



Manutenção da viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em extratos e formulações de própolis

Ana Regina Casaroto¹, Ana Maria Sell², Juliana Yuri Nagata³, Elaine Vasconcelos Brunetta³, Selma Lucy Franco⁴ e Mirian Marubayashi Hidalgo^{3*}

¹Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. ³Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ⁴Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: mmhidalgo@uem.br

RESUMO. Neste estudo comparou-se a viabilidade das células mononucleares de sangue periférico (PBMcs) humano quando mantidas em diferentes extratos e formulações de própolis. As PBMcs (10^6 cels mL⁻¹), provenientes de doadores saudáveis (n=5), foram estocadas a 20°C nas diferentes soluções de própolis, assim como em solução salina balanceada de Hank's (HBSS), utilizada como controle do experimento. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão com azul de Tripan. Quando incubadas por 1h, apenas dois extratos, denominados A70D e D70D, apresentaram desempenho satisfatório na manutenção da viabilidade celular, semelhante ($p > 0,05$) ao controle HBSS e diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais formulações. A70D e D70D foram então testados em cinco diluições em propilenoglicol, ao longo de 24h, com análise nos tempos 0, 30 min., 1, 3, 6, 10 e 24h. As frações mais concentradas apresentaram pior desempenho ($p < 0,05$) em relação aos seus extratos originais que mantiveram viabilidade próxima a 80% ao longo de 24h. A redução da viabilidade proporcional ao aumento da concentração das frações foi observada. Os resultados sugerem que soluções de própolis, em concentrações adequadas, podem ser utilizadas nos estudos futuros sobre alternativas aos meios de conservação de dentes avulsos rotineiramente utilizados na prática odontológica.

Palavras-chave: própolis, viabilidade celular, avulsão dentária, reimplante dentário.

Maintenance of human peripheral blood mononuclear cell viability in propolis extracts and formulations

ABSTRACT. In this study a comparison was made of human mononuclear cell (PBMcs) viability, when cells were kept in different propolis extracts and formulations. PBMcs (10^6 cell mL⁻¹), obtained from healthy donors (n=5), were incubated at 20°C in the different propolis solutions, as well as in Hank's balanced salt solution (HBSS), used as experimental control. The cell viability was analyzed by Trypan blue exclusion assay. When incubated for 1h, only two extracts, denominated A70D and D70D, showed appropriate results for maintaining cell viability. A70D and D70D showed better viability ($p < 0.05$) than other formulations and no difference ($p > 0.05$) from the HBSS control. A70D and D70D were tested in five dilutions in propylene glycol, over 24h, with analysis at 0, 30 minutes, 1, 3, 6, 10 and 24h. The most concentrated fractions showed the worst performance ($p < 0.05$) in comparison with their original extracts, which remained close to 80% viability over 24h. Reduction in viability proportional to increase in concentration of formulations was observed. The results suggest that propolis solutions in appropriate concentrations may be used in future studies on alternatives to mediums routinely used in dental practice for storing avulsed teeth.

Keywords: propolis, cell viability, tooth avulsion, tooth replantation.

Introdução

A avulsão dentária é uma das possíveis consequências de um trauma que leva ao deslocamento total do dente para fora do seu alvéolo, podendo acometer múltiplos tecidos, como ligamento periodontal, osso alveolar, cemento, polpa dentária e gengiva (CONSOLARO, 2005). A incidência de

traumatismos na dentição permanente se situa entre um a 16% (MARINO et al., 2000), sendo os dentes anteriores os mais acometidos (LOH et al., 2006).

Acidentes automobilísticos e esportivos são as causas mais frequentes, e envolvem, principalmente, crianças na faixa etária entre sete a 11 anos (TROPE, 1995) e o gênero masculino (ANDERSSON et al., 2006; TROPE, 1995).

Se avulsionado, faz-se necessária a reposição do dente em seu alvéolo, o denominado reimplante dentário (COHEN; HARGREAVES, 2007). A imediata reposição, ainda no local do acidente, é a conduta ideal para a manutenção das células do ligamento periodontal, porém na maioria das vezes, isso não ocorre. A integridade dessas células é dependente do tempo extra-alveolar, do meio de estocagem do dente e da preservação da porção radicular, determinando o prognóstico de sucesso do reimplante dentário (ANDERSSON et al., 2006; COURTS et al., 1983; MARINO et al., 2000; RAPHAEL; GREGORY, 1990).

Estudos propõem vários meios de estocagem a fim de se manter a viabilidade celular do ligamento periodontal e proporcionar melhor prognóstico ao dente a ser reimplantado. Dentre eles estão o leite, a saliva e alguns meios de cultura de células (ANDERSSON et al., 2006; BLOMLÖF et al., 1981; COURTS et al., 1983; MELO et al., 2003; PETTIETTE et al., 1997; TROPE; FRIEDMAN, 1992). Pesquisas *in vitro* sugerem, ainda, o uso de formulações à base de própolis como meio alternativo, promissor para a manutenção dessas células em dentes avulsionados (AL-SHAHER et al., 2004; MARTIN; PILEGGI, 2004; ÖZAN et al., 2007).

A própolis é um produto natural de abelhas *Apis mellifera*, resultante de uma mistura de substâncias de origem vegetal (coletadas de botões de flores ou casca de árvore) e animal (substâncias do próprio organismo das abelhas). Este produto tem função no isolamento térmico, vedação e proteção da colmeia contra microrganismos (MARCUCCI, 1995; SONMEZ et al., 2005). Na sua composição química complexa são encontrados óleos voláteis (5-10%); ceras (30-40%); e, resinas, bálsamos e grãos de pólen que são ricas fontes em elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco (DOBROWOLSKI et al., 1991). Os polifenóis são os principais compostos orgânicos encontrados na própolis, representados, em especial, pelos flavonoides (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

De obtenção relativamente fácil, a própolis vem sendo usada, ao longo dos anos, na medicina popular, para diversas finalidades (KUJUMGIEV et al., 1999; SONMEZ et al., 2005). As propriedades farmacêuticas da própolis têm abordado efeito antibacteriano (CUSHNIE; LAMB, 2005; MARCUCCI et al., 2001), antifúngico (KUJUMGIEV et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2006), antiinflamatório (MANI et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2005), cicatrizante (PERRI DE CARVALHO et al., 1991), imunomodulador (CASTALDO; CAPASSO, 2002; DIMOV et al., 1992) e antioxidante (BORRELLI et al., 2002; JOHNSTON et al., 2005).

Diversos estudos na área odontológica têm avaliado a atividade biológica da própolis, principalmente no que se refere ao efeito cicatrizante (CESCHEL et al., 2002; SAMET et al., 2007), controle de placa bacteriana, prevenção de cárie (DUARTE et al., 2006; KOO et al., 2000; UZEL et al., 2005) e como medicação intracanal no tratamento endodôntico (VICTORINO et al., 2007). Além destas utilidades, a própolis também tem sido indicada como meio de conservação para dentes avulsionados (AL-SHAHER et al., 2004; MARTIN; PILEGGI, 2004; ÖZAN et al., 2007).

Diante da possibilidade da utilização da própolis como meio de estocagem alternativo para dentes avulsionados, o propósito deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de diferentes extratos e formulações de própolis sobre a viabilidade das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano, durante o período de tempo entre 0 e 24h.

Material e métodos

Obtenção e preparo da própolis

As amostras de própolis foram coletadas, no apiário da Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (UEM), das colmeias de abelhas *Apis mellifera*, circunscritas em uma reserva de eucaliptos e mata nativa. Os extratos foram obtidos no Laboratório de Farmacotécnica da UEM por turboextração em condições diferenciadas, utilizando-se água e álcool como líquidos extratores e duas concentrações de própolis, conforme técnica descrita por Franco e Bueno (1999). Tais extratos foram denominados de A60, D60, A70 e D70. Em seguida, a retirada parcial do álcool dos extratos originou A60D, D60D, A70D e D70D. Os melhores extratos foram incorporados em 17 formulações líquidas (F21 à F36) e as formulações A70D15, A70D30, A70D45, A70D60 e A70D75 e, D70D15, D70D30, D70D45, D70D60 e D70D75 resultaram da diluição seriada em propilenoglicol dos extratos A70D e D70D, respectivamente.

Obtenção das células mononucleares humanas (PBMCs)

Para obtenção de células mononucleares, 15 mL de sangue venoso de cinco doadores foram obtidos assepticamente em tubos contendo ACD (Becton Dickson). As células foram isoladas pelo método descrito por Böyum (1968) modificado. Os tubos com sangue foram centrifugados e a interface de leucócitos colhida. As PBMCs foram separadas por gradiente de densidade, utilizando-se Histopaque® (Sigma Chemical Co.) com densidade 1.076. A suspensão celular foi ajustada à concentração final de 10^7 células mL⁻¹.

Ensaio da viabilidade celular em diferentes formulações de própolis

Cinquenta microlitros da suspensão celular de PBMCs foram adicionados a 450 μ L das diferentes formulações e extratos de própolis a serem testados, de modo que a concentração final fosse de 10^6 células mL^{-1} . Depois de incubadas por tempos previamente determinados, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do corante azul de Tripán. A solução salina balanceada de Hank's (HBSS) foi utilizada como controle do experimento.

Pela natureza resinosa da própolis, foi utilizado o detergente Tween-20 para tornar o meio mais translúcido e facilitar a leitura ao microscópio óptico. Desse modo, ao completar-se o tempo de incubação, descartavam-se 30 μ L da suspensão celular da amostra teste e acrescentavam-se 30 μ L de Tween e, após homogeneização, a viabilidade celular era calculada. Em todos os ensaios, a viabilidade inicial das células foi determinada e as leituras realizadas ao microscópio óptico.

Inicialmente, a viabilidade das células PBMCs foi determinada para as formulações (F21 a F36) e os extratos A60, D60, A70, D70, A60D, A60D, D60D, A70D e D70D, após incubação por 1h a 20°C. Dos resultados obtidos, as amostras de melhor desempenho foram avaliadas por um período de 24h a 20°C, com contagem da viabilidade celular nos tempos de 30 min., 1, 3, 6, 10 e 24h. E, por último, de modo semelhante, as duas amostras mais representativas desse período de 24h foram testadas em cinco diluições em propilenoglicol grau farmacêutico, tendo como controle seu uso sem a própolis.

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram determinadas utilizando-se o Teste *t Student* ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Os resultados da viabilidade das PBMCs estocadas em diferentes extratos e formulações de própolis, no período de 1h à temperatura de 20°C, estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Média da viabilidade celular das PBMCs de cinco doadores voluntários mantidas em oito diferentes extratos de própolis, após incubação por 1h a 20°C.

Extratos de Própolis	Viabilidade (%)
A60	-
D60	-
A70	-
D70	-
A60D	11
D60D	20
A70D*	89
D70D*	91,5
HBSS	96,5

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais extratos. (-) Extrato turvo ao microscópio óptico.

Tabela 2. Média da viabilidade celular das PBMCs de cinco doadores voluntários mantidas em 17 diferentes formulações contendo própolis, após incubação por 1h a 20°C.

Formulações de Própolis	Viabilidade (%)
F21	8
F22	3
F23	2,5
F24	-
F25	5,5
F26	2
F27	11,5
F28	3
F29	4,5
F30	2
F31	4,5
F32	4,5
F33	17,5
F34	-
F35 _L	2
F35 _T	19,5
F36	3
HBSS*	96,5

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação a todas as formulações. (-) Formulação turva ao microscópio óptico.

Os extratos A60D e D60D e as formulações com a inicial F apresentaram baixa viabilidade celular, inferior a 20%. Extratos A60, A70, D60 e D70 e as formulações denominadas F24 e F34 mostraram-se demasiadamente turvos ao microscópio óptico, impossibilitando a avaliação da viabilidade celular. Apenas os extratos A70D e D70D demonstraram desempenho satisfatório na manutenção da viabilidade das PBMC, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) do controle HBSS (96,5%) e sim dos demais extratos e formulações ($p < 0,05$).

Como A70D e D70D, também foram capazes de manter a viabilidade celular ao longo do tempo de estocagem de 24h, apresentando-se adequados na manutenção dessa viabilidade, diluições desses extratos foram realizadas e a viabilidade novamente avaliada.

Os resultados da análise da viabilidade celular das PBMCs estocadas no extrato A70D e suas frações, durante o período de 24h a 20°C, estão reunidos na Figura 1.

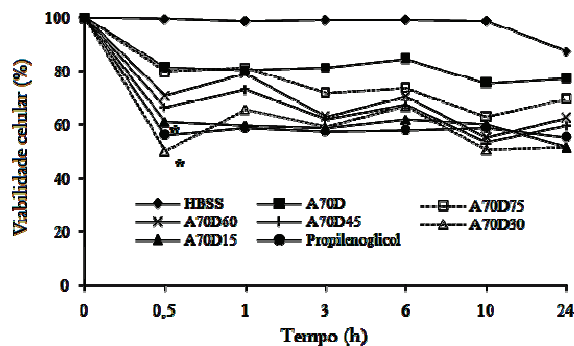


Figura 1. Média da porcentagem da viabilidade das PBMCs de cinco doadores voluntários estocadas no extrato de própolis A70D e suas diluições, durante um período de 24h a 20°C.

Os valores do desvio-padrão não ultrapassaram 19,63% ($\pm 13,04$). *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao extrato original A70D e ao controle HBSS.

A fração menos concentrada A70D75 manteve viabilidade próxima a 80% durante a primeira hora de incubação e, redução do número de células vivas nos próximos tempos, quando comparada ao seu extrato de origem A70D. Ambos, A70D e A70D75, se apresentaram estatisticamente melhores ($p < 0,05$) que o diluente propilenoglicol para todos os tempos. As frações mais concentradas, A70D30 e A70D15, foram as amostras de pior desempenho ($p < 0,05$) em relação ao extrato de origem, com redução de 60% da viabilidade ao término do período de estocagem e, semelhantes ao propilenoglicol.

A Figura 2 representa a viabilidade celular das PBMCs estocadas no extrato de própolis D70D e suas diluições, durante o período de 24h a 20°C.

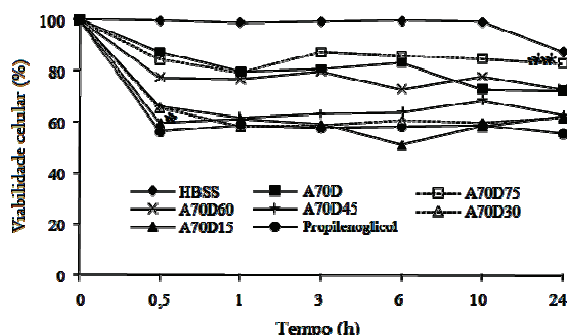


Figura 2. Média da porcentagem da viabilidade das PBMCs de cinco doadores voluntários estocadas no extrato de própolis D70D e suas diluições, durante um período de 24h a 20°C. Os valores do desvio-padrão não ultrapassaram 19,41% ($\pm 11,43$). *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao extrato original D70D e ao controle HBSS. **Diferença estatisticamente significativa em relação ao extrato original D70D.

A fração menos concentrada D70D75 e seu extrato de origem D70D apresentaram viabilidades semelhantes (80%, $p > 0,05$) na primeira hora de incubação. A partir do tempo 3h, a fração D70D75 apresentou maior número de células viáveis, sem diferir ($p > 0,05$) do controle HBSS no tempo de 24h e sim do extrato de origem D70D ($p < 0,05$). Ambos, D70D e D70D75, foram estatisticamente melhores ($p < 0,05$) que o propilenoglicol para todos os tempos. As formulações mais concentradas, D70D30 e D70D15, apresentaram baixa viabilidade celular, sem diferença estatística ($p > 0,05$) com o propilenoglicol ao longo de todo o período analisado.

Para ambos os extratos, A70D e D70D, houve redução da viabilidade celular proporcional ao aumento da concentração de suas frações.

A Figura 3 representa o resultado da viabilidade celular das PBMCs mantidas nos extratos e frações de melhor desempenho, A70D e D70D e D70D75, respectivamente, durante um período de 24h a 20°C.

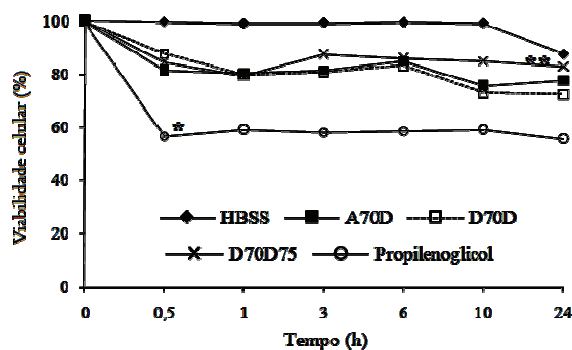


Figura 3. Média da porcentagem da viabilidade das PBMCs de cinco doadores voluntários estocadas nos extratos de própolis A70D e D70D e na fração D70D75 durante um período de 24h a 20°C. Os valores do desvio-padrão não ultrapassaram 15,56% ($\pm 12,92$). *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos extratos A70D e D70D e fração D70D75. **Diferença estatisticamente significativa em relação ao extrato original D70D.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre os extratos A70D e D70D, os quais mantiveram a viabilidade celular próxima a 80% durante todo o período. O controle HBSS manteve-se superior aos extratos ($p < 0,05$) durante todo o tempo, exceto em relação à fração D70D75 ($p > 0,05$) no tempo de 24h.

Estudos que abordam os melhores meios de estocagem para dentes avulsionados com manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal são de fundamental importância para aumentar o índice de sucesso de um replante dentário, sem ocorrência de anquilose alvéolo-dentária e posterior reabsorção radicular por substituição (HUANG et al., 1996). Neste estudo sobre a eficácia da própolis como possível alternativa de meio de estocagem para dentes avulsionados, pela avaliação da citotoxicidade dos diferentes extratos e formulações, as PBMCs foram as células de escolha por sua facilidade de obtenção e manuseio quando comparadas às células do ligamento periodontal.

O HBSS foi utilizado neste estudo como controle do experimento por ser um meio desenvolvido especialmente para cultura de células, apresentando osmolaridade e pH ideais. HBSS proporciona condições de proliferação celular de segmentos vitais do ligamento para recobrir partes desnudas da superfície radicular ou que possuam ligamento necrótico (SOARES; GOLDBERG, 2001). Desabona sua indisponibilidade nos consultórios dentários e menos ainda no local do acidente (MELO et al., 2003).

Melo et al. (2003), analisando diferentes meios de estocagem para dentes avulsionados, notaram que a água destilada apresentou o resultado mais insatisfatório, pois em 30 min. mantinha apenas 14% das células viáveis. A solução fisiológica demonstrou

viabilidade superior apenas à da água. A saliva, embora com pH favorável à proliferação das células, em 10 e 24h mantinha 54 e 38% das células vivas, respectivamente. Assim, de todos os meios testados pelos autores, o leite ultrapasteurizado integral foi o melhor para estocagem de dentes avulsionados, mantendo uma viabilidade celular de aproximadamente 97% em 10h e, similar ao do meio de cultura McCoy.

Além desses meios amplamente estudados, acredita-se que a própolis por apresentar propriedades antibacteriana e antiinflamatória seja um meio promissor de estocagem para dentes avulsionados (AL-SHAHER et al., 2004; MARTIN; PILEGGI, 2004) quando apresentada em extratos e concentrações adequados não-citotóxicos para as células. A própolis contém os compostos orgânicos flavonoides como os responsáveis por suas propriedades farmacêuticas como efeitos antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, cicatrizante, imunomodulador e antioxidante (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Esses compostos também são conhecidos por ajudarem na contenção de hemorragias do tecido do ligamento periodontal e estimularem enzimas fortificantes das paredes dos vasos sanguíneos no periodonto (AL-SHAHER et al., 2004). Como agente antiinflamatório, a própolis tem mostrado inibir a síntese de prostaglandinas, ajudar o sistema imune na atividade fagocítica, estimular a imunidade celular e aumentar os efeitos cicatrizantes no tecido epitelial. Além disso, contém elementos tais como ferro e zinco os quais são importantes para a síntese de colágeno (MARCUCCI, 1995). Tais propriedades conduzem para a hipótese da própolis favorecer a cicatrização do ligamento periodontal de um dente reimplantado e consequentemente para a sua escolha como meio alternativo na manutenção de dentes avulsionados.

O presente trabalho foi desenvolvido em conjunto com a área da farmacotécnica da UEM que possibilitou o controle de qualidade da própolis. Amostras com os melhores resultados quanto às atividades antiinflamatória, antimicrobiana e antifúngica (VICTORINO et al., 2007) foram preparadas em diferentes extratos e formulações para serem utilizados na pesquisa. Os extratos A70D e D70D parcialmente desalcoolizados foram os que mantiveram viabilidade celular das PBMCs adequada durante um período de 24h. Os extratos A60D e D60D e, as formulações com a inicial F foram altamente citotóxicos quando avaliados ainda na primeira hora de incubação.

Após incubação das cinco diluições dos dois extratos de melhor desempenho (A70D e D70D),

durante 24h a 20°C, houve redução da viabilidade celular proporcional ao aumento da concentração das formulações. As frações mais concentradas apresentaram viabilidade próxima a 60%, semelhante ao diluente propilenoglicol em todos os tempos. Embora a viabilidade das frações menos diluídas esteja relativamente alta quando comparada com água e próxima da solução fisiológica (MELO et al., 2003), não justifica a utilização destas frente ao extrato de origem com viabilidade de 80%. Além do que, o extrato sem diluição apresenta maior estabilidade de solução do que suas frações, fato este favorável para sua escolha.

Os resultados encontrados com as frações mais diluídas (75 e 60), apresentando manutenção da viabilidade celular superior às frações mais concentradas (30 e 15) e próximas aos seus extratos de origem, estão compatíveis com um dos princípios da homeopatia. O princípio da diluição propõe que com o aumento da diluição de uma substância, maior é a energia desprendida de suas moléculas pelo processo de agitação (ELIA et al., 2004; RELTON et al., 2008), em que pequenas quantidades moleculares dos compostos ativos da própolis são suficientes para desencadeamento dos seus efeitos benéficos. Observações semelhantes foram feitas por Victorino et al. (2007) em que extratos de própolis em baixas concentrações apresentaram os melhores resultados quanto aos efeitos antiinflamatório e antimicrobiano, confirmando que o sinergismo entre todos os constituintes da preparação é importante para seu efeito biológico. Mais que isso, os grupos de compostos ativos da própolis parecem melhorar a condição citotóxica apresentada pelo diluente propilenoglicol sobre as PBMCs.

Al-Shaher et al. (2004) estudaram *in vitro* a tolerância dos fibroblastos do ligamento periodontal e da polpa dental mantidos em solução de própolis em baixa concentração, e observaram que a própolis exerce baixa toxicidade, mantendo a viabilidade celular superior a 75%. Sonmez et al. (2005) demonstraram que soluções de própolis altamente concentradas são citotóxicas para os fibroblastos gengivais. Özan et al. (2007) observaram que o extrato de própolis em uma concentração a 10%, diluído no meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM), é satisfatoriamente efetivo na manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal, ao longo de 24h de estocagem. Os resultados encontrados por esses autores também corroboram com os resultados observados neste estudo com células PBMC, notando-se a manutenção da viabilidade celular nas soluções menos concentradas de própolis, além dos extratos.

Em contra partida, Martin e Pileggi (2004) encontraram que concentrações de própolis 100 e 50% demonstraram viabilidade das células do ligamento periodontal significativamente maior que dos meios leite e HBSS, após o tempo de estocagem de 45-min. A solução de própolis 100% não mostrou resultado significativamente diferente da solução 50%, indicando que a primeira concentração não foi mais tóxica que a segunda para as células.

No presente trabalho, como em outros da literatura (MARTIN; PILEGGI, 2004; MELO et al., 2003; ÖZAN et al., 2007), a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por meio da coloração com azul de Tripán por tratar de uma metodologia rápida, de fácil realização e de baixo custo, consistindo na verificação do rompimento da membrana celular que, como consequência, permite que o corante se difunda no interior do citoplasma da célula. Esta técnica permite avaliar a viabilidade quanto à integridade física da membrana da célula, porém não fornece resultado sobre a atual capacidade metabólica celular, fator crítico na prevenção da reabsorção dentária após o replante de um dente avulsionado (MARTIN; PILEGGI, 2004; ÖZAN et al., 2007). A contagem das células viáveis é realizada manualmente ao microscópio óptico, podendo ocorrer variabilidade e erro humano no processo de contagem, sendo uma das justificativas para a diferença de resultados encontrados entre os trabalhos. Neste trabalho, microscopicamente, foi observado maior quantidade de resíduos de própolis no extrato D70D. Os extratos de origem A70D e D70D e suas frações 75 apresentaram de forma nítida a diferença entre células vivas (amareladas) e mortas (azuladas). Nas frações 60 e 45, as células vivas se apresentaram com uma coloração acinzentada as quais parecem estar em fase de transição, enquanto que nas frações 30 e 15, se revelaram azuladas por inteira não deixando dúvidas em relação à mortalidade.

Métodos de extração da própolis, o uso de diferentes solventes e extratos com diferentes compostos podem influenciar na sua atividade biológica (CUNHA et al., 2004). Diferentes combinações de substâncias são capazes de modificar a ação biológica da própolis (KUJUMGIEV et al., 1999). Sua composição química complexa, com mais de 300 componentes identificados, dependente da origem da planta e flora local (MARCUCCI, 1995; SFORCIN, 2007), também pode justificar a variação de resultados entre as pesquisas para as diferentes concentrações de própolis estudadas. No Brasil, a coleta da própolis ocorre durante todo o ano e as variações sazonais não são significantes sobre a sua composição e não interferem na concentração dos

compostos biologicamente ativos. As diferentes espécies de abelhas também não mudam a composição química em uma região geográfica específica uma vez que visitam essencialmente a mesma origem vegetal (SFORCIN, 2007).

Mensuração da concentração dos grupos de compostos ativos da própolis, bem como a identificação da origem de seus vegetais permitirá ensaios com amostras caracterizadas quimicamente e estudos comparativos das suas propriedades (SFORCIN, 2007). A partir de um extrato e formulação em concentração não-citotóxica para as células, estudos futuros *in vitro* e *in vivo* poderão avaliar o desempenho da própolis na prevenção da reabsorção de dentes reimplantados pós-avulsão. Além disso, a literatura não tem apresentado outro meio de estocagem que, além de assegurar a viabilidade das células do ligamento periodontal, também apresente propriedade antibacteriana e antiinflamatória as quais, em trabalhos futuros, poderão contribuir para o melhor entendimento da cicatrização do periodonto do dente reimplantado.

Conclusão

Os resultados sugerem que, em tais condições experimentais, os extratos e formulações à base de própolis mantêm a viabilidade das PBMCs ao longo do tempo e que em concentrações adequadas, poderão ser utilizadas nos estudos futuros sobre alternativas aos meios de conservação de dentes avulsionados rotineiramente utilizados na prática odontológica.

Referências

- AL-SHAHER, A.; WALLACE, J.; AGARWAL, S.; BRETZ, W.; BAUGH, D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 5, p. 359-361, 2004.
- ANDERSSON, L.; AL-ASFOUR, A.; AL-JAME, Q. Knowledge of first-aid measures of avulsion and replantation of teeth: an interview of 221 Kuwaiti schoolchildren. **Dental Traumatology**, v. 22, n. 2, p. 57-65, 2006.
- BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S.; HAMMARSTRÖM, L. Periodontal healing of exarticulated monkey teeth stored in milk or saliva. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 251-259, 1981.
- BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 53-63, 2002.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 21, n. 1, p. 77-89, 1968.

- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 1-6, 2002.
- CESCHEL, G. C.; MAFFEI, P.; SFORZINI, A.; LOMBARDI BORGIA, S.; YASIN, A.; RONCHI, C. *In vitro* permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 44-52, 2002.
- COHEN, S.; HARGREAVES, K. M. **Caminhos da polpa**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- CONSOLARO, A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas**. 2. ed. Maringá: Dental Press, 2005.
- COURTS, F. J.; MUELLER, W. A.; TABELING, H. J. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. **Pediatric Dentistry**, v. 5, n. 3, p. 183-186, 1983.
- CUNHA, I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCICCI, M. C.; DREZZA, F. T.; POVIA, G. S.; CARVALHO, P. O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 964-970, 2004.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1, p. 243-248, 2005.
- DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of water soluble derivative. **Vaccine**, v. 10, n. 12, p. 817-823, 1992.
- DOBROWOLSKI, J. W.; VOHORA, S. B.; SHARMA, K.; SHAH, S. A.; NAQVI, S. A.; DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 77-82, 1991.
- DUARTE, S.; ROSALEN, P. L.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; BOWEN, W. H.; MARQUIS, R. E.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; IKEGAKI, M.; KOO, H. The influence of a novel propolis on mutants streptococci biofilms and caries development in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 1, p. 15-22, 2006.
- ELIA, V.; BAIANO, S.; DURO, I.; NAPOLI, E.; NICCOLI, M.; NONATELLI, L. Permanent physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions of homeopathic medicines. **Homeopathy**, v. 93, n. 3, p. 144-150, 2004.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo da própolis. **Infarma**, v. 11, n. 17, p. 48-51, 1999.
- HUANG, S. C.; REMEIKIS, N. A.; DANIEL, J. C. Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 1, p. 30-33, 1996.
- JOHNSTON, J. E.; SEPE, H. A.; MIANO, C. L.; BRANNAN, R. G.; ALDERTON, A. L. Honey inhibits lipid oxidation in ready-to-eat ground beef patties. **Meat Science**, v. 70, n. 4, p. 627-631, 2005.
- KOO, H.; GOMES, B. P. F. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M. B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 45, n. 2, p. 141-148, 2000.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.
- LOH, T.; SAE-LIM, V.; YIAN, T. B.; LIANG, S. Dental therapists' experience in the immediate management of traumatized teeth. **Dental Traumatology**, v. 22, n. 2, p. 66-70, 2006.
- MANI, F.; DAMASCENO, H. C. R.; NOVELLI, E. L. B.; MARTINS, E. A. M.; SFORCIN, J. M. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 2, p. 95-98, 2006.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIQUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.
- MARINO, T.; WEST, L. A.; LIEWEHR, F. R.; MAILHOT, J. M.; BUXTON, T. B.; RUNNER, R. R.; McPHERSON, J. C. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 12, p. 699-702, 2000.
- MARTIN, M. P.; PILEGGI, R. A quantitative analysis of propolis: a promising new storage media following avulsion. **Dental Traumatology**, v. 20, n. 2, p. 85-89, 2004.
- MELO, D. F.; SELL, A. M.; LOPES, C. M.; HIDALGO, M. M. Viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2003.
- OLIVEIRA, A. C.; SHINOBU, C. S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S. L.; SVIDZINSKI, T. I. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 493-497, 2006.
- ÖZAN, F.; POLAT, Z. A.; ER, K.; ÖZAN, Ü.; DEGER, O. Effect of propolis on survival of periodontal ligament cells: new storage media for avulsed teeth. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 5, p. 570-573, 2007.
- PERRI DE CARVALHO, P. S.; TAGLIAVINI, D. G.; TAGLIAVINI, R. L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas – Estudo clínico e histológico em ratos. **Revista de Ciências Biomédicas**, v. 12, n. 1, p. 39-50, 1991.
- PETTIETTE, M.; HUPP, J.; MESAROS, S.; TROPE, M. Periodontal healing of extracted dogs teeth air dried

- for extended periods and soaked in various media. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 13, n. 3, p. 113-118, 1997.
- RAPHAEL, S. L.; GREGORY, P. J. Parenteral awareness of the emergency management of avulsed teeth in children. **Australian Dental Journal**, v. 35, n. 2, p. 130-133, 1990.
- RELTON, C.; O'CATHAIN, A.; THOMAS, K. J. Homeopathy: untangling the debate. **Homeopathy**, v. 97, n. 3, p. 152-155, 2008.
- SAMET, N.; LAURENT, C.; SUSARIA, S. M.; SAMET-RUBINSTEEN, N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. **Clinical Oral Investigations**, v. 11, n. 2, p. 143-147, 2007.
- SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1-14, 2007.
- SOARES, I. J.; GOLDBERG, F. **Endodontia - técnica e fundamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- SONMEZ, S.; KIRILMAZ, L.; YUCESSOY, M.; YÜCEL, B.; YILMAZ, B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 371-376, 2005.
- TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.
- TROPE, M. Clinical Management of the avulsed tooth. **Dental Clinics of North America**, v. 39, n. 1, p. 93-112, 1995.
- TROPE, M.; FRIEDMAN, S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 8, n. 5, p. 183-188, 1992.
- UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULU, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, n. 2, p. 189-195, 2005.
- VICTORINO, F. R.; FRANCO, S. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; AVILA-CAMPOS, M. J.; CUMAN, R. K. N.; HIDALGO, M. M.; BERSANI-AMADO, C. A. Pharmacological evaluation of propolis solutions for endodontic use. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 9, p. 721-727, 2007.
- VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p. 117-124, 2008.

Received on December 3, 2009.

Accepted on August 31, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.