente aos comportamentos de PMB e PVB, o grupo PC apresentou uma diminuição acentuada no número de células metabolicamente ativas.

Um estudo que utilizou PMB de origem Araucária encontrada no sudeste do Brasil, demonstrou claramente que, na concentração de 100 µg/mL, o composto não apresenta nenhuma citotoxicidade contra linhagens celulares renais normais mesmo após 48 h de contato (Ribeiro et al., 2021). Outro estudo, que apresentou uma proposta semelhante ao nosso, comparou a aplicação direta de própolis vermelha brasileira e diluições de MTA. O estudo mostrou que a própolis vermelha em uma concentração de 10 µg/mL, não apenas manteve, mas também estimulou

positivamente (aumento de 34,6%) a viabilidade celular em relação ao grupo controle DMEM (Oliveira et al., 2021).

Este estudo apresenta as limitações associadas a um estudo de laboratório in vitro. Portanto, estudos in vitro e in vivo aprofundados são necessários para determinar o potencial deste composto como um material odontológico promissor em terapias pulpares vitais.

Conclusão

A PVB e a PMB, ambas têm potencial antibacteriano, com destaque para a PMB. E as duas apresentaram baixa citotoxicidade e estimulação da migração celular em relação às células pulpare dos dentes humanos.

Referências:

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.

Berretta A, de Castro P, Cavalheiro A, Fortes V, Bom V, Nascimento A, Marquete-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.

Berretta A, de Castro P, Cavalheiro A, Fortes V, Bom V, Nascimento A, Marquete-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.

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

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.

DA SILVA, Alexandre Martins; CHAVES, Andréa Gomes; SOUSA, Samantha Jéssica Lopes. ALTERNATIVAS DE MATERIAIS PARA PULPOTOMIA E PULPECTOMIA EM DENTES DECÍDUOS (ODONTOLOGIA). **Repositório Institucional**, v. 2, n. 2, 2024.

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.

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.

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

Duncan HF. Present status and future directions-Vital pulp treatment and pulp preservation strategies. *Int Endod J.* 2022 May;55 Suppl 3(Suppl 3):497-511. doi: 10.1111/iej.13688. Epub 2022 Feb 3. PMID: 35080024; PMCID: PMC9306596

Kantrong N, Kumtawee J, Damrongrungruang T, Puasiri S, Makeudom A, Krisanaprakornkit S, Chailertvanitkul P. An in vitro anti-inflammatory effect of Thai propolis in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci.* 2023 Jun 5;31:e20230006. doi: 10.1590/1678-7757-2023-0006. PMID: 37283330; PMCID: PMC10247283.

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.

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.

Kratunova E, Silva D. Pulp therapy for primary and immature permanent teeth: an overview. *Gen Dent.* 2018 Nov-Dec;66(6):30-38. PMID: 30444704.

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

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.

Neiva KG, Catalfamo DL, Holliday LS, Wallet SM, Pileggi R. Propolis decreases lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in pulp cells and osteoclasts. *Dent Traumatol.* 2014 Oct;30(5):362-367. doi: 10.1111/edt.12096. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24502251.

Oliveira 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

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.

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.

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.

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>

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

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

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.

Tratamento pulpar vital em dentes com sintomatologia de pulpite irreversível Oliveira João*, Lima Inês*, Figueiredo Joana*, Gomes Joana*, Sacramento, José Manuel**, Caetano, Luís**, Barbosa, Catarina

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.

Turrioni A, Oliveira Neto N, Xu Y, Morse L, Costa C, Battaglini 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>

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>

Ziemska J, Szynal T, Mazańska M, Solecka J. Natural medicinal resources and their therapeutic applications. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2019;70(4):407-413. doi: 10.32394/rpzh/2019.0093. PMID: 31961104.