

**GIOVANNA PIRES DA SILVA RIBEIRO DE REZENDE**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PROPRIEDADES FÍSICO-  
QUÍMICAS DE MEDICAMENTO ENDODÔNTICO EXPERIMENTAL À  
BASE DE PRÓPOLIS E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO: ESTUDO *IN VITRO***

Goiânia

2009

**GIOVANNA PIRES DA SILVA RIBEIRO DE REZENDE**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PROPRIEDADES FÍSICO-  
QUÍMICAS DE MEDICAMENTO ENDODÔNTICO EXPERIMENTAL À  
BASE DE PRÓPOLIS E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO: ESTUDO *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa Mutiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro-Oeste UnB/UFG/UFMS como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane R. R. S. Costa.

Goiânia

2009

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**(GPT/BC/UFG)**

R467a Rezende, Giovanna Pires da Silva Ribeiro de.  
Atividade antimicrobiana e propriedades físico-químicas de medicamento endodôntico experimental à base de própolis e hidróxido de cálcio: estudo *in vitro* [manuscrito] / Giovanna Pires da Silva Ribeiro de Rezende. – 2009.  
106 f : il., color., figs., tabs., qds.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane R. R. S. Costa.

Tese (Doutorado) – Programa Multiinstitucional de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Convênio Rede Centro-Oeste UnB/UFG/UFMS.

Bibliografia: 91-97.  
Inclui lista de siglas e abreviaturas.  
Anexo e apêndices.

1. Endontia – Medicamentos 2. Própolis – Avaliação físico-química 3. Hidróxido de cálcio – Avaliação físico-química 4. *Enterococcus faecalis* – Atividade antimicrobiana I. Costa, Luciane R. R. S. II. Universidade Federal de Goiás. **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**. III. Universidade de Brasília. **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**. IV. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**. V. Título.

CDU: 616.314.18

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PROPRIEDADES FÍSICO-  
QUÍMICAS DE MEDICAMENTO ENDODÔNTICO EXPERIMENTAL À  
BASE DE PRÓPOLIS E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO: ESTUDO *IN VITRO***

Tese aprovada em 20 de fevereiro de 2009, pela banca examinadora composta pelos  
professores:

---

Profa. Dra. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa  
Orientadora

---

Prof. Dra. Eliana Martins Lima

---

Prof. Dr. Carlos Estrela

---

Prof. Dra. Cerise Castro Campos

---

Prof. Dra. Liliani Aires Cândido Vieira

---

Prof. Dr. Paulo Sérgio Sucasas da Costa (suplente)

Dedico esta tese a Deus, ao Luiz Carlos e à Amanda por estarem sempre ao meu lado, ajudando-me e apoiando. Obrigada por tudo. Vocês são muito importantes para mim.

AMO IMENSAMENTE VOCÊS.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa pela força, auxílio, dedicação, humildade e carinho.

À minha mãe: Maria Aparecida Galvão e Silva, meu pai: Ivanir Pires da Silva, minhas irmãs: Luciana Pires da Silva e Fernanda Pires da Silva, à minha sogra: Lúcia Maria Ribeiro de Rezende e cunhadas: Lilian Ribeiro de Rezende e Márcia Ribeiro de Rezende pela confiança, ajuda e amizade.

Aos Professores: Dra. Eliana Martins Lima, Dr. Carlos Estrela e Dra. Fabiana Cristina Pimenta pelos ensinamentos e atenção.

À Cristina Pereira Ataídes pela amizade e apoio.

A todos os familiares e amigos que me incentivaram nesta conquista.

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dr. Carlos Alberto Bezerra Tomaz e Dr. Celmo Celeno Porto, respectivamente Coordenadores Geral e Local do Programa Mutiinstitucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Convênio Rede Centro-Oeste UnB/UFMG/UFMS, pelo empenho na condução do Programa.

Aos professores do Programa pela dedicação em compartilharem seu conhecimento.

À Luciana Ferreira Fonseca Rodovalho, ao Daniel de Almeida Decúrcio, à Ezequiane Machado da Silva Oliveira e à Suzana Ferreira Alves pela assistência na parte experimental da pesquisa.

À farmacêutica Andresa Aparecida Berretta, da Apis Flora<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP pela disponibilidade.

Ao Prof. Silvio Issáo Myaki, Iussif Mamede Neto, Cristiana Marinho de Jesus e Renata Pinheiro de Lima Paula pela cooperação com a obtenção das amostras dentárias.

Ao Prof. Edemilson Cardoso da Conceição pela atenção e disponibilidade em prestar auxílio.

À Maria Marinalva de França pela presteza e colaboração fornecidas.

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro proveniente de bolsa de estudos da CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## RESUMO

Um medicamento endodôntico eficaz para atuar como medicação intracanal de dentes decíduos e permanentes ou como material obturador em pulpectomias de dentes decíduos ainda é alvo de inúmeros pesquisadores. O objetivo deste estudo foi analisar um medicamento experimental formulado à base de própolis e hidróxido de cálcio, verificando seu pH, condutividade, viscosidade, atividade antimicrobiana *in vitro*, estabelecendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e eficácia antimicrobiana *in vitro* sobre dentina humana infectada. Cinco grupos de medicamentos foram comparados: 1.própolis + hidróxido de cálcio + propilenoglicol; 2.hidróxido de cálcio + propilenoglicol; 3.hidróxido de cálcio + água destilada; 4.própolis + propilenoglicol; 5.própolis + água destilada. O pH foi mensurado após 1 hora, 24h e 7 dias; as propriedades físico-químicas foram mensuradas por meio de equipamentos digitais. A atividade antimicrobiana (CIM) contra *Enterococcus faecalis* foi realizada utilizando o método de diluição em ágar. Na segunda parte do experimento microbiológico, blocos de dentina oriundos de raízes de dentes permanentes e decíduos foram inoculados com *Enterococcus faecalis* por 60 dias, e depois irrigados, secos e completamente preenchidos com o medicamento por 30 dias. A associação de própolis, hidróxido de cálcio e propilenoglicol apresentou um pH elevado (média 12,44), baixa condutividade (média 57,4  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e alta viscosidade (média 667,1 cP a 5 RPM). Essa associação demonstrou atividade antimicrobiana *in vitro* contra *E. Faecalis* (CIM 10 mg/mL), porém não inibiu o biofilme de *E. faecalis* nos blocos de dentina dos dentes decíduos e permanentes. Concluiu-se que, nessa proporção e composição, a associação de própolis e hidróxido de cálcio não apresentou propriedades físico-químicas (condutividade e viscosidade) satisfatórias para ser utilizado como medicação intracanal para dentes decíduos ou permanentes, porém exibiu propriedades físico-químicas aceitáveis para ser proposto como agente obturador para dentes decíduos.



Palavras-chave: Própolis; Hidróxido de Cálcio; Análise Físico-química; *Enterococcus faecalis*; Endodontia.

## ABSTRACT

### ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AN EXPERIMENTAL ENDODONTIC MEDICAMENT WITH PROPOLIS AND CALCIUM HYDROXIDE: AN *IN VITRO* STUDY.

An efficient endodontic medicament able to serve as an intracanal medication for primary and permanent teeth or as an obturation material for pulpectomies in primary teeth is an aspiration of many researchers. In this study, a formulated propolis and calcium hydroxide experimental medicament was analyzed to determine its pH, conductivity, viscosity; its *in vitro* antimicrobial activity, establishing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC); and its *in vitro* antimicrobial effectiveness on infected human dentin. Five groups were compared: 1. calcium hydroxide + propolis + propylene glycol; 2. calcium hydroxide + propylene glycol; 3. calcium hydroxide + distilled water; 4. propolis + propylene glycol; 5. propolis + distilled water. The pH was measured after 1 hour, 24h and 7 days; digital equipments were used to measure the medicaments physicochemical properties. Antimicrobial activity (MIC) against *Enterococcus faecalis* was determined using the broth microdilution method. In the second part of the microbiological experiment, dentin blocks from roots of permanent and primary teeth were inoculated with *Enterococcus faecalis* for 60 days and then irrigated, dried and completely filled with the intracanal medicament and left for 30 days. The association of propolis, calcium hydroxide and propylene glycol presented an elevated pH (mean 12.44), low conductivity (mean 57.4  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), and high viscosity (mean 667.1 cP at 5 RPM). This association demonstrated *in vitro* antimicrobial activity against *E. faecalis* (MIC 10 mg/mL); however, it did not inhibit *E. faecalis* biofilm either in dentin blocks from permanent or primary teeth. In conclusion, the physicochemical properties (conductivity and viscosity) of the association of propolis and calcium hydroxide, in this composition and proportion, made it

inappropriate for use as an intracanal medication for primary or permanent teeth. However, the association could be proposed for use as an obturation medication for primary teeth.

Keywords: Propolis; Calcium Hydroxide; Physicochemical Analysis; *Enterococcus faecalis*; Endodontics.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AH – Cimento AH Plus

AP – Cimento Apexit

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

Ca(OH)<sub>2</sub> – Hidróxido de Cálcio

Ca<sup>+2</sup> – Íons Cálcio

CaPE – Hidróxido de Cálcio Associado ao Propilenoglicol

CAS – Chemical Abstract Service

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CEPOBRAS – Centro de Ensino e Pesquisa Odontológica do Brasil

CFU – Colony Forming Units

CG – Cimento de Grossman

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMCP – Camphorated Monochlorophenol

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

cP – CentiPoise

CT – Controle

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid

EEP – Extrato Etanólico de Própolis

EP – Extrato de Própolis Sem Álcool

HC – Hidróxido de Cálcio

KE –Ketac-Endo

LB – Lethen Broth

PMCC – Paramonoclorofenol Canforado

ME – Medicamento Experimental

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

$\mu$ S/cm – MicroSiemens por Centímetro

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

OH<sup>-</sup> – Íons Hidroxila

P.A. – Pró-análise

RP – RoekoSeal Automix com um Primer Experimental

RPM – Rotações por Minuto

RSA – RoekoSeal Automix

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFG – Universidade Federal de Goiás

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISTA DA LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 Própolis.....	21
2.2 Hidróxido de cálcio .....	31
2.3 Microrganismo importante nas infecções endodônticas – O <i>Enterococcus faecalis</i> .....	38
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>44</b>
2.1 Objetivo geral .....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 Desenvolvimento do medicamento experimental.....	45
3.2 Sujeitos da pesquisa.....	47
3.3 Material.....	48
3.4 Procedimentos para coleta e análise dos dados .....	49
3.4.1 Propriedades físico-químicas.....	49
3.4.1.1 PH .....	49
3.4.1.2 Condutividade.....	50
3.4.1.3 Viscosidade.....	50

3.4.2 Concentração inibitória mínima .....	51
3.4.2 Eficácia antimicrobiana sobre dentina infectada .....	52
<b>4 ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>55</b>
4.1 Physicochemical and Antimicrobial Properties of an Association of Calcium Hydroxide with Propolis as Endodontic Medicament.....	55
4.2 Antibacterial Action of Intracanal Medicaments against Infected Dentin from Primary and Permanent Teeth.....	73
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás .....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE A – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido para a doação de dentes, banco de dentes.....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE B – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido para a doação de dentes, consultório particular .....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido (adultos) .....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE D – Termo de consentimento livre e esclarecido (menores) ....</b>	<b>105</b>

## APRESENTAÇÃO

A flora brasileira com sua biodiversidade, é bastante rica em plantas medicinais, e isso tem despertado o interesse de pesquisadores na busca por comprovação de suas propriedades farmacológicas. A utilização da abordagem terapêutica naturalista pela população se mostra em franca ascensão, necessitando da intervenção da ciência para permitir sua utilização com maior segurança e eficácia. Isso se deve ao fato de que boa parte da farmacologia natural oriunda de conhecimentos populares não tem efeitos cientificamente comprovados.

Atualmente, o mercado que envolve a medicina natural tem suscitado grande circulação de capital, incentivando as mais poderosas indústrias farmacêuticas a investir na descoberta de novas substâncias de valor terapêutico. Assim surge a ciência, quando o homem anseia por respostas, possibilitando o desenvolvimento de novas descobertas passíveis de verificação com conteúdos consistentes e análise cautelosa. Porém o fator diferenciador deve ser sempre a existência de evidências científicas, obtidas através da metodologia de mais alta qualidade.

Na medicina popular, a própolis é um produto utilizado há milhares de anos e somente nas últimas décadas suas indicações e propriedades na área da saúde vêm sendo criteriosamente estudadas. Uma das possíveis explicações pelo crescente interesse por pesquisas que envolvem a própolis se deve ao fato de a mesma ser considerada um dos mais eficientes produtos naturais descobertos.

O interesse em associar a própolis ao hidróxido de cálcio originou-se da expectativa em viabilizar a utilização desse promissor produto natural com o hidróxido de cálcio, o qual é um medicamento consagrado em Endodontia. A experiência inicial envolvendo essa associação ocorreu em nosso Curso de Mestrado. Ao avaliarmos as



propriedades antimicrobianas de produtos comerciais à base de própolis, observamos sua efetividade e consequente uso potencial em diferentes situações da Odontologia. Dessa forma, considerando a necessidade de eliminação de microrganismos resistentes e virulentos em Endodontia, a escassez de trabalhos envolvendo o estudo dessa associação frente a microrganismos associados a infecções endodônticas, e constatando que os dados na literatura científica confirmam as propriedades biológicas da própolis e as atividades antimicrobiana e mineralizadora do hidróxido de cálcio, optamos por prosseguir os estudos com esse medicamento, buscando respostas às perguntas:

- É possível se obter um medicamento à base de própolis e hidróxido de cálcio que apresente propriedades físico-químicas satisfatórias para uso em endodontia?
- Tal medicamento obtido é eficaz contra microrganismos efetivamente associados a infecções endodônticas?

Assim, com a intenção de buscar fundamentos científicos, de ampliar e direcionar o uso de um medicamento experimental contendo própolis e hidróxido de cálcio na Odontologia, pretendeu-se analisar algumas propriedades físico-químicas, avaliar a concentração inibitória mínima da associação da própolis com o hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus faecalis* e, também, a efetividade antimicrobiana da mesma em um modelo de túbulos dentinários infectados por essa bactéria.

Esta tese está dividida nas seguintes seções:

1. Introdução, onde se apresenta o estado da arte de tópicos específicos da Endodontia – medicação intracanal para dentes decíduos e permanentes e obturação de canal de dentes decíduos –, bem como justifica a realização deste estudo.
2. Revista da literatura, em que é apresentado o conhecimento atual acerca da própolis, hidróxido de cálcio e *E. faecalis*.

3. Proposição, contendo os objetivos geral e específico desta pesquisa.
4. Materiais e métodos com detalhamento do *modus operandi* da investigação permitindo sua reprodutibilidade.
5. Cópia dos dois artigos originais oriundos desta pesquisa e que serão submetidos a periódicos da área.
6. Considerações finais ao trabalho, sintetizando o conhecimento produzido e as sugestões para novos estudos.

## 1 INTRODUÇÃO

A Endodontia é uma ciência que, apesar de primariamente norteadas por evidências científicas, também revela controvérsias. Uma delas refere-se à medicação intracanal, que tem o objetivo de potencializar o processo de sanificação do sistema de túbulos dentinários iniciado no preparo químico-mecânico (ESTRELA, 1997; TANRIVERDI et al., 1997). A medicação intracanal é indicada para dentes decíduos e permanentes, com o objetivo de eliminar os microrganismos que sobreviveram ao preparo do canal, controlar o exsudato persistente, ser inofensiva aos tecidos periapicais e possuir ação destrutiva dos osteoclastos presentes na reabsorção radicular externa (ESTRELA et al., 1995).

Nesse contexto, a obtenção de um material ideal para obturar os canais radiculares de dentes decíduos ainda é um alvo almejado por pesquisadores e clínicos. Para que o material obturador de dentes decíduos seja satisfatório, é necessário: apresentar um grau de reabsorção semelhante ao da raiz do dente, ser inofensivo aos tecidos periapicais e ao germe do dente permanente, ser reabsorvido quando extravasado, possuir propriedade anti-séptica, ser inserido com facilidade e aderir às paredes dos condutos radiculares, ser facilmente removido se necessário, ser radiopaco e não pigmentar o dente (HOBSON, 1970). Entretanto, até o momento, ainda não foi desenvolvido um medicamento capaz de preencher todos esses requisitos (CUNHA et al., 2005), sendo que ainda não há evidências científicas sobre a superioridade de determinada técnica ou material na endodontia de dentes decíduos (NADIN et al., 2003).

Um material classicamente empregado em Endodontia, especialmente em dentes permanentes, é o hidróxido de cálcio cuja efetividade se deve à sua propriedade antimicrobiana e ao potencial osteogênico (BERGENHOLTZ; SPANGBERG, 2004;

ESTRELA, 1997). Embora seja o medicamento mais utilizado como medicação intracanal (ESTRELA, 1997), o hidróxido de cálcio tem atividade questionada contra um dos microrganismos mais resistentes observados em infecções endodônticas – o *E. faecalis* (DOTTO et al., 2006; TANRIVERDI et al., 1997).

Por ser um pó, e baseando sua ação na dissociação iônica, o veículo a ser associado ao hidróxido de cálcio é um dos fatores que condicionam o desfecho da terapia. Em caso de medicação intracanal, necessita-se de uma maior velocidade de dissociação e difusão iônica das medicações com hidróxido de cálcio, em virtude do menor tempo de permanência do medicamento no interior canal radicular; portanto o veículo associado deve permitir essa rápida liberação de íons hidroxila e cálcio. Ao contrário, o uso de medicamentos contendo hidróxido de cálcio em pulpectomias de dentes decíduos tem como requisito a liberação lenta dos íons hidroxila, para que o organismo possa utilizar esses íons, quando necessitar, no processo de reparação e retorno à normalidade.

Alguns estudos têm buscado superar as limitações do hidróxido de cálcio como medicação intracanal, associando ao mesmo outras substâncias que possam melhorar sua eficácia antibacteriana sem prejuízo de suas propriedades físico-químicas e biológicas (DOTTO et al., 2006), mas nenhuma evidência ainda pode ser estabelecida com relação a essas propostas. Nesta pesquisa, escolheu-se a própolis como produto a ser agregado ao hidróxido de cálcio na elaboração de um medicamento experimental em decorrência dos relatos na literatura sobre as mais variadas propriedades biológicas da própolis como antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e imunomodulatória (BANKOVA et al., 1982; BANSKOTA et al., 2001; GERALDINI et al., 2000; HOFFMANN et al., 1998; MANARA et al., 1999; OTA et al., 1998; PARK et al., 1998; SFORCIN et al., 2000). Diferentes formulações de própolis têm demonstrado atividade antimicrobiana inclusive contra o *E.*

*faecalis* (AWAWDEH et al., 2008; FERREIRA et al., 2007; KOO et al., 2000; ONCAG et al., 2006).

Uma primeira versão da associação “própolis e hidróxido de cálcio” mostrou-se efetiva, por meio da difusão em ágar, contra diferentes microrganismos padrão (*Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Candida sp* e *Candida albicans*) (REZENDE, 2004) e culturas polimicrobianas coletadas de dentes decíduos necrosados (REZENDE et al., 2008), porém não se avaliou o efeito desse medicamento sobre o *E. faecalis* especificamente. Dessa forma, justifica-se a continuidade da investigação sobre as propriedades desse medicamento, visando determinar a viabilidade de sua utilização como medicamento intracanal de dentes decíduos e permanentes e como agente obturador em pulpectomias de dentes decíduos.

## 2 REVISTA DA LITERATURA

Com finalidade didática, dividimos este capítulo nos três temas principais que nortearam a condução desta pesquisa: própolis, hidróxido de cálcio e microrganismos associados a infecções endodônticas. Este último, com foco no *E. faecalis*, devido às suas características peculiares de virulência, serão detalhadas posteriormente.

### 2.1 PRÓPOLIS

A própolis, também chamada cola de abelha, é um material de coloração escura, produzida através de material coletado de plantas e utilizada pelas abelhas contra microrganismos patógenos e também por homens desde os tempos mais antigos. Porém somente nas últimas décadas os estudos envolvendo a própolis e suas propriedades biológicas têm se intensificado, sendo que, atualmente, a própolis tem sido considerada um dos mais eficientes medicamentos naturais descobertos (BANKOVA, 2005; GERALDINI et al., 2000).

Devido a sua popularidade na medicina natural, a própolis tem sido alvo de inúmeras pesquisas químicas e farmacológicas nos últimos 30 anos (BANKOVA, 2005). Sua composição química é extremamente complexa e depende da flora e do local onde foi coletada (BANKOVA et al., 2000). As principais atividades terapêuticas da própolis atualmente relatadas na literatura são: antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, anti-ulcerativa, antiprotozoária, anestésica, anticarcinogênica, antioxidante, hipotensiva, cicatrizante, hepatoprotetora e imunoestimulatória (BANKOVA et al., 1982; BANSKOTA et

al., 2001; GERALDINI et al., 2000; HOFFMANN et al., 1998; OTA et al., 1998; PARK et al., 1998; MANARA et al., 1999; SFORCIN et al., 2000). A diferença na composição da própolis pôde ser verificada pelo estudo de Fernandes-Jr et al. em 2006, os quais analisaram a ação antimicrobiana de própolis obtidas de três regiões distintas do Brasil (Botucatu-SP, Mossoró-RN e Urubici-SC) sobre linhagens isoladas de infecções clínicas humanas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*). Foram preparados extratos alcoólicos de própolis e determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguida do cálculo da CIM 90%. A própolis de Botucatu foi a mais eficiente sobre *S. aureus* (0,3%v/v), *Enterococcus sp* (1,1%v/v) e *C. albicans* (2,1% v/v). Para *E. coli*, a própolis eficiente foi de Urubici (7,0%v/v) e para *P. aeruginosa* a de Mossoró (5,3%v/v). Os resultados mostram maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas e levedura em relação às Gram-negativas. Os autores concluíram que, para os microrganismos testados e amostras de própolis testadas, houve diferença na atividade antimicrobiana em função do local de produção da própolis; isso seria justificado pela diferença na sua composição química, reafirmando que a própolis depende da flora e do local onde foi coletada. Confirmando essa hipótese, Geraldini et al. em 2000 concluíram serem as variações na composição da própolis determinadas principalmente pela flora da área ecológica, pelos ciclos evolutivos das plantas provedoras de resinas, pelos microrganismos presentes em torno da região e pelos fatores climatológicos, sendo o tipo de vegetação da região de onde a própolis foi retirada o que determinaria maior ou menor teor de flavonoides totais.

No entanto, apesar das diferentes regiões e variações climáticas onde foi coletada, a atividade antimicrobiana é sempre observada, mesmo em própolis de composições químicas variadas (BANKOVA, 2005). Estudos realizados por Kujumgiev et al. em 1999 e Salomão et al. em 2004 confirmaram esse importante dado. Salomão et al. em 2004

avaliaram: a composição química e a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis do Brasil e da Bulgária contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, os fungos: *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, e as bactérias: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Os autores concluíram que os extratos etanólicos de própolis do Brasil e da Bulgária apresentaram composições bastante distintas, porém ambos foram efetivos contra *T. cruzi* e as três espécies de fungos. O extrato da Bulgária foi mais efetivo contra as bactérias. Os resultados indicaram que, apesar das diferenças nas suas composições, ambos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, mas, para a atividade antibacteriana, houve uma correlação positiva com conteúdos mais elevados de flavonoides presentes no extrato de própolis da Bulgária.

A investigação das atividades antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), antifúngica (contra *Candida albicans*) e antiviral (contra o vírus *Avian influenza*) de própolis provenientes de diferentes origens geográficas foi realizada por Kujumgiev et al. (1999). Os autores verificaram que todas as amostras foram efetivas contra as bactérias Gram-positivas e a *Candida albicans*, e a maioria apresentou atividade antiviral. As atividades de todas as amostras de própolis foram similares apesar de suas diferentes composições químicas. As amostras de zonas temperadas apresentavam flavonoides, porém as amostras de regiões tropicais não continham flavonoides e mostraram atividades semelhantes (KUJUMGIEV et al., 1999). Isso demonstrou que a própolis possui um grande valor farmacológico como uma mistura natural e não em decorrência de compostos isoladamente.

Um problema decorrente da grande variedade de amostras de própolis provenientes de diferentes origens geográficas e com composições químicas distintas é a dificuldade na padronização e no controle de qualidade da própolis (BANKOVA et al., 2000). Avaliando a composição química da própolis, observa-se que é ricamente variada: mais de 200 substâncias já foram identificadas em própolis de diferentes localidades, incluindo ácidos



fenólicos, flavonoides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais. Porém convém salientar que dentre essas classes de substâncias destacam-se a dos flavonoides e a dos ácidos fenólicos, pois a elas é atribuída grande parte das atividades biológicas da própolis (FUNARI; FERRO, 2006).

Os flavonoides estão presentes em células que realizam a fotossíntese e são comumente encontrados em frutas, vegetais, castanhas, grãos, talos, flores, chás, vinhos, própolis e mel (TIM-CUSHNIE et al., 2005). Têm sido objeto de inúmeras pesquisas atualmente e constituem uma importante classe de polifenóis, apresentando cerca de 41 ações farmacológicas, incluindo sua ação sobre a rede capilar, diminuindo a fragilidade e permeabilidade (BERRETTA, 2003). Dentre as principais classes de flavonoides estão: auronas, isoflavonas, calconas, flavononas, flavonas, flavonóis, antocianidinas, proantocianidinas, flavanas, e dihidrocalconas (TIM-CUSHNIE et al., 2005). Para Fernandes-Jr et al. (2006) os flavonoides, juntamente com ácidos fenólicos, ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis.

A atividade antimicrobiana dos flavonoides também foi pesquisada por diversos estudiosos (GONSALES et al., 2006; KOSALEC et al., 2005; TIM-CUSHNIE et al., 2005; UZEL et al., 2005). Uzel et al. (2005) analisaram a atividade antimicrobiana de quatro amostras de extratos etanólicos de própolis provenientes da Anatólia (Turquia) em diferentes grupos de microrganismos e compararam suas composições químicas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada por macrodiluição. Os valores mais efetivos da CIM foram 2 mg/mL para *Streptococcus sobrinus* e *E. faecalis*, 4 mg/mL para *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *C. krusei*, 8mg/mL para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterobacter aerogenes*, 16mg/mL para *Escherichia coli* e *C. tropicalis* e 32 mg/mL para *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. A composição química dos extratos etanólicos de própolis foi determinada por cromatografia e

espectrômetro de massa. Os principais componentes da própolis foram flavonoides como a pinocembrina, pinostropina, isalpinina, pinobanksina, quercetina, naringenina, galangina e crisina. Para Tim-Cushnie et al. (2005), os mecanismos antimicrobianos relacionados com os flavonoides são: a inibição da síntese de ácido nucléico, a inibição das atividades da membrana citoplasmática e a inibição do metabolismo energético.

O conteúdo de flavonoides em 10 soluções etanólicas de própolis comercializadas na Croácia foi analisado por Kosalec et al. (2005) utilizando dois métodos complementares de cromatografia e, posteriormente, determinaram a atividade antimicrobiana dos flavonoides pelo método de difusão em ágar contra sete espécies de microrganismos: *Bacillus subtilis* NCTC 8236, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12204, *E. faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e *Candida albicans* ATCC 10231. Os resultados da análise de flavonoides mostraram que o conteúdo de flavonas e flavonóis nos produtos foi uniforme variando de 0,14 a 0,41%, mas o conteúdo de flavononas apresentou grande variação (0,43 a 18,78%). A maioria dos produtos apresentou uma porcentagem de flavonoides abaixo de 9%, sendo que todos aqueles que possuíam mais de 1% no seu conteúdo apresentaram atividade antimicrobiana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Para investigar a atividade antimicrobiana de amostras de própolis de Goiás, Paraná e São Paulo e os seus conteúdos de flavonoides, Gonsales et al. (2006) prepararam extratos etanólicos de própolis a 30%. Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados demonstraram, pelo teste de difusão em ágar, que os extratos de própolis inibiram o crescimento do *Staphylococcus aureus*, mas não o da *Escherichia coli*. O conteúdo de flavonoides variou nas amostras. Os autores concluíram que os extratos de própolis foram efetivos contra bactérias Gram-positivas independentemente do

local geográfico de origem, e houve uma correlação positiva entre a atividade antimicrobiana e o conteúdo de flavonoides.

De acordo com Park et al. (2006), os principais componentes da própolis com propriedades biológicas pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, os quais explicam, em parte, a grande variedade das propriedades terapêuticas relatadas por diversos pesquisadores. Os compostos fenólicos apresentam hidroxila ligada diretamente ao seu núcleo benzênico. Englobam uma gama enorme de substâncias, entre elas os flavonoides e os ácidos fenólicos, os quais, por sua constituição química, possuem propriedades antioxidantes. A própolis brasileira é rica em ácidos fenólicos prenilados, diferenciando-se de amostras de zonas temperadas, mais ricas em flavonoides (FUNARI; FERRO, 2006).

Os pesquisadores do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), coordenados pelo Prof. Dr. Yong K. Park, iniciaram estudos com o objetivo de avaliar as amostras da própolis de abelhas *Apis mellifera*, provenientes de diversas regiões do Brasil, quanto à composição qualitativa e quantitativa de flavonoides e verificaram que existem diversos tipos de flavonoides, os quais possuem atividades farmacológicas diferentes. Isso significa que a variabilidade tanto quali como quantitativa dos flavonoides na própolis brasileira pode, também, implicar nas propriedades biológicas da própolis dependendo da região de coleta. Porém é importante destacar que existem outros componentes como os ácidos fenólicos e seus ésteres e outros derivados dos compostos fenólicos, que apresentam atividade biológica, inclusive antimicrobiana (PARK et al., 2006). Segundo Bosio et al. (2000), os flavonoides do grupo flavonóis, em particular a pinocembrina e a galangina e os do grupo flavonas, como a crisina e a acacetina, apresentam atividade antimicrobiana.

Funari e Ferro (2006) avaliaram a própolis por meio de exame organoléptico e análises cromatográficas e foram identificados os ácidos clorogênico, cafeico, para-cumárico, ferúlico, trans-cinâmico e artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), além dos flavonoides isossacuranetina e canferida. Os autores também observaram que a indicação da fonte da própolis pode trazer consigo informações sobre os seus aspectos químicos e as suas prováveis atividades biológicas.

Outras atividades biológicas da própolis foram analisadas por Silva et al. (2004), Al-Shaher et al. (2004), Sabir et al. (2005) e por Sforcin et al. (2005).

O potencial irritativo das substâncias própolis, *Casearia sylvestris*, Otosporin e soro fisiológico (controle) foi avaliado por Silva et al. (2004) utilizando 28 ratos machos da linhagem Wistar. Em quatro pontos predeterminados e depilados da região dorsal de cada animal, foram injetados 0,1 mL das substâncias teste. Os animais foram sacrificados meia, uma, três e seis horas após a injeção das substâncias, e cada pedaço de pele contendo a lesão foi colocado em frascos contendo formamida, que foram incubados a 45°C por 72 h. Após esse período, as amostras foram filtradas e submetidas à análise em espectrofotômetro. No período de 3 h, foram observados os maiores valores de corante extraído, caracterizando, assim, o pico do processo inflamatório. Os resultados mostraram que a própolis foi a substância que apresentou menor potencial irritativo.

Os efeitos da própolis em fibroblastos da polpa dental e do ligamento periodontal foram examinados por Al-Shaher et al. (2004). A análise da viabilidade das células após o tratamento com própolis e também com hidróxido de cálcio foi realizada pela técnica de manchamento violeta-cristal das células, seguido da análise pelo espectrofotômetro. A exposição dos fibroblastos, tanto da polpa quanto do ligamento periodontal à concentração de 4 mg/mL de própolis ou menos, resultaram em uma viabilidade de mais de 75% das células. Enquanto 0,4 mg/mL de hidróxido de cálcio foi extremamente

citotóxico e somente 25% das células permaneceram viáveis. Os autores concluíram que a própolis parece ser uma possível alternativa como medicação intracanal.

A resposta da polpa dental de ratos ao capeamento pulpar direto com componentes isolados da própolis foi investigada por Sabir et al. (2005). Cavidades classe I na superfície oclusal dos primeiros molares direitos de ratos Sprague-Dawley foram preparadas. Os resultados mostraram que o capeamento pulpar em ratos com flavonoides obtidos da própolis retardou o processo inflamatório pulpar e estimulou a formação de dentina reparadora. Os outros componentes isolados da própolis (não-flavonoides) não apresentaram resultados satisfatórios.

Também realizando um estudo em ratos, Sforcin et al. (2005) avaliaram a propriedade imunomodulatória, especificamente na produção de anticorpos, de própolis provenientes do Brasil e da Bulgária e concluíram que ambas estimularam a produção de anticorpos, independentemente da estação e origem geográfica.

A ação *in vitro* do extrato etanólico de própolis na superfície dentinária de 15 dentes divididos em cinco grupos foi avaliada por Geraldini et al. (2000). Os pesquisadores removeram o esmalte e cortaram aproximadamente 1 mm de dentina para produzir a camada de esfregaço. Em seguida, essas superfícies foram tratadas com diferentes concentrações etanólicas de própolis e com etanol 70% puro, utilizando-se bolinhas de algodão estéril para aplicação de cada substância, esfregando-a por 30 segundos. Os espécimes, após serem lavados com água e secos, foram analisados em microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que, morfologicamente, as soluções estudadas removeram parte da camada de esfregaço, sem expor os túbulos dentinários. O extrato etanólico de própolis a 10% promoveu uma camada regular cobrindo a superfície dentinária, e a 20% e 30% apresentou partículas com formas esferoidais de vários tamanhos que ficaram sobrepostas ao esfregaço dentinário, o

qual se apresentava regular e com poucos detritos, sugerindo ação de limpeza das substâncias utilizadas.

As pesquisas que comprovam a atividade antimicrobiana da própolis são inúmeras na literatura, consagrando o seu uso para esse fim (LU et al., 2005; SANTOS et al., 2002; SAWAYA et al., 2004; SFORCIN et al., 2000; STEPANOVIĆ et al., 2003).

A atividade antimicrobiana *in vitro* de amostras de própolis coletadas durante as quatro estações sobre bactérias isoladas de infecções humanas foi observada por Sforcin et al. (2000). A diluição do extrato etanólico de própolis em ágar foi realizada nas concentrações de 0,4 a 14% (% v:v). Os autores verificaram que o crescimento de bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) foi inibido por baixa concentração de própolis (0,4%), enquanto as Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) foram menos suscetíveis à própolis, pois apresentaram uma concentração inibitória mínima variando de 4,5 a 8,0%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os efeitos das amostras de própolis coletadas em diferentes períodos sazonais.

A atividade antibacteriana de um extrato aquoso-etanólico de própolis proveniente de Minas Gerais e de suas frações obtidas por cromatografia foi verificada por Santos et al. (2002), empregando as seguintes bactérias anaeróbias: *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *F. necrophorum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *E. lentum*, *P. anaerobius*. Os resultados mostraram a suscetibilidade de todas as bactérias testadas ao extrato de própolis, mas nenhuma das frações isoladas foi igualmente ou mais efetiva que o extrato, sugerindo ser a atividade antimicrobiana da própolis decorrente do sinergismo dos efeitos dos seus componentes.

As frações com atividade antimicrobiana de uma própolis brasileira foram analisadas por Sawaya et al. (2004). Essa própolis, proveniente do estado de São Paulo, foi submetida à extração usando vários solventes, resultando em extratos com diferentes

composições. Esses extratos foram estudados pela Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A análise bioautográfica das placas de CCD permitiu identificar as frações com atividade antimicrobiana, que foram então avaliadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Ensaio *in vitro* para avaliar a atividade de própolis frente a bactérias Gram-positivas – *Staphylococcus aureus* (sp., 13150, 6534), *Staphylococcus epidermidis* (A, B, 25212, 12228), *Streptococcus pyogenes* (sp., T23, 1500), *Streptococcus mutans* (sp., 1910), *Streptococcus salivarius* (sp., 0365) e *Streptococcus sobrinus* – foram comparados para determinar qual renderia os resultados mais consistentes. A atividade bactericida desses extratos foi analisada por diluição seriada em tubos e por testes de difusão em ágar. O método de diluição em tubos permitiu obter os resultados mais consistentes, e a Concentração Inibitória Mínima dos extratos variou entre 2,5 e 20,0 mg/mL para as espécies de bactérias Gram-positivas testadas. Os resultados do método de difusão em ágar foram diretamente proporcionais à hidrossolubilidade dos extratos e não avaliaram a atividade bactericida corretamente. A atividade bactericida dessa amostra resultou da combinação de vários componentes, identificados pela CLAE, que foram extraídos preferencialmente usando etanol 50% como solvente.

Lu et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana da própolis coletada em diferentes períodos do ano e de regiões distintas em Taiwan contra *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos confirmaram atividade antimicrobiana da própolis contra *S. aureus*, sendo que a própolis variou de acordo com a região e o período da coleta.

Na Odontologia, a própolis tem sido utilizada em experimentos nas áreas de Endodontia, Cariologia, Cirurgia Oral, Periodontia e Patologia Oral e, segundo Manara et al. (1999), a atuação positiva da própolis mostrou-se evidente para reorganização tecidual em nível superficial e ação anti-inflamatória, assim como ação antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana *in vitro* de pastas contendo extrato de própolis associado ao hidróxido de cálcio –  $\text{Ca(OH)}_2$  – foi avaliada por Rezende (2008), considerando amostras de materiais coletados de 16 canais radiculares de dentes decíduos com necrose pulpar e fístula. As substâncias utilizadas foram:

- Amostra 1 = extrato etanólico de própolis (EEP) +  $\text{Ca(OH)}_2$ ;
- Amostra 2 = extrato de própolis sem álcool (EP) +  $\text{Ca(OH)}_2$ ;
- Amostra 3 =  $\text{Ca(OH)}_2$  + propilenoglicol;
- Amostra 4 = EEP;
- Amostra 5 = EP

A amostra 1 apresentou uma zona de inibição maior que as amostras 3 e 5 ( $p < 0,05$ ), e não houve diferença significativa em relação à amostra 4 ( $p = 0,10$ ). A amostra 2 apresentou uma atividade antimicrobiana maior do que as amostras 3, 4 e 5 ( $p < 0,05$ ). A amostra 2 mostrou inibição ligeiramente maior que a amostra 1 ( $p=0,053$ ). Os resultados demonstraram que a associação entre própolis e hidróxido de cálcio foi efetiva no controle de infecções dentárias *in vitro*.

## 2.2 HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

O hidróxido de cálcio é uma base forte obtida a partir da calcinação (aquecimento) do carbonato de cálcio até sua transformação em óxido de cálcio (cal viva); com a hidratação do óxido de cálcio, chega-se ao hidróxido de cálcio (BRAUER, 1963, apud BUDVARI, 1996) e seu registro no Chemical Abstract Service (CAS) é o de número 1305-62-0. Para Barreto et al. (2005), o hidróxido de cálcio é pouco solúvel em água, apresenta-se



sob a forma de um pó branco e tem sido recomendado como medicação intracanal devido ao fato de promover um selamento físico provisório do canal radicular que possui atividade antibacteriana e por induzir a formação de tecido mineralizado. Segundo Estrela et al. (1995), o sucesso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal é decorrente de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila, o que estabelece seu elevado pH (12.6) e o efeito desses íons sobre os tecidos e os microrganismos. O hidróxido de cálcio tem resistido ao tempo graças a duas expressivas propriedades enzimáticas: a inibição de enzimas bacterianas a partir da ação em nível de membrana citoplasmática, conduzindo ao efeito antimicrobiano e a ativação enzimática tecidual, observada por sua ação sobre a fosfatase alcalina, gerando efeito mineralizador (ESTRELA et al., 1994).

O hidróxido de cálcio é a medicação mais empregada, discutida e estudada em Endodontia (ESTRELA, 1997). O poder antimicrobiano do hidróxido de cálcio depende da velocidade de liberação de íons hidroxila e do tempo de contato no interior do sistema de túbulos dentinários pela sua difusão (ESTRELA, 1997). A dissociação iônica do hidróxido de cálcio em íons cálcio e hidroxila propicia a difusão desses íons cálcio e hidroxila pela dentina e favorece a elevação do pH do meio até valores que chegam a 12,6, produzindo um ambiente alcalino, o que favorece a atividade antimicrobiana pela alteração no crescimento, no metabolismo e na divisão celular bacteriana. A alteração na divisão celular bacteriana é causada pela injúria química produzida aos componentes orgânicos e ao transporte de nutrientes ou pela destruição dos fosfolipídeos ou de ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática (ESTRELA, 1997). Além disso, possibilita a ativação da fosfatase alcalina, enzima fundamental para o processo de reparo ósseo dentinário, pois os íons cálcio permitem a redução da permeabilidade de novos capilares no tecido de granulação de dentes desvitalizados, diminuindo a quantidade de líquido intercelular e ativando a aceleração da

pirofosfatase, membro do grupo das enzimas fosfatases, a qual exerce um papel no processo de mineralização (ESTRELA et al., 1994).

O pH é um fator químico capaz de alterar o metabolismo enzimático das bactérias, afetando o transporte químico através da membrana citoplasmática (ESTRELA et al., 1994). Também em decorrência do elevado pH, o hidróxido de cálcio se torna potencialmente tóxico e pode provocar uma inflamação crônica e necroses celulares *in vivo* (AL-SHAHER et al., 2004).

Para que a medicação intracanal seja adequada à aplicação clínica, é necessário que ela seja de fácil inserção no canal, favorecendo o contato com os tecidos e de fácil remoção. Assim, as propriedades físico-químicas do medicamento apresentam uma relação direta com sua eficácia (BASRANI et al., 2004), pois essas propriedades afetam o comportamento dos materiais endodônticos. A velocidade de dissociação iônica, a penetração dos íons hidroxila e o poder antimicrobiano da medicação também são influenciados pela diferença de viscosidade dos veículos empregados, sua hidrossolubilidade ou não, e pela proporção pó-líquido das pastas (ESTRELA; PESCE, 1996). Assim, o acréscimo de diferentes veículos à pasta de hidróxido de cálcio tem por objetivo melhorar algumas de suas propriedades, como a ação antimicrobiana, a velocidade de dissociação iônica e propriedades físico-químicas, favorecendo as condições clínicas para seu emprego (ESTRELA, 1997). Os veículos influenciam na eliminação bacteriana do interior dos túbulos, uma vez que os veículos aquosos, tais como água destilada e soro fisiológico, têm a capacidade de elevar o pH. A diferença está no fato de os veículos aquosos chegarem ao pH de aproximadamente 12,6 mais rapidamente; os veículos não aquosos, como o propilenoglicol e o polietilenoglicol, chegam a esse mesmo valor em maior tempo por produzirem uma dissociação e difusão iônica mais lenta. A maior velocidade de dissociação e difusão iônica das pastas de hidróxido

de cálcio resultam em maior facilidade de eliminação bacteriana do interior dos túbulos dentinários (ESTRELA et al., 1994).

No entanto, para que o efeito do medicamento seja letal torna-se necessário o tempo hábil de ação para expressar sua efetividade antimicrobiana, e seja capaz de atuar à distância, não apenas com vistas a um efeito antimicrobiano, mas também frente à necessidade de atuar contra reabsorções dentinárias radiculares (ESTRELA, 1997). Segundo Siqueira-Jr e Lopes (1999), para o hidróxido de cálcio agir efetivamente como medicação intracanal, os íons hidroxila devem ser capazes de difundir pela dentina e tecidos pulpaes remanescentes em concentrações suficientes e alcançar o pH necessário para destruir as bactérias no interior do canal e túbulos dentinários.

A pasta de hidróxido de cálcio tem sido preparada com vários veículos, a saber: solução aquosa de metil celulose, água destilada, solução fisiológica, solução anestésica, polietilenoglicol, propilenoglicol, paramonoclorofenol canforado, óleo de oliva (ESTRELA; PESCE, 1996). De acordo com Estrela (1997), a variedade de veículos empregados nas pastas de hidróxido de cálcio demonstra a ausência de consenso entre a substância que deve ser eleita para associar ao hidróxido de cálcio pró-análise, com vistas a melhorar algumas de suas propriedades.

A análise química da liberação de íons cálcio e hidroxila de pastas de hidróxido de cálcio preparadas com três veículos aquosos com características ácido-básicas diferentes, através de implantes subcutâneos de tubos de polietileno em tecido conjuntivo de cães foi realizada por Estrela e Pesce (1996). A liberação de íons cálcio e hidroxila foi avaliada em períodos de 7, 30, 45 e 60 dias. Os três veículos utilizados foram: salina, anestésico e polietilenoglicol 400. A análise química foi realizada com o auxílio de um condutivímetro. A liberação de íons hidroxila foi determinada por analogia aos íons cálcio liberados, os quais foram diretamente proporcionais ao peso molecular do hidróxido de cálcio.

Os autores observaram que o veículo que apresentou maior liberação no período de 60 dias foi o anestésico, com estabilização nos períodos de 45 e 60 dias. A pasta com salina apresentou valores intermediários quando comparada com as outras pastas nos períodos de 30 a 60 dias, e o polietilenoglicol 400 apresentou o menor percentual inicial de liberação de íons cálcio; a liberação foi gradual e uniforme nos outros períodos.

A difusão de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{OH}^-$  de materiais endodônticos à base de hidróxido de cálcio -  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , foi avaliada por Nunes e Rocha (2005) através da raiz intacta de 46 dentes decíduos instrumentados até a lima número 40, irrigados com solução de hipoclorito de sódio 1%, e secos com cones de papel absorvente. Os dentes foram separados em 4 grupos de 10 conforme o material obturador, e um grupo controle com 6 dentes permaneceu vazio. Os materiais utilizados como obturadores foram: pasta espessada de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  associado ao propilenoglicol (CaPE) na proporção de 0,4 g de pó para 0,2 mL de líquido; pasta da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – mistura de 0,3 g de óxido de zinco, 0,3 g de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e 0,2 mL de óleo de oliva); Vitapex<sup>®</sup> e Sealapex<sup>®</sup>. Após a obturação, todos os dentes tiveram o forame e terço apical selado com Araldite<sup>®</sup>, e o acesso coronal selado com ionômero de vidro, permanecendo em frascos individuais com a raiz submersa em solução fisiológica, em estufa a 37°C em 100% de umidade. A análise da difusão de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{OH}^-$  foi realizada por meio de um pHmetro calibrado e um espectrômetro de absorção atômica, respectivamente, em 48h e em 7, 30, 45 e 60 dias. Conforme o teste estatístico ANOVA para a avaliação do pH, o grupo CaPE apresentou valor estatisticamente significativo em relação aos outros grupos ( $p < 0,0001$ ), e a maior difusão de íons  $\text{OH}^-$ , ocorreu em 60 dias ( $p < 0,0309$ ). Em relação à quantidade de íons  $\text{Ca}^{+2}$  liberados, a pasta CaPE foi a que mostrou melhores resultados, seguida pela pasta UFSC. Conclui-se que a pasta CaPE foi o material obturador que mais difundiu íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{OH}^-$ .

O efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias foi estudado por Estrela et al. (1994) por meio da análise individual da concentração de íons hidrogênio, da composição estrutural das paredes das bactérias Gram-negativas, do efeito do pH na atividade enzimática dessas bactérias e das considerações em torno das atividades enzimáticas do hidróxido de cálcio. A tentativa de explicação do mecanismo de ação do pH no controle da atividade enzimática bacteriana permitiu levantar a hipótese de uma inativação enzimática irreversível em condições extremas de pH em longos períodos de tempo, decorrente da reação de oxidação que leva à desnaturação protéica.

A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio *in vitro*, em associação com diferentes veículos frente a patógenos endodônticos pelo teste de difusão em caldo, foi analisada por Vianna et al. (2005). Pastas com pó de  $\text{Ca(OH)}_2$  e os seguintes veículos: água destilada, glicerina, PMCC (paramonoclorofenol canforado), PMCC + glicerina, e PMCC + polietilenoglicol foram preparadas. Foi necessário de 6 a 24 h para eliminar os microrganismos aeróbios e facultativos e de 30 s a 5 min para os anaeróbios estritos. A suscetibilidade microbiana em ordem crescente foi: *E. faecalis* (patógeno mais resistente), *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermedia*. Concluiu-se que as pastas de hidróxido de cálcio necessitaram de maior tempo para eliminar os microrganismos facultativos do que os anaeróbios. Para os autores, os achados sugeriram que a propriedade antimicrobiana está relacionada tanto à formulação da pasta quanto à suscetibilidade microbiana.

O potencial antimicrobiano das seguintes substâncias: hidróxido de cálcio + solução salina; hidróxido de cálcio + iodofórmio + solução salina; iodofórmio + solução salina foi comparado por Estrela et al. (2006). Os testes empregados foram o de difusão em ágar e o de exposição direta sobre *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans*. As pastas contendo hidróxido de cálcio e solução salina, hidróxido de cálcio-

iodofórmio e solução salina mostraram significativa atividade antimicrobiana nos métodos experimentais estudados. A pasta contendo iodofórmio e solução salina foi inefetiva pelo teste de difusão em ágar e, também, por exposição direta, para o *B. subtilis*.

A reação inflamatória provocada por três pastas medicamentosas – pasta de hidróxido de cálcio, pasta de própolis e pasta de hidróxido de cálcio/própolis – em tecido subcutâneo de ratos foi pesquisada por Oliveira (2004). Nove ratos foram utilizados e distribuídos com o período de sacrifício: 7, 21 e 42 dias. As pastas foram veiculadas em tubos de dentina, os quais foram implantados em tecido subcutâneo, na região dorsal, escapular e pélvica. Os resultados foram classificados de acordo com a severidade da reação inflamatória e quantificados em relação ao número de células presentes. Concluiu-se, no estudo, que as pastas avaliadas apresentaram-se como irritantes ao tecido conjuntivo do rato, permitindo, no decorrer do período, colagenização progressiva da cápsula inflamatória junto à abertura tubular, não atingindo a evolução ideal caracterizada junto às paredes do tubo de dentina (controle). Comparando a somatória de eventos histopatológicos, observou-se que a associação hidróxido de cálcio/própolis apresentou menor potencial irritativo.

Uma retrospectiva da literatura sobre hidróxido de cálcio baseada em evidências científicas foi realizada por Estrela e Holland, em 2003. Os autores concluíram que: 1. A dentina é considerada a melhor proteção pulpar, e o hidróxido de cálcio provou sua capacidade de induzir a formação de barreira mineralizada sobre o tecido pulpar. 2. É necessário, sempre que possível, dar tempo à pasta de hidróxido de cálcio para manifestar seu potencial de ação, sendo que a manutenção de alta concentração dos íons hidroxila pode promover a inativação da atividade enzimática bacteriana. 3. O sítio de ação dos íons hidroxila e cálcio incluem as enzimas presentes na membrana citoplasmática, tendo assim um amplo espectro de ação, independentemente da capacidade metabólica dos microrganismos. As membranas citoplasmáticas são similares, independentemente das características

morfológicas, tintoriais e respiratórias dos microrganismos, atuando de forma similar sobre bactérias aeróbias, anaeróbias, Gram-positivas e Gram-negativas. 4. O hidróxido de cálcio como medicação intracanal, entre sessões, promove melhores resultados no processo de reparação periapical do que o tratamento em sessão única.

### **2.3 MICRORGANISMO IMPORTANTE NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS – O *Enterococcus faecalis***

A maioria das infecções endodônticas é mista e polimicrobiana com predomínio de anaeróbios estritos. Entretanto, tem-se verificado a presença do *E. faecalis* em canais infectados, um facultativo, causando infecções de difícil tratamento (DOTTO et al., 2006). O *E. faecalis* produz hemolisina, gelatinase e substância de agregação de enterococos (EAS) que contribuem na patogenicidade dessa bactéria; contudo, o mecanismo pelo qual *E. faecalis* consegue resistir à ação dos medicamentos usados no tratamento endodôntico não é totalmente esclarecido (BORTOLINI, 2006). É importante considerar que os microrganismos endodônticos não se restringem somente àqueles presentes na luz do canal principal, mas também aos residentes no interior dos túbulos e ramificações dentinárias (ESTRELA, 1997).

Os *E. faecalis* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, encontrados isolados, aos pares ou em cadeias curtas (RÔÇAS et al., 2004). A escolha da bactéria *E. faecalis* se deu por ser um microrganismo geralmente resistente ao processo de sanificação do canal e presente em grande parte dos dentes tratados endodonticamente que apresentaram falhas. Para Bortolini (2006), entre os microrganismos envolvidos em casos de insucesso no tratamento endodôntico, o *E. faecalis* destaca-se pela frequência em que é encontrado. Essa

espécie também está associada a periodontites apicais recorrentes e é de difícil eliminação nos canais radiculares (TANRIVERDI et al., 1997). Um possível mecanismo capaz de explicar como o *E. faecalis* pode sobreviver e crescer dentro dos túbulos dentinários e reinfectar o canal de dentes já obturados seria a capacidade dessa bactéria de invadir os túbulos dentinários, aderir ao colágeno na presença de soro humano e ser capaz de se manter viável em pH elevado (ESTRELA; HOLLAND, 2003). Para Estrela (1997), no que diz respeito ao pH, existem poucas espécies de bactérias que podem crescer em pH menor que 2 ou maior que 10. Segundo o autor, é possível haver uma inativação enzimática irreversível observada em condições extremas de pH, por longos períodos de tempo, promovendo a total perda da atividade biológica (ESTRELA, 1997).

A efetividade antimicrobiana de medicamentos intracanaís *in vitro* frente ao *E. faecalis* foi estudada por Dotto et al. (2006) com o objetivo de verificar o comportamento do hidróxido de cálcio associado a diferentes substâncias: o hidróxido de cálcio com propilenoglicol, o hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado (PMCC) e propilenoglicol, a pasta Calen, a pasta Calen associada ao PMCC, o hidróxido de cálcio associado ao iodofórmio e propilenoglicol, o iodofórmio e propilenoglicol e, por último, hidróxido de cálcio com anestésico. Através da verificação de halos de difusão e de inibição foi constatada a presença de halos de inibição para o iodofórmio e propilenoglicol e para a associação hidróxido de cálcio, PMCC e propilenoglicol. Os resultados demonstraram que o hidróxido de cálcio associado a outros veículos foi ineficaz em formar halos de inibição microbiana. Segundo os autores, o responsável por essa ação em profundidade foi o PMCC liberado da pasta. Também foi verificada a inefetividade do hidróxido de cálcio contra essa bactéria, sendo o PMCC e o iodofórmio os responsáveis pela formação dos halos de inibição do crescimento bacteriano apesar de a formulação Calen/PMCC não se mostrar efetiva no presente estudo, contra o *E. faecalis*.



A associação de *E. faecalis* com diferentes formas de lesões perirradiculares foi estudada por Rôças et al. (2004). Os dados revelaram que o *E. faecalis* é isolado, ocasionalmente, de infecções endodônticas primárias, porém é frequentemente reconhecido em falhas de tratamento. As amostras foram obtidas de casos de dentes não tratados com lesões crônicas perirradiculares assintomáticas, periodontites apicais agudas ou abscessos perirradiculares agudos e de dentes obturados associados com lesões perirradiculares crônicas assintomáticas. O DNA foi extraído das amostras e identificado utilizando Reação em Cadeia pela Polimerase. A espécie apareceu em sete de 21 canais radiculares associados com lesões crônicas perirradiculares assintomáticas, em um de 10 canais radiculares associados com periodontites apicais agudas e em um de 19 canais radiculares associados com abscessos perirradiculares agudos. *E. faecalis* foi detectado em 20 de 30 casos de infecções endodônticas persistentes associadas com dentes obturados. A análise estatística demonstrou que o *E. faecalis* está significativamente mais associado com casos assintomáticos do que com sintomáticos, verificando uma forte relação com infecções persistentes.

As infecções endodônticas com *E. faecalis* representam um problema para o tratamento devido à dificuldade de eliminá-lo do sistema de canais radiculares em decorrência de esse microrganismo poder existir como cultura pura, sem o suporte de outra bactéria, apresentar a capacidade de ocupar nichos ecológicos criados pela remoção de outros microrganismos e a capacidade de crescer em um ambiente pobre em nutrientes (RÔÇAS et al., 2004).

Motivados por essas propriedades inerentes ao *E. faecalis*, Portenier et al. (2005) resolveram comparar a suscetibilidade de células desses microrganismos durante: seu crescimento exponencial, fase estacionária e fase de inanição. Amostras de *E. faecalis* VP3-80 e A197A, em diferentes fases de crescimento, foram expostas a três medicamentos endodônticos: solução de hidróxido de cálcio saturada, digluconato de clorexidina a 0,05% e

hipoclorito de sódio 0,0001%. Os resultados mostraram que as células na fase de crescimento exponencial foram mais sensíveis aos três medicamentos e foram eliminadas entre 3 segundos a 10 min. As células em fase estacionária foram mais resistentes, pois células puderam ser recuperadas em 10 minutos. No entanto, células em fase de inanição foram as mais resistentes e não foram totalmente eliminadas pelas medicações durante os 10 minutos de teste.

Já Saleh et al. (2004) investigaram a eficácia antimicrobiana de diferentes cimentos endodônticos e do hidróxido de cálcio em tubos de dentina infectados por *E. faecalis*. Cinquenta e seis segmentos de raízes de dentes humanos foram enlanguescidas até a broca esterilizada Largo Peeso Reamer 2 (ISO 090) e, após o tratamento com EDTA a 17% e hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5% por 4 min cada, os tubos foram infectados com *E. faecalis* por 3 semanas. As raízes foram divididas em 8 grupos e preenchidas com gutta percha e cimento AH Plus - à base de resina (AH); cimento de Grossman - à base de óxido de zinco e eugenol (CG); Ketac-Endo - à base de ionômero de vidro (KE); Apexit - à base de hidróxido de cálcio (AP); RoekoSeal Automix - à base de silicone (RSA); ou RoekoSeal Automix com um primer experimental (RP), ou somente hidróxido de cálcio (HC). Um grupo foi deixado sem preenchimento para controle (CT). Após incubação a 37°C por 7 dias, os canais foram reinstrumentados com uma nova broca esterilizada Largo tamanho 2. Amostras de dentina de cada canal foram então coletadas usando nova broca esterilizada Largo Peeso Reamer tamanho 5 (ISO 150). O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado para cada amostra. A média de UFC em todos os grupos testados foi estatisticamente menor ( $P < 0,05$ ) do que a do grupo controle. Os canais preenchidos com AH e CG eliminaram as bactérias nos túbulos dentinários (média UFC = 0). A média de UFC para o grupo HC (0,53) foi menor do que dos grupos RSA, AP, RP e KE (1,36; 1,40; 1,46 e 1,94; respectivamente), mas somente a diferença entre o HC e o KE foi estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). Como conclusão, os autores verificaram que os canais preenchidos *in vitro* com gutta-percha e AH

ou CG foram efetivos na eliminação de *E. faecalis* dos túbulos dentinários. Os outros cimentos e o HC foram menos efetivos.

De acordo com Mah e O'Toole (2001), em biofilmes microbianos as respostas são diferentes das células planctônicas, uma vez que a resistência a agentes antimicrobianos é bastante aumentada nos biofilmes. Confirmando a difícil eliminação do biofilme, Estrela et al. (2007) avaliaram a eficácia antimicrobiana de água ozonizada, gás ozônio, hipoclorito de sódio a 2,5% e clorexidina a 2% em canais radiculares humanos infectados com *E. faecalis*. Trinta incisivos superiores foram preparados e inoculados com *E. faecalis* por 60 dias e, sequencialmente, as soluções irrigadoras foram testadas em um fluxo constante 50 mL/min por 20 min. Depois, as amostras dos canais radiculares foram coletadas e imersas em 7 mL de Lethen Broth (LB), seguidas de incubação a 37 °C por 48 h. Posteriormente, 0,1 mL do inóculo obtido do LB foi transferido para 7 mL de *Brain Heart Infusion* e incubado a 37°C por 48 h. O crescimento bacteriano foi checado pela turbidez do meio de cultura e realizado em triplicata. Nenhuma solução utilizada demonstrou eficácia antimicrobiana, sendo ineficiente contra *E. faecalis*.

A eliminação *in vitro* do biofilme de *E. faecalis* em pré-molares inferiores humanos após o preparo químico-mecânico seguido ou não de curativo de hidróxido de cálcio foi verificada por Gurgel-Filho et al. (2007). Após 60 dias de contaminação com *E. faecalis* os canais radiculares foram preparados à irrigação com clorexidina em gel a 2%. O grupo tratado em duas sessões recebeu medicação intracanal de hidróxido de cálcio por 14 dias (Calen™), e o grupo de sessão única não recebeu medicação. A utilização da clorexidina em gel a 2% sem emprego da medicação intracanal reduziu em 100% a contaminação por *E. faecalis*. O grupo que recebeu a medicação intracanal de hidróxido de cálcio por 14 dias permitiu o crescimento de pequeno número de bactérias entre as sessões, mas sem diferença estatística entre os grupos.

Para Nair et al. (2005), a complexidade anatômica do sistema dos canais radiculares e a presença de biofilme em áreas inacessíveis dificultam a remoção dos microrganismos pela instrumentação e irrigação em tratamentos endodônticos de apenas uma sessão. Um adequado preparo químico-mecânico do canal para tratar dentes com necrose, removendo o biofilme e reduzindo a contaminação microbiana para a menor possível, é imprescindível para os autores, com o fim de se obter um prognóstico mais favorável.

A presente revista da literatura fundamenta a possibilidade de se associar própolis e hidróxido de cálcio em busca de um medicamento efetivo e biocompatível para ser utilizado como medicação intracanal para dentes decíduos e permanentes e como agente obturador de pulpectomias de dentes decíduos, contribuindo assim para a prática odontológica fundamentada em evidências científicas.

### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar as propriedades físico-químicas (pH, condutividade e viscosidade) e a atividade antimicrobiana de um medicamento experimental à base de própolis e hidróxido de cálcio contra *E. faecalis*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para verificar a possibilidade de utilização, em Endodontia, de um medicamento formulado à base de própolis e hidróxido de cálcio com proporções padronizadas, comparando os resultados com medicamentos contendo hidróxido de cálcio ou própolis, este estudo consistiu das seguintes etapas:

- Analisar o pH, a condutividade e a viscosidade dessa associação.
- Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima do medicamento desenvolvido sobre *E. faecalis*, pelo método de diluição em ágar.
- Verificar a eficácia antimicrobiana *in vitro* do medicamento experimental sobre dentina humana infectada com *E. faecalis*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DESENVOLVIMENTO DO MEDICAMENTO EXPERIMENTAL

O desenvolvimento do medicamento experimental (ME) ocorreu no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Foram manipuladas diferentes proporções de extrato seco de própolis (Apis Flora<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP), hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica<sup>®</sup>, Ibiporã, PR) e propilenoglicol (Henrifarma<sup>®</sup>, São Paulo, SP), até que se atingisse a consistência ideal para uso em Endodontia, ou seja, semelhante a do creme dental (ESTRELA et al., 1999). Dessa forma, a formulação final do ME proposto nesta pesquisa contém 10% de própolis, 40% de hidróxido de cálcio e 50% de propilenoglicol.



Fig 1 – Extrato seco de própolis, hidróxido de cálcio P.A. e propilenoglicol.

Os componentes do ME foram pesados em balança analítica de alta precisão (AG 200 – Gehaka) e equiparados à proporção obtida com a colher-medida e o conta-gotas utilizados rotineiramente nas embalagens de cimentos odontológicos restauradores e

endodônticos. Assim, verificou-se que, para 1 grama do ME, a composição obedece à seguinte proporção:

- extrato seco de própolis (10%): 0,1 g ou 1 colher-medida;
- hidróxido de cálcio P.A. (40%): 0,4 g ou 4 colheres-medida;
- propilenoglicol (50%): 0,5 g ou 12 gotas.

A espatulação, após a pesagem dos componentes, foi realizada em pequena área sobre placa de vidro e com espátula 24, acrescentando paulatinamente as gotas de propilenoglicol até a obtenção da consistência desejada. Em seguida, procederam-se as análises físico-químicas da mistura em questão.



Fig 2 – Extrato de própolis: 1 colher-medida.



Fig 3 – Extrato de própolis: 0,1 g.



Fig 4 – Hidróxido de cálcio P.A.: 4 colheres-medida.



Fig 5 – Hidróxido de cálcio P.A.: 0,4 g.



Fig 6 – Propilenoglicol: 12 gotas.



Fig 7 – Propilenoglicol: 0,5 g



Fig 8 – Junção dos componentes.

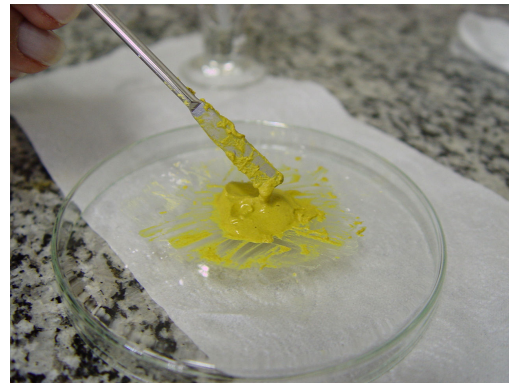


Fig 9 – Espatulação dos componentes.



Fig 10 – Aspecto final do ME.

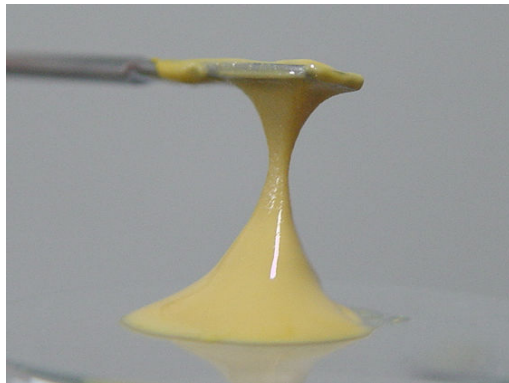


Fig 11 – Consistência desejada do ME.

### 3.2 SUJEITOS DA PESQUISA



Esta pesquisa foi conduzida empregando-se material biológico extraído de humanos (dentes), e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Goiás, protocolo número 62/2006 (Anexo A). Os dentes foram coletados a partir de doações de consultórios odontológicos e do Banco de Dentes pertencente ao Centro de Ensino e Pesquisa Odontológica do Brasil (CEPOBRAS), após obtenção do consentimento livre e esclarecido para a doação de dentes (Apêndices A e B).

Os dentes utilizados na pesquisa foram provenientes de 42 indivíduos, crianças ou adultos. As extrações dentárias foram realizadas por motivos variados que não permitiam a manutenção do dente na arcada dentária – por exemplo, lesão de cárie extensa sem possibilidade de restaurar, doença periodontal avançada ou indicação ortodôntica. Os dentes decíduos tinham pelo menos dois terços de raiz e ausência de perfuração na parede radicular e na área de bifurcação. Os dentes permanentes tinham rizogênese completa e ausência de reabsorção. Foram necessárias 42 raízes provenientes de 21 dentes decíduos e 21 dentes permanentes.

### **3.3 MATERIAL**

O ME testado tem como composição extrato seco de própolis (10%) + hidróxido de cálcio P.A. (40%) + propilenoglicol (50%).

A amostra bacteriana utilizada nesta pesquisa foi *E. faecalis*, ATCC 29212.

Os equipamentos para a análise das propriedades físico-químicas foram provenientes do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFG.

Os experimentos microbiológicos utilizaram equipamentos e materiais dos Laboratórios de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG e do CEPOBRAS. Em todas as etapas experimentais, a técnica asséptica foi valorizada, e os ensaios foram efetuados em duplicata.

### **3.4 PROCEDIMENTOS PARA COLETA E ANÁLISE DOS DADOS**

#### **3.4.1 Propriedades físico-químicas**

Para a comparação e avaliação das propriedades físico-químicas das diferentes associações medicamentosas, detalhadas a seguir, foram utilizados 5 gramas dos seguintes medicamentos em cada experimento:

1. própolis (10%) + hidróxido de cálcio (40%) + propilenoglicol (50%) – (ME);
2. hidróxido de cálcio (50%) + propilenoglicol (50%);
3. hidróxido de cálcio (50%) + água destilada (50%);
4. própolis (50%) + propilenoglicol (50%);
5. própolis (50%) + água destilada (50%);

##### **3.4.1.1 pH**

Cada medicamento foi adicionado isoladamente a 5 mL de água destilada. Após a homogeneização, cada mistura foi deixada inativa a 25°C. O pH dos medicamentos foi então avaliado após 1 hora, 24 horas e 7 dias da preparação inicial através da utilização de um

pHmetro digital (Gehaka, PG 1000) juntamente com agitação magnética, permitindo uma análise dos valores variando entre 0 e 14.

#### **3.4.1.2 Condutividade**

Após a homogeneização dos 5 g de cada medicamento a 25°C, a condutividade elétrica foi mensurada pelo condutivímetro (Modelo Tec-4MP), tendo como unidade de medida o microSiemens por centímetro digital ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). A condutividade indica a facilidade com a qual um material é capaz de conduzir uma corrente elétrica, ou seja, o fluxo de qualquer carga elétrica, caracterizando a dissociação iônica através de uma diferença de potencial.

#### **3.4.1.3 Viscosidade**

A viscosidade de cada medicamento (5 g) foi medida a 25°C em quatro diferentes velocidades (5, 10, 20 e 50 RPM – rotações por minuto) e registrada em centiPoise (cP). Para isso, utilizou-se o viscosímetro digital Brookfield (Modelo RVDV-I). A resistência do produto à deformação causada pelo torque variou de acordo com a velocidade que a haste número 4 girou no interior do produto.

#### **3.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Para determinação da CIM do medicamento experimental, os 5 grupos de medicamentos foram comparados, e um sexto grupo representado pelo propilenoglicol funcionou como controle negativo.

O *E. faecalis* foi cultivado no meio de cultura sólido *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), e decorridas 24 horas de incubação à temperatura de 37° C, as células microbianas foram suspensas em solução fisiológica a 0,5% (Halex Istar, Goiânia, GO, Brasil) esterilizada. A suspensão teste foi ajustada com auxílio do mesmo diluente, ao tubo número 1 da escala de MacFarland, na concentração aproximada de  $3 \times 10^8$  células por mL.

A determinação da CIM dos produtos estudados foi realizada através de diluições seriadas utilizando 5 mL de caldo BHI esterilizado para se obter concentrações variando entre 80 mg a 2,5 mg de cada medicamento por mL do caldo. Os tubos foram inoculados com 1 µL da suspensão bacteriana, homogeneizados e incubados a 37° C por 48 horas. O grupo controle foi constituído pelo meio de cultura utilizado (caldo BHI) sem a adição do inóculo, para avaliar a qualidade/esterilidade do meio.

Após o período de incubação, colocou-se 2,5 mL do material de cada tubo em um segundo tubo contendo 2,5 mL de caldo BHI esterilizado e homogeneizado. Repetiu-se progressivamente esse procedimento para cada tubo. Ao final, todos os tubos foram incubados por 24 horas a 37° C.

Após o período de incubação, o material foi analisado macroscopicamente na forma descritiva quanto à presença ou ausência de turvação, indicativa ou não de multiplicação da bactéria. Decorrida a leitura dos resultados prévios, 25µL de cada suspensão foram transferidos para Placas de Petri medindo 15 x 60 mm contendo 15 mL ágar BHI

esterilizado. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C para confirmar os valores da CIM.

A CIM foi determinada como a menor concentração do medicamento capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano.

### **3.4.3 Eficácia antimicrobiana sobre dentina infectada**

A atividade antimicrobiana do medicamento contendo própolis e hidróxido de cálcio foi determinada em tubos de dentina infectados por *E. faecalis*. A amostra bacteriana (*E. faecalis*) foi cultivada no meio de cultura sólido (ágar BHI) e incubada à 37° C por 24 h. A suspensão com microrganismos em salina foi ajustada ao tubo 1 da escala de MacFarland ( $3 \times 10^8$  células/mL).

Foram selecionadas 42 raízes palatinas provenientes de 21 primeiros molares superiores decíduos extraídos e 21 primeiros molares superiores permanentes extraídos. Todos os dentes tiveram as coroas removidas na junção cimento-esmalte. Blocos de 4 mm e 5 mm de comprimento para dentes decíduos e permanentes respectivamente foram cortados das raízes palatinas com disco diamantado # 7020 (KG Sorensen, São Paulo, Brasil) em baixa-rotação sobre refrigeração. Os blocos tiveram o cimento removido por uma broca cilíndrica diamantada # 3101 (KG Sorensen) em alta-rotação sobre refrigeração.

Cada bloco de dentina foi individualmente instrumentado, com o auxílio das limas K-files #15 a #30 para os dentes decíduos e K-files #15 a #40 (Maillefer<sup>®</sup>, Switzerland) para dentes permanentes. Em seguida, os blocos foram alargados com brocas Gates-Guidden números 2 para dentes decíduos e 3 para dentes permanentes. Os blocos foram

continuamente irrigados com hipoclorito de sódio a 1% (Miyako<sup>®</sup>, Guarulhos, SP, Brasil) durante a preparação mecânica. Os blocos foram secos e preenchidos com EDTA a 17% (pH 7,2) por 3 minutos; após, foram limpos e esterilizados em autoclave (30 minutos à 120°C).

Posteriormente, os dentes decíduos foram reunidos em 7 grupos contendo 3 blocos de dentina cada um. A mesma forma se procedeu com os dentes permanentes. Cada grupo foi submetido a diferentes tratamentos experimentais conforme mostra o Quadro 1.

Todos os grupos de blocos, exceto os do controle negativo, foram inoculados com *E. faecalis*. Esse procedimento foi repetido a cada 72 horas por 60 dias, sempre usando novas culturas de 24 horas, preparadas e ajustadas à escala 1 de MacFarland. Os blocos foram mantidos em ambiente úmido a 37°C.

Passados os 60 dias, dois grupos (um de 3 blocos de dentes decíduos e um de 3 blocos) foram separados como controle positivo para checar a viabilidade bacteriana do experimento. Os outros blocos foram irrigados com 5 mL de salina, secos com duas gazes e quatro cones de papel absorventes esterilizados e completamente preenchidos com o medicamento. Em seguida, foram colocados em Placas Petri contendo 1 grama do medicamento (suficiente para recobrir totalmente os blocos) e mantidos durante intervalo de 30 dias a 37°C. Após esse período, os blocos foram individualmente lavados com 10 mL de salina estéril e imersos em tubos respectivos com 7 mL de Letheen Broth (Difco, USA), homogeneizados e incubados à 37°C por 48 horas. O crescimento microbiano foi avaliado pela turbidez do meio de cultura. Um inóculo de 0,1 ml obtido do Letheen Broth foi transferido para 7 ml de BHI, e incubado nas mesmas condições descritas. O crescimento microbiano foi novamente avaliado pela turbidez do meio de cultura. Cada bloco foi classificado em positivo ou negativo, de acordo com a viabilidade do *E. faecalis*.

Quadro 1 – Tratamentos experimentais para avaliação da atividade antimicrobiana dos medicamentos testados.

Grupos	Dentes decíduos (n)	Dentes permanentes (n)
própolis + hidróxido de cálcio + propilenoglicol	3	3
hidróxido de cálcio + propilenoglicol	3	3
hidróxido de cálcio + água destilada	3	3
própolis + propilenoglicol	3	3
própolis + água destilada	3	3
Controle negativo*	3	3
Controle positivo**	3	3

---

PERÍODO DE AVALIAÇÃO (DIAS)

30

30

---

\* Controle negativo: blocos não inoculados, não preenchidos com medicamento, mantidos em ambiente úmido e então transferidos para o BHI esterilizado e mantidos à 37°C.

\*\* Controle positivo: blocos inoculados, não preenchidos com medicamento, mantidos em ambiente úmido e então transferidos para o BHI esterilizado e mantidos à 37°C.

### **3 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **3.1 ARTIGO I: PHYSICOCHEMICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF AN ASSOCIATION OF CALCIUM HYDROXIDE WITH PROPOLIS AS ENDODONTIC MEDICAMENT**



**PHYSICOCHEMICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF AN  
ASSOCIATION OF CALCIUM HYDROXIDE WITH PROPOLIS AS ENDODONTIC  
MEDICAMENT**

**Giovanna Pires da Silva Ribeiro de REZENDE<sup>1</sup>, Luciane Ribeiro de Rezende  
Sucasas da COSTA<sup>2</sup>, Luciana Ferreira Fonseca Rodovalho<sup>3</sup>, Eliana Martins  
Lima<sup>4</sup>, Fabiana Cristina PIMENTA<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> DDS, MSc, Health Sciences Postgraduate Program, Federal University of Goiás and University of Brasilia, Goiania GO, Brazil

<sup>2</sup> DDS, MS, PhD, Associate Professor, School of Dentistry, Federal University of Goiás, Goiania GO, Brazil

<sup>3</sup> PharmD, MS, School of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiania, Brazil

<sup>4</sup> PharmD, MS, PhD, School of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiania, Brazil

<sup>5</sup> DDS, MS, PhD, Department of Microbiology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiania, Brazil

Correspondence address: Dr. Luciane R. R. S. Costa, Faculdade de Odontologia/UFG, Primeira Avenida s/n, Setor Universitario, Goiania GO, Brasil, 74605-220

e-mail: lsucasas@odonto.ufg.br

phone: 55 62 3204-2065

fax: 55 62 3209-6065

**PHYSICOCHEMICAL AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF AN  
ASSOCIATION OF CALCIUM HYDROXIDE WITH PROPOLIS AS ENDODONTIC  
MEDICAMENT**

**ABSTRACT**

The purpose of this study was to analyze the physicochemical (pH, conductivity, and viscosity) and the minimum inhibitory concentration (MIC) of a medicament containing calcium hydroxide and propolis. Samples of five medicaments were tested: 1 – Calcium hydroxide, propolis and propylene glycol; 2 – Calcium hydroxide and propyleneglycol, 3 – Calcium hydroxide and sterilized, deionied water, 4 – Propolis and propylene glycol, 5 – Propolis and sterilized distilled water. The pH was assessed after 1 and 24 hours and 7 days. The antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* (MIC) was performed utilizing broth microdilution method. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, Mann–Whitney U and Friedman tests compared the groups. The medicament 1 presented a mean pH of 12.44, low conductivity (mean 57.4  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), high viscosity (mean. 667.1 cP at 5 rpm), and a MIC of 10 mg/mL. It was concluded that the association of calcium hydroxide with propolis, although effective against *E. faecalis*, did not present satisfactory physicochemical properties to be used as temporary intracanal medication in primary or permanent teeth, but exhibited acceptable physicochemical properties to be potentially indicated as root canal filling of primary teeth.

**Key Words:** Calcium Hydroxide. Propolis. Physicochemical Analysis. *Enterococcus faecalis*.

## INTRODUCTION

Endodontic medicaments or pastes have been used as intracanal dressings or, specifically in primary teeth, as obturation agents for root canals. The aim of an intracanal dressing is to be effective against bacteria which may have escaped and survived after root canal preparation and to control the persistent exudate and the destructive action of the osteoclasts present in external dental resorption<sup>10</sup>. In permanent teeth, calcium hydroxide is the most frequently used intracanal medicament for all cases diagnosed with necrotic pulps in North America<sup>15</sup>, but it has limited effectiveness in eliminating bacteria from human root canal when assessed by culture techniques<sup>19</sup>. In primary teeth, the use of calcium hydroxide pastes to seal the root canals is still polemical, because calcium hydroxide has the disadvantage of being rapidly absorbed into the root canal<sup>16</sup>.

The mechanism of action of calcium hydroxide is directly correlated to its pH which is influenced by the concentration and rate of release of hydroxyl ions<sup>5</sup>. This results in enzymatic tissue activation, parting from alkaline phosphatase, and in addition, in the inactivation of enzymes of the cytoplasmic membrane of bacteria, which alters the integrity of the sites essential to bacterial metabolism, growth and cellular division<sup>4</sup>. Nevertheless, vehicles added to calcium hydroxide might influence its physicochemical properties and its antimicrobial effectiveness. As, calcium hydroxide is not effective against all bacterial species found in root canal infections, and an association with another medicament may enhance the efficacy of the intracanal medication in eliminating residual bacteria in the root canal system<sup>21</sup>.

As natural products have been considered an important source of new antibacterial agents<sup>20</sup>, propolis has been proposed for disinfection of the root canal because of its biological properties, particularly the antibacterial effectiveness

against endodontic microorganisms<sup>11</sup>. Besides, propolis has demonstrated many properties that could be important in controlling odontogenic infections e.g. antibacterial, antifungal, and anti-inflammatory<sup>2,3</sup>, been able to inactivate resistant bacteria such as *Enterococcus faecalis*<sup>1,11,14,17</sup>.

An association between calcium hydroxide and propolis could present an improved antimicrobial efficacy against resistant microbes and include all the beneficial biological properties of propolis. The aim of this study was to analyze the physicochemical properties (pH, conductivity, and viscosity) of a calcium hydroxide and propolis medicament and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of this mixture needed to completely inhibit the growth of *E. faecalis*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental medicaments**

Five medicaments were prepared and tested in this study:

1. calcium hydroxide (40%) + propolis (10%) + propylene glycol (50%)
2. calcium hydroxide (50%) + propylene glycol (50%)
3. calcium hydroxide (50%) + distilled water (50%)
4. propolis (50%) + propylene glycol (50%)
5. propolis (50%) + distilled water (50%)

It was used a pure and dry extract of propolis containing coumaric acid, aromadendrin, drupanin, artepelin C, and baccharin (patent pending, Apis Flora<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP, Brazil) representing a pool of Brazilian propolis. A powder formulation of calcium hydroxide (Biodinâmica<sup>®</sup>, Ibiporã, PR, Brazil) was

investigated. Propylene glycol (Henrifarma<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brazil) was used as vehicle instead of sterilized distilled water in some groups. The aforementioned formulations were obtained after mixing different proportions of the products, until acquire the corresponding consistency of toothpaste<sup>7</sup>.

All the set of tests was performed on each sample in duplicate in the Pharmaceutical Technology Laboratory at the School of Pharmacy and in the Microbiology Laboratory at the Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiania, Brazil.

### **pH**

Each medicament (5g) was mixed, active homogenized in 5 mL of deionized, distilled water, and kept inactive for 1 hour at 25°C. The pH of the medicaments was measured after 1 hour, 24h and 7 days of initial preparation using a reference-electrode digital pH meter (Gehaka, PG 1000 Model) with magnetic agitation, allowing a gradual analysis of values from 0 to 14. The pH was calibrated with solutions of known pH before and after measurements at each period.

### **Conductivity**

Five samples of recently mixed agents were used for the conductivity trial. After the homogenization of 5 g of each medicament at 25°C the electric conductance was assessed using a digital conductivimeter (Tecnal, TEC-4MP) in units of microSiemens per centimeter ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

### **Viscosity**

Eight samples of recently mixed agents were used for the experiment on viscosity. After the active homogenization of 5 g of each medicament, viscosity (Centipoise) was measured using a Brookfield Viscometer (Model RVDV-I; Brookfield Engineering) with a water-jacketed small sample adapter at 25°C. Shear rate was varied by changing the speed of the spindle number 4; resistance to the torque was measured.

### **Minimum Inhibitory Concentration**

*Enterococcus faecalis* sample from the American Type Culture Collection (ATCC 29212) was obtained at the Brazilian Dentistry Study and Research Center, Goiania, Goias, Brazil. Broth microdilution method was utilized according to guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2002) as follows.

Serial dilution was carried out using 5 mL of sterile Brain Heart Infusion (BHI) broth (Difco® Laboratories, Detroit, MI, USA) to obtain several concentrations between 80.0 and 2.5 mg of experimental medicament per mL of broth. The tubes were inoculated with 20 µL of the bacteria suspension, homogenized and incubated at 37°C for 24 hours. The inoculum suspensions were prepared with an overnight culture of test microorganism and the size was adjusted to 1 McFarland standard turbidity, approximately  $3 \times 10^8$  colony forming units (CFU/mL). After incubation, 2.5 mL were taken from each tube and inoculated in a second tube containing 2.5 mL of sterile BHI broth, homogenized and progressively repeated to each tube. At the end, all of the tubes were incubated for another 24 hours at 37°C. MIC was determined as the lowest concentration of medicament able to inhibit completely the growth observed in the second set of tubes.

After reading the previous results, 25 $\mu$ L of each suspension were transferred to sterilized BHI (Difco<sup>®</sup> Laboratories, Detroit, MI, USA) in Petri dishes measuring 15 x 60 mm. These Petri dishes were incubated at 37°C for 48 hours to confirm the MIC. MIC was read as the lowest medicament concentration that precluded bacterial growth on plates. Control cultures, containing only BHI broth were also prepared.

### Statistical analysis

Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used to compare the medicaments means in each physicochemical parameter. If  $P < 0.05$  in this non-parametric test, Mann–Whitney U test was used to assess the differences among diverse pairs of tested medicaments. Friedman test analyzed the pH variation over time.

## RESULTS

Medicaments containing calcium hydroxide had significantly higher pH ( $P=0.010$ ) than those without this substance at the 3 periods of assessment (figure 1); there was no statistically significant difference for each group of medicaments (with or without calcium hydroxide) when comparing their pH over time ( $P = 0.223$ ).

The medicament containing calcium hydroxide in water presented the highest conductivity, and the least conductive was the mixture of propolis and propylene glycol (Table 1). The association of calcium hydroxide and propolis was the second least conductive and was the most viscous tested material. Its viscosity was not significantly different from the mixture of propolis and water when the values for 5, 10, and 20 rpm when compared (Table 1).

All tested medicaments had inhibitory activity against *E. faecalis*. The smallest MIC was observed either in the mixture of calcium hydroxide, propolis, and propylene glycol or with the calcium hydroxide medicaments (Table 2).

## DISCUSSION

The results of the present study demonstrated that the addition of propolis to a calcium hydroxide medicament caused similar pH, conductivity decrease, viscosity increase, and equivalent MIC comparing to the medicaments that had solely calcium hydroxide as antimicrobial agent. On the contrary, the medicaments based only on propolis were more acidic and had higher MIC than those containing calcium hydroxide.

This study intended to contribute to the development of an improved endodontic medicament aiming its use as intracanal dressing or as obturation agent for primary teeth. Calcium hydroxide was chosen as standard due to its properties. The concentration of propolis on the experimental medicament was established based on previous studies which confirmed an adequate antimicrobial activity of 10% propolis<sup>11,14,17,23</sup>.

A calcium hydroxide endodontic medicament should be alkaline. The basic principle action of calcium hydroxide involves its ionic dissociation into hydroxyl and calcium ions promoting an irreversible bacterial enzymatic inactivation under extreme conditions of pH (12.6) for a long period of time<sup>5</sup>. There are two major consequences of the liberation of hydroxyl ions: disturbance in the integrity of the bacterial cytoplasmic membrane through the toxic effects generated during the transfer of nutrients or through the destruction of the phospholipids of unsaturated fatty acids<sup>10</sup> and the stimulation of the hydrolytic enzyme alkaline phosphatase,



which is intimately related to the process of tissue mineralization<sup>9</sup>. The calcium hydroxide medicaments tested in this study presented a pH above 12.0 showing that the association of propolis did not reduce the original pH of calcium hydroxide, which is particularly relevant to support the properties of calcium hydroxide. Our results on pH of calcium hydroxide associated with water over one week are in accordance to other report<sup>22</sup>. The two propolis medicaments presented a low pH because of the acidic nature of this product which has caffeic acid, sinapic acid, isoferulic acid, and canaric acid in its composition.

The conductivity verifies the flow of electric charge (electrons or ions) by the electrical potential difference placed across a conductor. It is directly proportional to the concentration of dissolved ions – more ions, more conduction resulting in higher electrical current. The tested medicaments had significantly differences in conductivity in this study. The mixture of calcium hydroxide with propolis or with propylene glycol only presented low conductivity values; this means that the slow dissociation of hydroxyl ions with this mixture might be beneficial for root canal filling in primary teeth because it would remain in the root canal for a longer period of time. However, when considering an intracanal dressing, calcium hydroxide associated with a more aqueous agent such as sterilized distilled water would promote an elevated dissociation of hydroxyl ions and faster antimicrobial action.

The viscosity describes a fluid's internal resistance to flow as a measure of fluid friction; it verifies the resistance to the torque converted to shear stress. The viscosity of the vehicles used in calcium hydroxide medicaments influences the diffusion and liberation of calcium and hydroxyl ions<sup>8</sup>. In this study, the association of propolis to calcium hydroxide increased the viscosity when compared to the other

calcium hydroxide mixtures. This finding is not desirable for an intracanal dressing but is an expected feature for an obturation agent in primary teeth, considering that a higher viscosity might maintain a gradual and regular dissociation of calcium and hydroxyl ions and would be associated with a low resorption of the medicament, more alike to the physiologic resorption of primary teeth. Also, as the viscosity was inversely related to the shear force applied for all the tested medicaments, one would expect that the medicaments would flow more easily with the increase in the movements and speed of condensation into the root canals.

The last aim of this study was to test the antimicrobial effectiveness of the medicaments against *E. faecalis*. This microorganism was chosen because it plays a predominant role in the pathogenesis of periapical lesions and as it is extremely resistant to several medicaments it may be difficult to eliminate it from root canals<sup>12,21</sup>. *E. faecalis* is able to persistently invade dentinal tubules and adhere to collagen in the presence of human serum<sup>6</sup>.

The ability of calcium hydroxide in eliminating *E. faecalis* is questionable. The poor diffusion of hydroxyl ions into infected dentin and the buffering capacity of dentin can reduce the calcium hydroxide alcalinization potential, becoming ineffective against *E. faecalis* even after an extended time of incubation<sup>13</sup>. This justifies seeking for other medicaments to replace or be associated with calcium hydroxide<sup>24</sup>. Propolis was chosen because it has demonstrated antimicrobial activity against some microorganisms including *E. faecalis*<sup>1,11,14,17,23</sup>.

The results of the present study demonstrated that calcium hydroxide mixtures presented similar low MIC against *E. faecalis* despite the vehicle (propolis, propylene glycol or water). Our MIC values for calcium hydroxide were different than those of 1.6 mg/mL<sup>11</sup> and 16.0 mg/mL<sup>18</sup> found elsewhere. It could be explained by

variations in the dilution tests employed, like broth used, volume of antimicrobial agents and accurate of dilutions.

In this study, propolis mixtures without calcium hydroxide presented higher MIC against *E. faecalis* than calcium hydroxide combinations. This rationale was also observed in other study<sup>11</sup> although they and other authors have reported lower MIC: 6.4 mg/mL<sup>11</sup> and 2.0 mg/mL<sup>23</sup>, probably in consequence of differences in methods and mainly in order to the huge variability and complexity in propolis composition. Nevertheless, the addition of propolis to calcium hydroxide did not decrease the antimicrobial activity, demonstrating a good antibacterial interaction. It is essential to remember that *in vitro* tests do not reflect the real conditions found in clinical infections, because they do not take into account biofilm formation.

The results herein demonstrated that the association of calcium hydroxide with propolis presented an elevated pH and satisfactory MIC, i.e. propolis did not affect the pH and MIC of conventional calcium hydroxide medicaments. On the other hand, by adding propolis to calcium hydroxide a lowered conductivity and higher viscosity were observed. It can be concluded that the association 'calcium hydroxide and propolis' did not present satisfactory physicochemical properties to be used as temporary intracanal medication in primary or permanent teeth, but exhibited acceptable physicochemical properties to warrant further studies as a root canal filling for primary teeth. The MIC of this association confirmed its *in vitro* antimicrobial activity against *E. faecalis*. Future *in vitro* and *in vivo* researches must be conducted to sustain the viability of using this association in the treatment of endodontic infections.

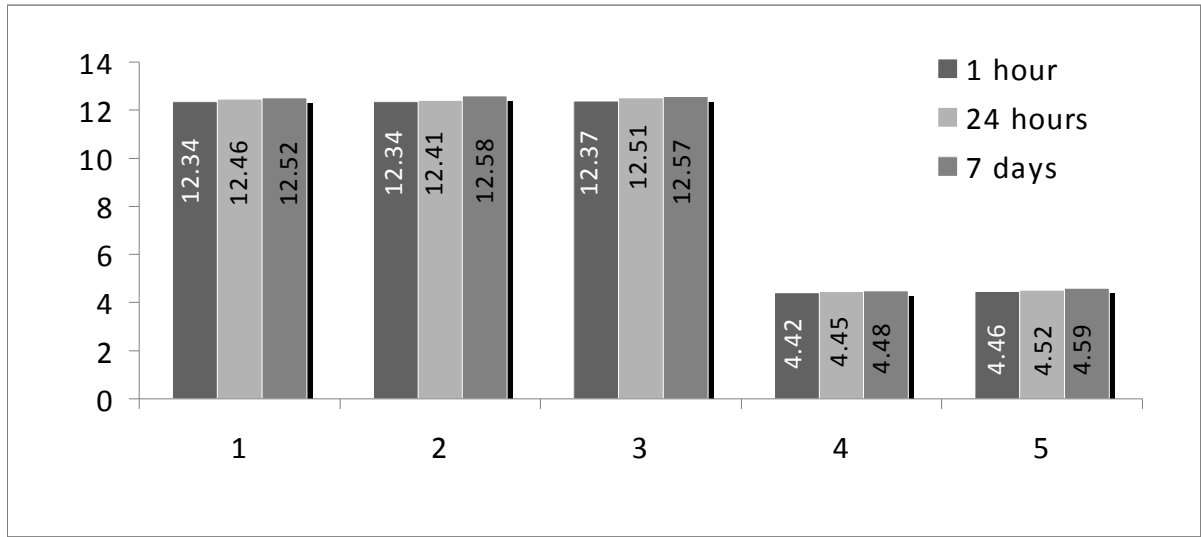
## REFERENCES

1. Awawdeh L, AL-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of Propolis and Calcium Hydroxide as a Short-Term Intracanal Medicament Against *Enterococcus faecalis*: A Laboratory Study. Aust Endod J. 2008:01-07.
2. Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 2000;31:03–15.
3. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytotherapy Res. 2001;15:561-71.
4. Estrela C, Estrela CRA, Guimarães LF, Silva RS, Pécora JD. Surface tension of calcium hydroxide associated with different substances. J Appl Oral Sci. 2005;13(2):152-56.
5. Estrela C, Estrela CRA, Hollanda ACB, Decurcio DA, Pécora JD. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. J Appl Oral Sci. 2006;14(1):33-7.
6. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. J Appl Oral Sci. 2003;11(4):269-82.
7. Estrela C, Pécora JD, Souza-Neto MD, Estrela CRA, Bammann LL. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide medicaments. Braz Dent J. 1999;10(2):63-72.
8. Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog - part I. Braz Dent J. 1996;7(1):41-46.
9. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. J Endod. 1998;24(1):15–17.

10. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe O Jr. Mechanism of the action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995;6:85-90.
11. Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BP. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(5):709-16.
12. Haapasalo MPP, Ørstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987;66:1375-9.
13. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Ørstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J.* 2000;33:126–31.
14. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 2000;45(2):141-8.
15. Lee M, Winkler J, Hartwell G, Stewart J, Caine R. Current trends in endodontic practice: emergency treatments and technological armamentarium. *J Endod.* 2009;35:35-9.
16. Mani SA, Chawla HS, Tewari A, Goyal A. evaluation of calcium hydroxide and zinc oxide as a root canal filling material in primary teeth. *ASDC J Dent Child.* 2000;67:142-7.
17. Oncag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Gen Dent.* 2006;54:319–22.

18. Pallotta RC, Ribeiro MS, Lima-Machado ME. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. *Aust Endod J.* 2007;33:107–11.
19. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2007;40:2–10.
20. Silva FB, Almeida JM, Sousa SM. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res.* 2004;18(2):174-9.
21. Siqueira-Jr JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999;32:361–9.
22. Souza-Filho FJ, Soares Ade J, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J.* 2008;19(1):28-33.
23. Uzel A, Sorkun K, Önçağ O, Çoğulu D, Gençay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res.* 2005;160:189-195.
24. Vianna, M.E.; Gomes, B. P. F. A.; Senia, N. T.; Zaia, A. A.; Ferraz, C. C. R.; Souza Filho, F. J. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Braz Dent J.* 2005;16(3):175-80.

**Figure 1.** pH of tested medicaments over one week



\*1 Calcium hydroxide, propolis and propylene glycol; 2 calcium hydroxide and propylene glycol, 3 calcium hydroxide and sterilized distilled water, 4 propolis and propylene glycol, 5 propolis and sterilized distilled water

**Table 1.** Conductivity and viscosity of tested medicaments

Properties	Medicaments <sup>a</sup>					<i>P</i>
	1	2	3	4	5	value <sup>b</sup>
Conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	57.4 $\pm$ 4.4	144.4 $\pm$ 14.7	13030.0 $\pm$ 165.4	14.7 $\pm$ 2.0	1603.0 $\pm$ 185.0	<.001
Viscosity (cP)						
5 rpm	667.1 $\pm$ 83.8 <sup>c</sup>	236.1 $\pm$ 21.2	153.3 $\pm$ 38.4	192.7 $\pm$ 22.2	715.3 $\pm$ 29.8 <sup>c</sup>	<.001
10 rpm	493.9 $\pm$ 60.0 <sup>c</sup>	229.2 $\pm$ 20.3	83.5 $\pm$ 17.1	179.8 $\pm$ 11.9	529.0 $\pm$ 8.3 <sup>c</sup>	<.001
20 rpm	389.0 $\pm$ 43.6 <sup>c</sup>	214.1 $\pm$ 18.2	43.4 $\pm$ 13.4	164.3 $\pm$ 8.5	371.1 $\pm$ 3.5 <sup>c</sup>	<.001
50 rpm	308.0 $\pm$ 25.8	199.6 $\pm$ 15.3	20.0 $\pm$ 1.9	143.2 $\pm$ 5.2	239.5 $\pm$ 5.2	<.001

<sup>a</sup> 1 Propolis, calcium hydroxide and propylene glycol, 2 Calcium hydroxide and propylene glycol, 3 Calcium hydroxide and sterilized distilled water, 4 Propolis and propylene glycol, 5 Propolis and sterilized distilled water

<sup>b</sup> Kruskal Wallis test

<sup>c</sup>  $P > 0.05$  (Mann-Whitney test)



**Table 2.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of tested medicaments against *Enterococcus faecalis*.

Medicaments <sup>a</sup>	MIC (mg/mL) <sup>b</sup>					
	80	40	20	10	5	2.5
1	--	--	--	--	++	++
2	--	--	--	--	++	++
3	--	--	--	--	++	++
4	--	--	++	++	++	++
5	--	--	++	++	++	++
propylene glycol (as a negative control).	++	++	++	++	++	++

<sup>a</sup> 1 Propolis, calcium hydroxide and propylene glycol, 2 Calcium hydroxide and propylene glycol, 3 Calcium hydroxide and sterilized distilled water, 4 Propolis and propylene glycol, 5 Propolis and sterilized distilled water

<sup>b</sup> ++ (Positive result) = growth presence/inefficacy; -- (Negative result) = absence of growth/efficacy

**3.2 ARTIGO II: ANTIBACTERIAL ACTION OF INTRACANAL MEDICAMENTS  
AGAINST INFECTED DENTIN FROM PRIMARY AND PERMANENT TEETH**

**Antibacterial Action of Intracanal Medicaments against Infected Dentin from  
Primary and Permanent Teeth**

Giovanna P. S. R. Rezende, DDS, MSc

Postgraduate Student of Health Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO,  
Brazil;

Daniel A. Decurcio, DDS, MSc

Professor of Endodontics, Federal University of Goias, Goiania, Brazil;

Carlos Estrela, DDS, MSc, PhD

Professor of Endodontics, Federal University of Goias, Goiania, Brazil;

Luciane R. R. S. Costa, DDS, MSc, PhD

Associate Professor of Pediatric Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia,  
GO, Brazil;

**Running Title:** Antibacterial Action of Calcium Hydroxide Paste

**Key Words:** Calcium hydroxide, propolis, biofilm, *Enterococcus faecalis*.

Correspondence and offprint requests to:

**Professor Luciane R. R. S. Costa**

School of Dentistry, Federal University of Goias

1ª Avenida s/n, Setor Universitário, Goiânia GO, Brazil, 74605-220

e-mail: lsucasas@odonto.ufg.br

## **Antibacterial Action of Intracanal Medicaments against Infected Dentin from Primary and Permanent Teeth**

### **Abstract**

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on permanent and primary infected dentin. Dentin blocks were inoculated with *Enterococcus faecalis* every 72 h for 60 days; then they were irrigated, dried and completely filled with one of the following mixtures: 1) calcium hydroxide powder, propolis and propylene glycol; 2) calcium hydroxide powder and propylene glycol; 3) calcium hydroxide powder and sterilized distilled water; 4) propolis and propylene glycol; 5) propolis and sterilized distilled water. After 30 days, the samples were washed with sterilized distilled water, immersed in 7 mL of Lethen Broth and incubated for 48 hours at 37°C. Our hypothesis that the association of calcium hydroxide with propolis would be more effective than the medicaments themselves was not confirmed, as the results indicated that none of the mixtures tested were able to inhibit *E. faecalis* biofilm, either in primary or permanent dentin blocks.

### **Introduction**

It is well known that endodontic infections have a polymicrobial nature either in primary (1) or permanent teeth (2). One of the most important microorganisms to be contained is *Enterococcus faecalis*. *E. faecalis* was observed through polymerase chain reaction in 22% of necrotic primary and 32% of necrotic permanent root canals (3), and it is more prevalent in secondary than in primary

endodontic infections (4, 5). *E. faecalis* is a non-spore-forming, fermentative, facultative anaerobic and Gram-positive coccus that can colonize the dentinal walls from the root canals, adhering to the mineral part as well as to the collagen through different virulence factors. This adhesion to dentin and penetration along dentinal tubules by *E. faecalis* may serve as a means of protection from endodontic medicaments (6).

With the goal of eliminating *E. faecalis* from root canals and achieving an optimal outcome in non-vital pulp therapy, several substances have been tested. Although calcium hydroxide has been widely used in endodontics for its various biological properties (7), it cannot eliminate *E. faecalis* when used as the sole agent in infected dentin models (8, 9). A recent systematic review also concluded that calcium hydroxide is ineffective against human root canal bacteria (10). Antimicrobials besides calcium hydroxide such as erythromycin and oxytetracycline, were effective in eradicating two-day-old *E. faecalis* biofilm, whereas ampicillin, co-trimoxazole, vancomycin, and vancomycin followed by gentamicin were not (11).

Propolis can be a satisfactory adjunct substance for pulp therapies in primary and permanent teeth. Propolis is a resinous substance collected by bees that has been extensively used for centuries as a natural chemical agent against infectious diseases (12). Particularly in endodontics, propolis has been used for root canal disinfection as well as for reducing and controlling pulp and periapical inflammatory reactions, inducing the healing process and controlling post-treatment pain and discomfort (13). As an endodontic antimicrobial agent, a 10% ethanol extract of propolis is quite effective against *Prevotella nigrescens*, is somewhat effective against *Fusobacterium nucleatum* but minimum inhibitory and bactericidal concentrations against *Actinomyces israelii* and *E. faecalis* using the broth

macrodilution method were high(14). Similarly *E. faecalis* was the Gram-positive bacterium most resistant to 20% ethanol extract of propolis (15), but propolis solutions have demonstrated good activity against *E. faecalis* in single-rooted teeth after short-term application in two experiments using infected models from human permanent teeth (16, 17).

Experimental pastes containing calcium hydroxide and 11% propolis extract have been reported effective against polymicrobial cultures collected from necrotic root canals in primary molars by means of the agar-well diffusion method (18). Little, however, is known about the antimicrobial properties of this mixture. This study assesses the effectiveness of the calcium hydroxide and propolis association against *E. faecalis* in an infected dentin model in order to test the hypothesis that this combination might be a satisfactory intracanal dressing for endodontic infections in primary and permanent teeth.

## **Materials and Methods**

### **Microbiological Indicator**

A bacterial strain obtained from the American Type Culture Collection (*Enterococcus faecalis*, ATCC 29212) was inoculated into 7 mL of Brain Heart Infusion (BHI; Difco, USA) and incubated at 37° C for 24 h. The experimental suspension was prepared on the surface of Brain Heart Infusion agar and incubated at 37° C for 24 h. Bacterial cells were resuspended in saline to be adjusted to tube 1 of the MacFarland scale.

### **Tooth Preparation**

A total of 42 root samples were prepared from primary and permanent extracted maxillary first molars. The primary teeth had at least two thirds of root length and an absence of perforation in the root wall or furcation area; the permanent teeth had complete rhyzogenesis without resorptions. This study was approved by the Research Ethics Board at the Federal University of Goias, Brazil (protocol number 62/2006). Teeth were obtained from dentists and from a tooth bank (CEPOBRAS, Brazilian Dentistry Research and Learning Center) after the donors (adults and children's legal guardian) had consented to the use of their teeth in research.

### **Experimental procedures**

All teeth were decoronated at the cement-enamel junction. Then, 4-mm and 5-mm high blocks for primary and permanent teeth, respectively, were removed from the cervical palatal root with a # 7020 diamond disk (KG Sorensen, São Paulo, Brazil) at low speed and under water cooling. The blocks had their cementum layer removed with a #3101 cylindrical diamond bur (KG Sorensen) in a high-speed handpiece and under water cooling.

Each dentin block was individually shaped, using K-files #15 to #30 for primary teeth and, K-files #15 to #40 (Maillefer<sup>®</sup>, Switzerland) for permanent teeth; then they were enlarged with #2 (primary) and #3 (permanent) Gates-Glidden drills. Dentin blocks were continuously irrigated with 1% sodium hypochlorite (Miyako<sup>®</sup>, Guarulhos, SP, Brazil) during the mechanical preparation.

Samples were separated into 7 primary tooth and 7 permanent tooth groups. Each group of three root dentin blocks corresponded to one of the medicament associations specified in the first two columns of table 1. Dentin blocks

were dried and filled with 17% EDTA (pH 7.2) for 3 min; after cleaning and shaping, they were sterilized by autoclaving (30 min at 120°C).

The dentin infection design was based on previous studies (8, 19, 20). All blocks (except the negative control) were initially inoculated with *E. faecalis* strains. This procedure was repeated every 72 h during 60 days using 24-hour cultures adjusted to tube 1 of the MacFarland turbidity standard. Blocks were kept in a humid environment at 37°C.

After 60 days, positive control was used to check bacterial viability throughout the experiment. Subsequently, the other blocks were irrigated with 5 mL of saline solution, dried with sterile gauze and four sterilized absorbent paper points and completely filled with the intracanal medicament. After this, they were immediately placed in Petri dishes containing the medicament (sufficient to recover the blocks) and kept for 30 days. Subsequently, each sample was individually washed with 10 mL of sterilized distilled water, transported and immersed in a tube with 7 mL of Lethen Broth (Difco, USA), homogenized and incubated for 48 hours at 37°C. Culture medium turbidity was used to analyze microbial growth. Then, a 0.1 mL inoculum obtained from Lethen Broth was transferred to 7 mL of BHI under identical incubation conditions. All assays were carried out in triplicate. Each block was scored as either positive or negative for viable *E. faecalis* under the growth conditions.

## Results

Neither the association of propolis with calcium hydroxide nor associations of propolis or calcium hydroxide with other vehicles were able to inhibit *E. faecalis* growth on dentin blocks extracted from primary or permanent teeth (Table 1).



Bacteria were viable in the positive control group, while the negative control group was free of microorganisms.

## Discussion

The association of propolis and calcium hydroxide demonstrated no antimicrobial effectiveness against *E. faecalis* biofilm in this infected human dentin study. Associations of calcium hydroxide with propylene glycol, or sterilized distilled water and of propolis with propylene glycol or sterilized distilled water gave the same result. The positive *E. faecalis* cultures after all the associations were applied suggest that these medicaments are unable to disinfect the human root canal. This confirms that it is extremely difficult to reduce cell viability inside biofilms. The complex internal anatomy of root canals offers microorganisms the opportunity to survive in inaccessible and remote areas which provide a good environment for growth, multiplication, and interaction in pulp infections (21, 22) in both primary and permanent teeth.

The dentin block method used in this study attempted to reproduce a clinical situation even though the microorganisms were obtained *ex vivo* from pure culture collection. Dentin was contaminated with *E. faecalis* for 60 days, allowing bacteria penetrating the dentinal tubules to form a biofilm. Clinically, the level of bacterial invasion of the root dentinal tubules is also related to the incubation period: extended exposure of the root canal to the oral environment results in a significantly amplified microbial invasion of the root canal system (23).

Other studies have assessed the antimicrobial activity of intracanal medicaments using infected dentin blocks removed from different sources: human teeth *in vivo* (16, 17, 20) and *ex vivo* (19, 24), dog's teeth *in vivo* (25, 26), and

bovine teeth *ex vivo* (8). However, none had investigated dentin samples from primary teeth. Considering the lower permeability of primary molars (27), one could expect that bacteria would be able to invade the dentin tubules of permanent teeth more easily and deeply and would become more aggressive and difficult to eliminate, but this was not the case in the present study. The contamination period was probably long enough to allow the infection of primary molar dentin.

It should be emphasized that the results could have been different if we had investigated the same medicaments on planktonic cells. Another antimicrobial agent, ozone, had an antibacterial effect on planktonic *E. faecalis* and on *E. faecalis* suspended in fluid, but had little effect when this microorganism was embedded in biofilms (20). Moreover, both propolis and calcium hydroxide as sole agents were effective against *E. faecalis* by the macrodilution method (14). Multiple resistance mechanisms such as the production of an exopolysaccharide protective matrix and the modulation of the gene expression pattern are related to an increased bacterial resistance in biofilms. Biofilm bacteria can become up to 1,000 times stronger against an antimicrobial than their planktonic counterparts (28).

In this study, the association of medicaments was intended to produce an intracanal medication capable of eliminating *E. faecalis*. However, the antimicrobial agents were applied after microorganism inoculation without any previous irrigation. Considering that irrigants are very important for optimizing intra-canal disinfection against *E. faecalis* (29), one could expect better results in eliminating the target microorganism if we had used an effective disinfectant such as 2% chlorhexidine, which was able to disinfect up to 100% of *E. faecalis* inside the root canal lumen in a dentin block model (29). Chemicals that alter the physicochemical properties of

dentin can influence the nature of adherence, adhesion force and subsequent *E. faecalis*-to-dentin biofilm formation (30).

It is difficult to contrast the results of different studies of propolis antimicrobial activity against *E. faecalis* due to differences in propolis formulations and microbiological methods. The results of the present study disagree with those of two other investigations which concluded that propolis is effective against *E. faecalis* biofilms (16, 17). Both of these studies used shorter contamination periods, eg. 7 days (16) and 21 days (17). In addition, one tested a 10% ethanolic extract of bursa propolis (16) and the other a 30% solution of Jordanian propolis (17). The contamination period of *E. faecalis* in dentin was discussed earlier in this section. As the composition of propolis varies according to the region where it is collected (12), one could speculate that Brazilian propolis is not very effective. However, previous studies using other microbiological methods have reported that *E. faecalis* was susceptible to Brazilian propolis (14, 31).

Nevertheless, the findings in the present study are in agreement with those of researchers who have reported that calcium hydroxide dressings cannot eradicate *E. faecalis* biofilm (8, 29). This ineffectiveness is due to the poor diffusion of hydroxyl ions into infected dentin and the buffering capacity of dentin which reduces its alcalinization potential (32). Moreover, dentinal collagen can make the bacterium resistant to calcium hydroxide (33).

To sum up, calcium hydroxide and propolis were not able to eliminate 60 day *E. faecalis* biofilm *in vitro*. Considering that *in vitro* assessments do not exactly reproduce clinical outcomes, further studies using different methodologies are needed to answer the questions that have arisen. Nevertheless, calcium hydroxide still plays an important role in endodontics as far as vital pulp therapies are

concerned. Propolis should be tested further under other experimental conditions, however. One cannot ignore the wide-ranging properties of propolis and its potential application in endodontics as a pulpotomy agent in deep carious lesions, as an intracanal dressing in primary endodontic infections of permanent teeth, and as a filling agent in primary teeth pulpectomies.

### **Acknowledgments**

This study was partially supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Brazil. The authors are grateful to Eliana Martins Lima, PhD, Luciana Ferreira Fonseca Rodovalho, MS, and Julio Almeida Silva, MS, for their valuable technical support.

### **References**

- 1) Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, Souza-Gugelmin MCM, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J* 2006;17:144–8.
- 2) Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics* 2003;6:3-28.
- 3) Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Aksoy S, Eronat C. Detection of *Enterococcus faecalis* in necrotic teeth root canals by culture and polymerase chain reaction methods. *Eur J Dent* 2007;1:216–1.
- 4) Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in primary and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 2008;106:443–9.

- 5) Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod* 2008;34:541–5.
- 6) Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:308–20.
- 7) Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6(2):85-90.
- 8) Haapasalo MPP, Ørstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375–9.
- 9) Distel JW, Hattn JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002;28:689–93.
- 10) Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2007;40:2–10.
- 11) Chai WL, Hassan H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci* 2007;49:161–6.
- 12) Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000;31:3–15.
- 13) Silva FB, Almeida JM, Sousa SMG. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res* 2004;18:174–9.
- 14) Ferreira FBA, Torres SA, Rosa OPS, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected

- endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:709–16.
- 15) Stepanovic S, Antić N, Dakić I, Švabić-Vlahović M. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* 2003;58:353–7.
- 16) Oncag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Gen Dent* 2006;54:319–22.
- 17) Awawdeh L, AL-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: a laboratory study. *Aust Endod J* 2008;1–7.
- 18) Rezende GPSR, Costa LRRS, Pimenta FC, Baroni DA. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. *Braz Dent J* 2008;19:301–5.
- 19) Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod* 1999;26:416–8.
- 20) Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007;40:85–93.
- 21) Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endod* 1998;24:15–7.
- 22) Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one-visit' endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:231–2.

- 23) Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. J Dent Res 1982;61:435–8.
- 24) Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. J Endod 2001;27:206–8.
- 25) Holland R, Otoboni-Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan Jr E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. J Endod 2003;29:121–5.
- 26) Estrela C, Holland R, Bernabé PFE, Souza V, Estrela CRA. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dog's teeth with apical periodontitis. Braz Dent J 2004;15:181–5.
- 27) Koutsi V, Noonan RG, Horner JA, Simpson MD, Matthews WG, Pashley DH. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. Pediatr Dent 1994;16:29–35.
- 28) Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol 2001;9:34–9.
- 29) Gurgel-Filho ED, Vivacqua-Gomes N, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the effectiveness of the chemomechanical preparation against *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatment. Braz Oral Res 2007;21:308–3.
- 30) Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. J Endod 2008 Jul;34:850–4.
- 31) Rezende GPSR, Pimenta FC, Costa LRRS. Antimicrobial activity of two brazilian commercial propolis extracts. Braz J Oral Sci 2006;5(16):967–0.

- 32) Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TMT, Ørstavik D, Haapasalo MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J* 2000;33:126–1.
- 33) Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, Ørstavik D. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *J Endod* 2009;35:46–9.



Table 1 – Antimicrobial activity of different medicaments against *E. faecalis* biofilm.

Group	Association of medicaments	Dentin blocks <sup>a</sup>	
		Primary teeth	Permanent teeth
1	0.4 g calcium hydroxide powder <sup>b</sup> 0.1 g pure, dry extract of propolis <sup>c</sup> 0.2 mL propylene glycol <sup>d</sup>	+++	+++
2	0.5 g calcium hydroxide powder <sup>b</sup> 0.2 mL propylene glycol <sup>d</sup>	+++	+++
3	0.5 g calcium hydroxide powder <sup>b</sup> 0.2 mL sterilized distilled water	+++	+++
4	0.5 g pure, dry extract of propolis <sup>c</sup> 0.2 mL propylene glycol <sup>d</sup>	+++	+++
5	0.5 g pure, dry extract of propolis <sup>c</sup> 0.2 mL sterilized distilled water	+++	+++
	Positive control group	+++	+++
	Negative control group	- - -	- - -

<sup>a</sup> Symbols represent growth in repeated experiments: (+++) indicates positive result for *E. faecalis* presence of growth/inefficacy of the medicament for each dentin block; (- - -) is a negative result (absence of growth/efficacy) for each dentin block

<sup>b</sup> Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brazil

<sup>c</sup> A pool of Brazilian propolis consisting of coumaric acid, aromadendrin, drupanin, artepelin C, and baccharin (patent pending, Apis Flora, Ribeirão Preto, SP, Brazil)

<sup>d</sup> Henrifarma, São Paulo, SP, Brazil

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na metodologia aplicada e nos resultados obtidos é possível concluir que o medicamento endodôntico experimental (hidróxido de cálcio + própolis + propilenoglicol), nessa proporção e composição, apresentou elevado pH, baixa condutividade e alta viscosidade, bem como atividade antimicrobiana *in vitro* pelo teste de diluição em ágar contra células de *E. faecalis*. Entretanto, não apresentou efetividade antimicrobiana *in vitro* pelo teste de difusão em dentina frente ao biofilme de *E. faecalis*.

Sugere-se que a baixa condutividade e a alta viscosidade do medicamento experimental, quando comparado aos outros medicamentos testados (1. hidróxido de cálcio + propilenoglicol; 2. hidróxido de cálcio + água destilada; 3. própolis + propilenoglicol; 4. própolis + água destilada), são benéficas para obturação de canais de dentes decíduos, pois o medicamento com dissociação mais lenta vai agir por mais tempo e ser reabsorvido mais lentamente, já que a medicação obturadora deverá permanecer por um tempo prolongado no interior do canal do dente decíduo, a depender do estágio de rizólise e do tempo para esfoliação. No entanto, essas mesmas características do medicamento experimental o contra-indicam como medicação intracanal para dentes decíduos e permanentes, pois, nos dentes permanentes, essa medicação permanecerá no interior do canal por um período curto (normalmente de 7 a 14 dias).

A associação entre própolis e hidróxido de cálcio se mostrou efetiva *in vitro* no controle de células planctônicas de *E. faecalis*. No entanto, foi ineficaz frente a um biofilme maduro de 60 dias quando verificado por contato direto em blocos provenientes de dentes decíduos e permanentes por 30 dias com o medicamento (sem influência de instrumentação mecânica ou irrigação com produtos antimicrobianos).

Frente a esses resultados, propõe-se que novas pesquisas devam ser conduzidas *in vitro* e *in vivo* referentes às propriedades físico-químicas e biológicas desse medicamento,

com a finalidade de certificar a viabilidade da utilização desse medicamento experimental em terapias pulpares de dentes decíduos.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AKPATA, E.S.; BLECHMAN, H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. **J Dent Res**, v.61, p.435–8, 1982.

AWAWDEH, L.; AL-BEITAWI, M.; HAMMAD, M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: a laboratory study. **Aust Endod J**, p.01-07, 2008.

AL-SHAHER, A.; WALLACE, J.; AGARWAL, S. et al. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. **J Endod**, v.30, n.5, p. 359-61, 2004.

BANKOVA, V.S. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J Ethnopharmacol**, v.100, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3–15, 2000.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. High-performanca liquid chromatographic analyses of flavonoids from propolis. **J Chromatogr**, v.242, p.135-43, 1982.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Res**, v.15, p.561-571, 2001.

BARRETO, A.S.; LUISI, S.B.; FACHIN, E.V.F. Importância da dissociação dos íons cálcio e hidroxila de pastas de hidróxido de cálcio. **Rev. de Clín. Pesq. Odontol**, v.1, n.4, p. 37-46, 2005.

BASRANI, B.; GHANEM, A.; TJA'DERHANE, L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. **J Endod**, v. 30, n.6, p.413-17, 2004.

BERGENHOLTZ, G.; SPANGBERG, L. Controversies In Endodontics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 15, n.2, p. 99-114, 2004.

BERRETTA, A.A. **Desenvolvimento e Avaliação de uma Forma Farmacêutica de Liberação Sustentada contendo Extrato Padronizado de Própolis para o Tratamento de Queimaduras**. 2003. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

BORTOLINI, M.C.T. **Avaliação de cimentos endodônticos quanto à penetração intratubular e microinfiltração por *Enterococcus faecalis***. 2006. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2006.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; AVOLIO, AD. et al. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Lett Appl Microbiol**, v.31, n.2, p.174-147, 2000.

---

<sup>1</sup> Segue o formato proposto pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - NBR 6023: 2002.

BUCK, R.A.; ELEAZER, P.D.; STAAT, R.H.; SCHEETZ, J.P. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. **J Endod**, v.27, p.206–8, 2001.

BUDVARI S. **The Merck index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**, 12. ed., Merck and Co., New Jersey, p. 254, 1996.

CHAI, W.L.; HASSAN, H.; CHENG, S.C.; SALLAM, A.A.; ABDULLAH, M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. **J Oral Sci**, v.49, p.161–6, 2007.

COGULU, D.; UZEL, A.; ONCAG, O.; AKSOY, S.; ERONAT, C. Detection of *Enterococcus faecalis* in necrotic teeth root canals by culture and polymerase chain reaction methods. **Eur J Dent**, v.1, p.216–1, 2007.

COGULU, D.; UZEL, A.; ONCAG, O.; ERONAT, C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in primary and permanent teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End**, v.106, p.443–9, 2008.

DISTEL, J.W.; HATTN, J.F.; GILLESPIE, M.J. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod**, v.28, p.689–93, 2002.

CUNHA, C.B.C.S.; BARCELOSS, R.; PRIMO, L.G. Soluções irrigadoras e Materiais Obturadores Utilizados na Terapia Endodôntica de Dentes Decíduos. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 5, n. 1, p. 75-83, 2005.

DOTTO, S.R.; TRAVASSOS, R.M.C.; FERREIRA, R. et al. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. **Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS**, v. 21, n. 53, p.266-69, 2006.

ESTRELA C. **Eficácia antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio**. 1997. Tese (Livre-docência)–Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1997.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; DECURCIO, D.A. et al. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **Inter Endodon J**, v.40, p.85–93, 2007.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; GUIMARÃES, L.F.; SILVA, R.S.; PÉCOR, J.D. Surface. tension of calcium hydroxide associated with different substances. **J Appl Oral Sci**, v.13, n.2, p.152-56, 2005.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; HOLLANDA, A.C. et al. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. **J Appl Oral Sci**, v. 14, n.1, p.33-7, 2006.

ESTRELA, C.; HOLLAND, R.; BERNABÉ, P.F.E.; SOUZA, V.; ESTRELA, C.R.A. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dog's teeth with apical periodontitis. **Braz Dent J**, v.15, p.181–5, 2004.

ESTRELA, C.; HOLLAND, R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. **J Appl Oral Sci**, v.11, n.4, p. 269-82, 2003.

ESTRELA, C.; PÉCORÁ, J.D.; SOUZA-NETO, M.D.; ESTRELA, C.R.A.; BAMMANN, L.L. Effect of vehicle on antimicrobial properties of calcium hydroxide medicaments. **Braz Dent J**, v. 10, n.2, p.63-72, 1999.

ESTRELA, C.; PESCE, H.F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog - Part I . **Braz Dent J**, v.7, n.1, p.41-46, 1996.

ESTRELA, C.; PIMENTA, F.C.; ITO, I.Y.; BAMMANN, L.L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **J Endodon**, v.25, p.416-418, 1999.

ESTRELA, C.; PIMENTA, F.C.; ITO, I.Y.; BAMMANN, L.L. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. **J Endod**, v.24, n.1, p.15–17, 1998.

ESTRELA, C.; SYDNEY, G.B.; BAMMANN, L.L. et al. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática das bactérias anaeróbicas. **Rev Fac Odontol Bauru**, v.2, n.4, p.31-38, 1994.

ESTRELA, C.; SYDNEY, G.B.; BAMMANN, L.L. et al. Mechanism of Action of Calcium and Hydroxyl Ions of Calcium Hydroxide on Tissue and Bacteria. **Braz Dent J**, v.6, n.2, p.85-90, 1995.

FERNANDES-JR, A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciênc Rur, Santa Maria**, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

FERREIRA, F.B.; TORRES, S.A.; ROSA, O.P.; FERREIRA, C.M.; GARCIA, R.B.; MARCUCCI, M.C.; GOMES, B.P. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.104, n.5, p.709-16, 2007.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 26, n.1, p. 171-78, 2006.

GERALDINI, C.A.C.; SALGADO, E.G.C.; RODE, S.M. Ação de diferentes soluções de própole na superfície dentária – avaliação ultra-estrutural. **Pós-graduação Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v.3, n.2, p.37-42, 2000.

GONSALES, G.Z.; ORSI, R.O.; FERNANDES-JR, A. et al. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v.12, n.2, p.276-284, 2006.

GURGEL-FILHO, E.D.; VIVACQUA-GOMES, N.; GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; ZAIA, A.A.; SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* evaluation of the effectiveness of the chemomechanical preparation against *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatment. **Braz Oral Res**, v.21, n.4, p.308-13, 2007.

- HAAPASALO, H.K.; SIRÉN, E.K.; WALTIMO, T.M.T.; ØRSTAVIK, D.; HAAPASALO, M.P.P. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. **Int Endod J**, v.33, p.126–31, 2000.
- HAAPASALO, M.P.P.; ØRSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, v.66, p.1375–9, 1987.
- HOBSON, P. The value of an intact deciduous arch. **Br Dent J**, v. 129, n. 4, p. 175, 1970.
- HOFFMANN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C.H.; CARMELLO, M.T. et al. Determinação da atividade antimicrobiana “*in vitro*” de três produtos farmacêuticos à base de própolis. **Hig Aliment**, v.12, n.53, p. 57-60, 1998.
- HOLLAND, R.; OTOBONI-FILHO, J.A.; SOUZA, V.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.E.; DEZAN JR, E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs’ teeth with apical periodontitis. **J Endod**, v.29, p.121–5, 2003.
- KAYAOGU, G.; ERTEN, H.; BODRUMLU, E.; ØRSTAVIK, D. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **J Endod**, v.35, p.46–9, 2009.
- KAYAOGU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.15, p.308–20, 2004.
- KISHEN, A.; SUM, C.P.; MATHEW, S.; LIM, C.T. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. **J Endod**, v.34, p.850–4, 2008.
- KOO, H.; GOMES, B.P.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.; PARK, Y.K.; CURY, J.A. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *arnica montana* against oral pathogens. **Arch Oral Biol**, v.45, n.2, p.141-8, 2000.
- KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M. et al. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. **Acta Pharm**, v.55, n.4, p. 423-30, 2005.
- KOUTSI, V.; NOONAN, R.G.; HORNER, J.A.; SIMPSON, M.D.; MATTHEWS, W.G.; PASHLEY, D.H. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. **Pediatr Dent**, v.16, p.29–35, 1994.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.U. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J Ethnopharmacol**, v.64, p. 235-240, 1999.
- LEE, M.; WINKLER, J.; HARTWELL, G.; STEWART, J.; CAINE, R. Current trends in endodontic practice: emergency treatments and technological armamentarium. **J Endod**, v.35, p.35-9, 2009.
- MAH, T.F.; O’TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiol**, v. 9, p.34 –9, 2001.

MANARA, L.R.B.; ANCONI, S.I.; GROMATZKY, A. et al. Utilização da própolis em odontologia. **Rev FOB**, v.7, n.3/4, p. 15-20, 1999.

MANI, S.A.; CHAWLA, H.S.; TEWARI, A.; GOYAL, A. evaluation of calcium hydroxide and zinc oxide as a root canal filling material in primary teeth. **ASDC J Dent Child**, v.67, p.142-7, 2000.

NADIN, G.; GOEL, B.R.; YEUNG, C.A. et al. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. In: **The Cochrane Library**. Oxford., v. 1, 2003.

NAIR, P.N.R.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one-visit' endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.99, p.231–2, 2005.

NUNES, A.C.G.P.; ROCHA, M.J.C. Hydroxyl and calcium ions diffusion from endodontic materials through roots of primary teeth – *in vitro* study. **J Appl Oral Sci**, v.13, n.2, p. 187-92, 2005.

OLIVEIRA, D.A. **Análise histológica e morfométrica da reação provocada pelas pastas à base de hidróxido de cálcio, de própolis e associação em tecido subcutâneo de rato**. 2004. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2004.

ONCAG, O.; COGULU, D.; UZEL, A.; SORKUN, K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. **Gen Dent**, v.54, p.319–22, 2006.

OTA, C.; VALENTE, P.H.M.; UNTERKIRCHER, C.S. et al. Atividade da própole sobre bactérias isoladas da cavidade bucal. **Lecta, Bragança Paulista**, v. 16, n.1, p. 73-77, 1998.

PALLOTTA, R.C.; RIBEIRO, M.S.; LIMA-MACHADO, M.E. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. **Aust Endod J**, v.33, p.107–11, 2007.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; IKEGAKI, M. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* e *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v.29, p. 143-148, 1998.

PARK, Y.; IKEGAKI, IM.; KOO, MH. et al. **Andamento das pesquisas sobre própole na Unicamp**. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/47/pesquisa.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2006.

PORTENIER, I.; WALTIMO, T.; ORSTAVIK, D. et al. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. **J Endod**, v.31, n.5, p. 380-6, 2005.

REZENDE, G.P.S.R. **Atividade antimicrobiana de dois produtos comerciais à base de própolis sobre microrganismos padrão e associados a infecções endodônticas**. 2004. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2004.



REZENDE, G.P.S.R.; COSTA, L.R.R.S.; PIMENTA, F.C.; BARONI, D.A. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. **Braz Dent J**, v.19, n.4, p. 301-05, 2008.

REZENDE, G.P.S.R.; PIMENTA, F.C.; COSTA, L.R.R.S. Antimicrobial activity of two brazilian commercial propolis extracts. **Braz J Oral Sci**, v.5, n.16, p.967-0, 2006.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA-JR, J.F.; SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, v.30, n.5, p. 315-20, 2004.

SABIR, A.; TABBU, C.R.; AGUSTIONO, P. et al. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. **J Oral Sci**, v.47, n.3, p.135-8, 2005.

SALEH, I.M.; RUYTER, I.E.; HAAPASALO, M. et al. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. **Int Endod J**, v.37, n.3, p. 193-8, 2004.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; BORBA, C.M. et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Lett Appl Microb**, v.38, p. 87-92, 2004.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M. et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **J Ethnopharmacol**, v.80, p. 01-07, 2002.

SASSONE, L.M.; FIDEL, RA.; FAVERI, M.; et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. **J Endod**, v.34, p.541-5, 2008.

SATHORN, C.; PARASHOS, P.; MESSER, H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. **Int Endod J**, v.40, p.2-10, 2007.

SAWAYA, A.C.H.F.; SOUZA, K.S.; MARCUCCI, M.C. et al. Analysis of the composition of brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. **Braz J Microbiol.**, v.35, p. 104-109, 2004.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, J.R.A.; LOPES, C.A.M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 73, n.1-2, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **J Ethnopharmacol**, v.98, n. 3, p. 301-5, 2005.

SILVA, F.B.; ALMEIDA, J.M.; SOUSA, S.M.G. Natural medicaments in endodontics - a comparative study of the anti-inflammatory action. **Braz Oral Res**. v.18, n.2, p.174-79, 2004.

SILVA, L.A.B.; NELSON-FILHO, P.; FARIA, G.; SOUZA-GUGELMIN, M.C.M.; ITO, I.Y. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. **Braz Dent J**, v.17. p.144-8, 2006.

SIQUEIRA-JR, J.F.; LOPES, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int Endod J**, v.32, p. 361-369, 1999.

SOUZA-FILHO, F.J.; SOARES, A.D.E.J.; VIANNA, M.E.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; GOMES, B.P. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. **Braz Dent J**, v.19, n.1, p.28-33, 2008.

STEPANOVIĆ, S.; ANTIĆ, N.; DAKIĆ, I. et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiol Res**, v.158, p. 353–357, 2003.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. **Endod Topics**, v.6, p.3-28, 2003.

TANRIVERDI, F.; ESENER, T.; ERGANI, O. et al. An *in vitro* test model for investigation of disinfection of dentinal tubules infected with *Enterococcus faecalis*. **Bras Dent J**, v.8, n.2, p. 67-72, 1997.

TIM-CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob**, v.26, p. 343–356, 2005.

UZEL, A.; SORKUN, K.O.; ONÇAG, O. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microb Research**, v.160, p. 189-195, 2005.

VIANNA, E.; GOMES, B.P.F.A.; SENA, N.T. et al. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. **Braz Dent J**, v.16, n.3, p. 175-180, 2005.

**ANEXO A****PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**



PROTOCOLO Nº  
62/2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**– Identificação:**

Título do projeto: Atividade Antimicrobiana de Medicamento À Base de Própolis e Hidróxido de Cálcio

Pesquisador Responsável: Luciane de Rezende Sucasas da Costa

Instituição onde será realizado: Faculdade de Odontologia

Data de apresentação ao COEP: 10/10/2006

**II – Objetivos:**

Avaliar as propriedades físico-químicas, atividade antimicrobiana de uma pasta de hidróxido de cálcio e própolis, a fim de verificar a viabilidade da utilização das mesmas em terapias pulpares rotineiras em odontopediatria.

Analisar as propriedades físico-químicas da pasta de própolis e hidróxido de cálcio verificando a relação pó-líquido, escoamento e avaliação de pH.

Verificar a eficácia antimicrobiana *in vitro* da pasta contendo própolis e hidróxido de cálcio contra *Enterococcus faecalis*.

**III – Sumário do projeto:**

- Descrição e caracterização da amostra: Material biológico (dentes) de adultos e crianças provenientes de consultório particular e do Centro de Ensino e Pesquisa Odontológica do Brasil (CEPOBRÁS) que tenham seus dentes removidos por motivos vários que não permitam a sua manutenção na arcada dentária.
  - Critérios de inclusão e exclusão: Definidos
  - Adequação da metodologia: A metodologia está claramente definida
  - Adequação das condições: As condições para o desenvolvimento da pesquisa são plenamente adequadas.
-

COEP – UFG

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROTOCOLO Nº  
62/2006**IV – Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:**

- Estrutura do protocolo: Adequado
- Análise de riscos e benefícios: Definidos
- Estrutura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado
- Forma de obtenção do Termo de Consentimento: Definida
- Privacidade e confidencialidade: Definidos

**V – Parecer do COEP:**

Aprovado.

**VI – Data da reunião:**

06/11/2006

Assinatura do relator: 

Assinatura do Coordenador/COEP:

  
Prof. João Teodoro Pádua  
Coordenador de COEP/PPPG UFG

**APÊNDICE A – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido  
para a doação de dentes, banco de dentes**

**CEPOBRAS (CENTRO DE ENSINO E PESQUISA ODONTOLÓGICA  
DO BRASIL)**

**INSTRUMENTO DE DOAÇÃO DE DENTES**

Eu, Prof. Dr. Carlos Estrela, responsável pelo Banco de dentes do Centro de Ensino e Pesquisa Odontológica do Brasil (CEPOBRAS), situado à Rua C-245, Quadra 546, Lote 9, Jardim América 74290-200 Goiânia, GO, vem por esta e melhor forma de direito.

**DOAR**

à CD Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa, para fins de pesquisa aprovada por Comitê de Ética em Pesquisa, .....(quantidade e tipo de dente), declarando, sob as penas da lei, que os dentes objeto da presente doação **foram extraídos por indicação terapêutica**, cujos históricos circunstanciados fazem parte dos prontuários dos pacientes de quem se originam.

Goiânia,.....de.....de 2007.

.....  
Assinatura

**APÊNDICE B – Modelo de termo de consentimento livre e esclarecido  
para a doação de dentes, consultório particular**

**PAPEL TIMBRADO DO CD**

**Instrumento de Doação de Dentes**

.....(nome), cirurgião-dentista inscrito no CROGO sob nº ....., com consultório a Rua.....n °....., sala ....., .....(cidade) vem por esta e melhor forma de direito

**DOAR**

à CD Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa, para fins de pesquisa aprovada por Comitê de Ética em Pesquisa, .....(quantidade e tipo de dente), declarando, sob as penas da lei, que os dentes objeto da presente doação **foram extraídos por indicação terapêutica**, cujos históricos circunstanciados fazem parte dos prontuários dos pacientes de quem se originam, e que se encontram arquivados sob a minha responsabilidade.

Goiânia,.....de.....de 2007.

.....  
Assinatura

## APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido (adultos)

Você(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone 3521-1075 ou 3521-1076.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

**Título do Projeto:** ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MEDICAMENTO À BASE DE PRÓPOLIS E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

**Pesquisador Responsável:** Dra. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa (professora de odontopediatria na Universidade Federal de Goiás), (62) 3521-1819

**Pesquisadores participantes:** Giovanna Pires da Silva Ribeiro de Rezende, Dra. Fabiana Cristina Pimenta, Dr. Carlos Estrela, da Universidade Federal de Goiás.

**Telefone para contato:** 9686-8663 (Giovanna Pires) → inclusive ligações a cobrar.

O **Objetivo Geral** da pesquisa é avaliar as características de uma pasta de hidróxido de cálcio e própolis, que está sendo inventada para ser utilizada em tratamentos de canal dentário, seja de dente de leite ou de dente permanente. Pois ainda não existe pesquisa que estude esta mistura que pode ser benéfica na Odontologia.

**Procedimentos:** serão feitos vários testes em laboratório para observarmos se essa pasta realmente poderá ser utilizada em seres humanos. Para um dos testes, precisaremos de dentes de leite e permanentes, com raiz, extraídos de crianças ou adultos.

Se você resolver fazer parte desta pesquisa, a única coisa que deverá fazer será doar o dente que acabou de ser extraído. Somente utilizaremos os dentes que foram extraídos por indicação do seu dentista, por motivos diversos que não permitam que o dente seja mantido na boca: por exemplo, grande lesão de cárie extensa sem impossibilidade de restaurar, doença periodontal (na gengiva e no osso) avançada ou indicação ortodôntica (dente removido para colocação de aparelho).

### **Outros esclarecimentos:**

- Não haverá nenhum desconforto além do tratamento dentário que você já está fazendo; o risco existe se não guardarmos adequadamente o restante de dente que sobrar, pois até o dente contém material genético da pessoa. Mas garantimos a você de que todo restante de dente será encaminhado para um Banco de Dentes.
- Não haverá benefício direto para vocês, mas caso obtenhamos sucesso com esta pasta pesquisada, poderemos beneficiar pessoas com dor de dente e necessidade de fazer tratamento de canal.
- Você não precisará se deslocar para nenhum atendimento extra além daquele já previsto para o tratamento odontológico no serviço em que a criança é atendida.
- Você tem a garantia de que será esclarecido(a) sobre qualquer dúvida que tiver com relação à pesquisa.
- Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, basta telefonar para uma das pesquisadoras, e não será prejudicado por causa disso.



- Você tem a garantia de que toda a sua informação será guardada em sigilo pelos pesquisadores, e não será possível identificar o seu nome ou outra informação na pesquisa.
- Não há nenhuma forma de ressarcimento a você por participar da pesquisa, pois você não terá nenhum gasto extra com a mesma.

Dra. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa \_\_\_\_\_

### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DOADOR DE DENTES**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo sobre ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MEDICAMENTO À BASE DE PRÓPOLIS E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO, como sujeito doador de dentes. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Giovanna Pires da Silva Ribeiro de Rezende sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Goiânia; \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_ (OU) Datiloscópica:

\_\_\_\_\_

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE D – Termo de consentimento livre e esclarecido (menores)

Seu filho(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que ele(a) faça parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa vocês não serão penalizados(as) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás pelo telefone 3521-1075 ou 3521-1076.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

**Título do Projeto:** ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MEDICAMENTO À BASE DE PRÓPOLIS E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO

**Pesquisador Responsável:** Dra. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa (professora de odontopediatria na Universidade Federal de Goiás), (62) 3521-1819

**Pesquisadores participantes:** Giovanna Pires da Silva Ribeiro de Rezende, Dra. Fabiana Cristina Pimenta, Dr. Carlos Estrela, da Universidade Federal de Goiás.

**Telefone para contato:** 9686-8663 (Giovanna Pires) → inclusive ligações a cobrar.

O **Objetivo Geral** da pesquisa é avaliar as características de uma pasta de hidróxido de cálcio e própolis, que está sendo inventada para ser utilizada em tratamentos de canal dentário, seja de dente de leite ou de dente permanente. Pois ainda não existe pesquisa que estude esta mistura que pode ser benéfica na Odontologia.

Serão feitos vários testes em laboratório para observarmos se essa pasta realmente poderá ser utilizada em seres humanos. Para um dos testes, precisaremos de dentes de leite e permanentes, com raiz, extraídos de crianças ou adultos.

Se você resolver que a criança sob a sua responsabilidade faça parte desta pesquisa, a única coisa que deverá fazer será doar o dente de leite que acabou de ser extraído. Somente utilizaremos os dentes que foram extraídos por indicação do seu dentista, por motivos diversos que não permitam que o dente seja mantido na boca: por exemplo, grande lesão de cárie extensa sem impossibilidade de restaurar, doença periodontal (na gengiva e no osso) avançada ou indicação ortodôntica (dente removido para colocação de aparelho).

Não haverá nenhum desconforto além do tratamento dentário que a criança já está fazendo; o risco existe se não guardarmos adequadamente o restante de dente que sobrar, pois até o dente contém material genético da pessoa. Mas garantimos a você de que todo restante de dente será encaminhado para um Banco de Dentes.

Não haverá benefício direto para vocês, mas caso obtenhamos sucesso com esta pasta pesquisada, poderemos beneficiar pessoas com dor de dente e necessidade de fazer tratamento de canal.

Vocês não precisarão se deslocar para nenhum atendimento extra além daquele já previsto para o tratamento odontológico no serviço em que a criança é atendida.

Vocês têm a garantia de que serão esclarecidos (as) sobre qualquer dúvida que tiverem com relação à pesquisa.

Vocês têm a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, basta telefonar para uma das pesquisadoras, e não serão prejudicados por causa disso.

Vocês têm a garantia de que toda a informação da criança será guardada em sigilo pelos pesquisadores, e não será possível identificar o nome ou outra informação da criança na pesquisa.

Não há nenhuma forma de ressarcimento a vocês por participarem da pesquisa, pois vocês não terão nenhum gasto extra com a mesma.

Dra. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa \_\_\_\_\_

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA  
COMO SUJEITO DOADOR DE DENTES**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo que meu filho(a) \_\_\_\_\_ participe do estudo sobre ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MEDICAMENTO À BASE DE PRÓPOLIS E HIDRÓXIDO DE CÁLCIO, como sujeito doador de dentes. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Giovanna Pires da Silva Ribeiro de Rezende sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Goiânia; \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_

→ (OU) Datiloscópica:

Assentimento da criança: \_\_\_\_\_

→ (OU) Datiloscópica:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_