UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARCELA PAOLA CASTRO ARIAS

**Influência da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana de
pastas de hidróxido de cálcio e própolis**

BAURU
2013

MARCELA PAOLA CASTRO ARIAS

**Influência da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana de
pastas de hidróxido de cálcio e própolis**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade.

Versão corrigida

BAURU
2013

A41a   Arias, Marcela Paola Castro
                                Influência da agitação ultrassônica na ação
                                antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio
                                e própolis / Marcela Paola Castro Arias. –
                                Bauru, 2013.
                                125p. : il. ; 31cm.

                                Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
                                Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

                                Orientadora: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de
                                Andrade

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

A Deus, que guia minha trajetória e ilumina os melhores caminhos e aos meus pais,
meus maiores incentivadores, pelo imenso ato de amor e confiança que
proporcionou minha estada em Bauru para concretizar mais um sonho em busca do
conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia de Bauru, por proporcionar a estrutura para formar e transformar alunos em profissionais da melhor qualidade.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro fundamental para a execução das pesquisas.

A professora Flaviana Bombarda de Andrade, orientadora e amiga, que no exercício do seu dom me ensinou a pesquisar e me apaixonar pela microbiologia. Obrigada por todos os ensinamentos repassados, por sua paciência, atenção, vontade de ensinar e principalmente pela convivência, carinho e compreensão. Você como professora e sua história de vida em busca dos seus objetivos serão um exemplo para minha vida e carreira.

Ao professor Marco Antonio Hungaro Duarte, por sua ajuda, atenção, boas ideias e, principalmente, pelo conhecimento compartilhado desde as conversas mais informais até as discussões durante as aulas. Obrigada por me permitir esta vivência.

Aos professores Ivaldo Gomes de Moraes, Roberto Brandão, Clóvis Bramante e Norberti Bernadineli, Marco Antonio e Flaviana Andrade, pela hospitalidade e bom relacionamento com os alunos, por todo o conhecimento transmitido e pelas correções, sugestões, críticas sempre construtivas e, principalmente, pelos incentivos ao longo desses anos, objetivando o nosso crescimento profissional e pessoal. Agradeço imensamente pela oportunidade da experiência vivida e pelo privilégio de ter absorvido um pouco do conhecimento de todos vocês.

Aos funcionários do departamento de Endodontia, Suelly, Andressa e Edi Mauro, por sua ajuda, atenção, gentileza e convivência.

A Márcia Graeff, por fazer seu trabalho com amor e paciência. Obrigada por sua companhia, bom humor e por suportar a bagunça que fazíamos (eu e Amanda) na sua sala com a euforia pelas belas imagens durante os experimentos e inúmeros pilotos.

Aos colegas da turma de mestrado, Amanda Maliza, Bruno Guimarães, Carolina Filpo, Marcela Milanezi, Marcelo Vitoriano, Milena Silva e Pablo Amoroso, pela convivência, amizade, cumplicidade e todos os momentos vividos com muita alegria e bom humor.

A minha “dupla” de orientadora e experimentos, Amanda Maliza, pessoa cativante, alegre e com um bom humor inacreditável. Obrigada por sua amizade, por ter permitido dividir com você momentos de alegrias, frustrações, dúvidas e muitas experiências ao longo desses anos, alegrando sempre com sua presença e, principalmente, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao amigo Pablo Amoroso, por sua amizade, boa educação e solicitude de sempre.

Aos colegas do doutorado, Aldo Perochena, Bruno Cavenago, Marina Marciano, Paloma Minotte, Raquel Midená e Ronald Ordinola pela companhia, amizade e ensinamentos.

As amigas Andrea Pereira e Renata Bastos, minhas amigas desde a graduação e que se tornaram minha família em Bauru. Agradeço a companhia, a amizade, as alegrias e saudade vividas em cumplicidade.

Ao meu noivo, Victor Hugo, pelo apoio incondicional, a paciência com o passar dos anos, a saudade vivida com a distância e pelo incentivo nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais e irmão, que são a razão da minha vida, obrigada por permitir e possibilitar a realização dos meus sonhos, pelo apoio e incentivo de sempre e por suportar a saudade durante estes longos anos.

---

*“Não é digno de saborear o mel,
aquele que se afasta da colméia com medo
das picadas das abelhas”*

Willian Shakespeare

Influência da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio e própolis

O objetivo foi avaliar a influência da agitação ultrassônica (U) na atividade antimicrobiana e penetrabilidade de pastas de hidróxido de cálcio (HC) em propilenoglicol, com ou sem extrato etanólico de própolis (EEP) em propilenoglicol a 10%, através da Microscopia Confocal de Varredura a Laser (MCVL) e cultura microbiológica (CM). Para isso setenta e dois tubos de dentina bovina padronizados foram infectados com *Enterococcus faecalis* em caldo BHI (Brain Heart Infusion) utilizando um novo protocolo de contaminação com dois ciclos de centrifugação por 5 dias. Durante o período experimental os espécimes foram divididos em 4 grupos e preenchidos com as medicações a seguir: Grupo1- HC, Grupo 2 – HC + EEP, Grupo 3 – HC + U e Grupo 4 – HC + EEP + U. A agitação ultrassônica foi realizada durante 1 minuto nas direções vestibulo-lingual e mésio-distal, com o auxílio de um inserto liso. As medicações permaneceram no interior dos espécimes por 15 dias. A MCVL analisou as bactérias viáveis (verde) e mortas (vermelho), com o auxílio do corante Live and Dead® nos tubos de dentina após o período de medicação. A contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFCs) foi realizada a partir da cultura microbiológica (CM). As raspas de dentina foram coletadas e diluídas para semeadura em placas de Petri com ágar BHI. Para a penetração foi utilizado o corante Rodamina B durante a manipulação das pastas de HC e as análises feitas por MCVL. O grupo 1 (HC) mostrou a maior viabilidade bacteriana nos tubos de dentina contaminados e o grupo 4 (HC + EEP +U) a menor. A agitação ultrassônica (U) reduziu significativamente a viabilidade bacteriana para todos os grupos. A pasta de HC + EEP mostrou-se mais eficaz que aquela somente com HC ($p<0,05\%$). Concluiu-se que a agitação ultrassônica das pastas de HC aumentou sua atividade antimicrobiana e possibilitou maior penetração intratubular, com preenchimento de túbulos dentinários.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*. Hidróxido de Cálcio. Própolis. Ultrassom.

ABSTRACT

Influence of ultrasonic activation on intradental antimicrobial effect of calcium hydroxide pastes

The purpose was to evaluate the influence of ultrasonic agitation (U) on the antimicrobial potential and penetrability of calcium hydroxide (CH) pastes with or without the ethanolic extract of propolis (EEP) in propylene glycol (10%) using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and microbiological cultures (MC) of infected dentin. Seventy two cylindrical dentin specimens were infected with *Enterococcus faecalis* in BHI broth using a new contamination protocol for 5 days with centrifugations. During the experimental period, the specimens were divided into 4 groups and dressed with the following: Group1- CH paste, Group 2 - CH + EEP, Group 3 CH + U and Group 4 – CH + EEP + U. The ultrasonic activation was made during 1 minute in both directions (buccal-lingual / mesio-distal), with the aid of plain point insertion. The medications remained in the root canals for 15 days. The CLSM analyzed the viable (green) and dead (red) bacteria in the infected dentinal tubules, with Live and Dead dye. The colony forming units (CFUs) count was made possible with the MC method. The dentinal wall debris were collected and diluted to be seeded on Petri BHI-agar plates. For the penetration test, the dye Rodamine B was added to CH pastes during the manipulation and analysed by CLSM. Group 1 (CH) showed the greatest bacteria viability in the infected dentinal tubes and Group 4 (CH + EEP+ U) the lowest. Ultrasonic activation created a significant reduction of bacteria viability for all groups. The CH + EEP paste was more bactericidal than the CH ($p < 0.05\%$). It was possible to conclude that ultrasonic activation of CH pastes increased the antimicrobial action and was responsible for better intradental penetration with fulfilling of the dentinal tubules.

Key words: Calcium Hydroxide. *Enterococcus faecalis*. Propolis. Ultrassound.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 -	Padronização dos dentes incisivos bovinos em tubos de 12mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro interno	43
Figura 2 -	Banho ultrassônico e preparo do inóculo para protocolo de contaminação.....	44
Figura 3 -	Imagens por MCVL dos protocolos de contaminação definidos por Ma et al., 2011 e Haapasalo et al., 1987	47
Figura 4 -	Imagens do protocolo de contaminação desenvolvido neste trabalho	47
Figura 5 -	Imagens por Microscopia Eletrônica de varredura (MEV) do protocolo de contaminação desenvolvido neste trabalho	48
Figura 6 -	Dispositivo de aço inox para apreensão das amostras durante o experimento	49
Figura 7 -	Procedimentos para inserção da medicação intracanal.....	50
Figura 8 -	Esquema mostrando as porções superficial e profunda do canal radicular, representando os locais para aquisição das imagens em MCVL.....	52
Figura 9 -	Dispositivo de aço inox com microtubos contendo meio de cultura BHI antes da coleta	53
Figura 10-	Coleta das raspas de dentina para os procedimentos de cultura microbiológica.....	54
Figura 11-	Procedimento para diluição da solução de meio de cultura BHI e raspas de dentina coletadas para cultura microbiológica	54
Figura 12-	Procedimentos de Cultura microbiológica	55

Figura 13-	Fluxograma das etapas experimentais para contaminação dentinária e inserção de medicação intracanal.....	56
Figura 14-	Ativação ultrassônica da medicação intracanal para análise da penetração da medicação intracanal	57
Figura 15-	Imagens de MCVL após medicação de HC por 15 dias com e sem agitação ultrassônica	65/67
Figura 16-	Imagens de MCVL após medicação de HC e EEP por 15 dias com e sem agitação ultrassônica.....	69/71
Figura 17-	Imagens de MCVL para penetração intratubular da medicação de HC utilizada com e sem agitação ultrassônica	77
Figura 18-	Imagens de MCVL para penetração intratubular da medicação de HC e EEP utilizada com e sem agitação ultrassônica	77

- GRÁFICOS

Gráfico1-	Curva de crescimento para <i>Enterococcus faecalis</i> estabelecida através da relação Absorbância x tempo	45
Gráfico 2 -	Avaliação por escores dos protocolos analisados, quanto a contaminação dentinária por <i>Enterococcus faecalis</i>	46
Gráfico 3 -	Porcentagem de bactérias vivas por μ^3 , após medicação intracanal durante 15 dias	61
Gráfico 4 -	Porcentagem de bactérias vivas por μ^3 nos terços cervical e médio, após medicação intracanal durante 15 dias.....	62
Gráfico 5 -	Porcentagem de bactérias vivas por μ^3 nas regiões superficial e profunda do terço cervical do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias	63
Gráfico 6 -	Porcentagem de bactérias vivas por μ^3 nas regiões superficial e profunda do terço médio do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias	63
Gráfico 7-	Avaliação por escores da penetração das pastas de Hidróxido de Cálcio (CH) e Extrato Etanólico de Própolis com Hidróxido de Cálcio (CH e EEP).....	74
Gráfico 8-	Avaliação por escores da penetração das pastas de Hidróxido de Cálcio (CH) com e sem agitação ultrassônica	75
Gráfico 9-	Avaliação por escores da penetração das pastas de Hidróxido de Cálcio com extrato etanólico de própolis (CH e EEP) com e sem agitação ultrassônica	75
Gráfico10-	Gráfico do relatório de validação de flavonóides através do método analítico para quercetina	110
Gráfico11-	Gráfico do relatório de validação de DPPH – antioxidade, através do método analítico para quercetina	110
Gráfico12-	Gráfico do relatório de validação de fenóis através do método analítico para quercetina	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Quantidade de UFC/mL por grupo para coleta realizada com broca de Largo 6 nas concentrações inicial e 10^{-1}	73
Tabela 2 -	Análise gravimétrica com a amostra de própolis utilizada e padrões estabelecidos	109
Tabela 3 -	Resultados das análises de fenóis, flavonoides e ação antioxidante total e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura	109

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	porcentagem
seg	segundos
min	minutos
h	horas
mm	milímetros
µm	micrômetros
mL	mililitros
x	número de aumentos
p	Significância
°C	Graus Célsius
NaOCl	Hipoclorito de sódio
HC	Hidróxido de Cálcio - Ca(OH)_2
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
MCVL	Microscopia Confocal de Varredura a Laser
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
EDTA	Ácido etilediamino tetra-ácetico
BHI	Infusão cérebro- coração
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	MICRO-ORGANISMOS	41
4.2	ANTIMICROBIANOS	41
4.2.1	Hidróxido de Cálcio P.A.	41
4.2.2	Extrato Etanólico de Própolis (EEP) a 10%	42
4.3	TUBOS DE DENTINA	42
4.4	PROTOCOLO DE CONTAMINAÇÃO	43
4.5	MEDICAÇÃO INTRACANAL	49
4.6	MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)	51
4.7	CULTURA MICROBIOLÓGICA	52
4.8	PENETRAÇÃO DA MEDICAÇÃO INTRACANAL	56
5	RESULTADOS	59
5.1	AVALIAÇÃO POR MCVL	61
5.2	AVALIAÇÃO POR CULTURA MICROBIOLÓGICA	73
5.3	AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO INTRATUBULAR DAS PASTAS	74
6	DISCUSSÃO	79
6.1	DA METODOLOGIA	81
6.2	DOS RESULTADOS	87
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXOS	107

---

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos contribuem de modo significativo para o início e perpetuação das doenças pulpares e sua relação direta com o processo de doença vem sendo demonstrada em diferentes modelos experimentais ao longo do tempo (KAKEHASHI, STANLEY, FITZGERALD, 1965; MÖLLER et al., 1981). Contudo, a eliminação de micro-organismos do sistema de canais radiculares é um objetivo difícil e que envolve várias etapas do tratamento endodôntico, tais como o uso de técnicas adequadas de instrumentação, de soluções irrigadoras e medicação intracanal.

A maior redução microbiana ocorre com o preparo biomecânico (BYSTRÖM; SUNDQVIST, 1981), todavia esta etapa pode ser negligente com algumas porções do canal radicular, que podem permanecer intocadas, principalmente quando o preparo mecanizado é a escolha (METZGER et al., 2010). Além disso, a complexidade anatômica dos dentes humanos deve ser um fator considerado no planejamento do tratamento endodôntico, envolvendo a seleção dos instrumentos e técnica de instrumentação, solução irrigadora e medicação intracanal. Os atuais estudos de anatomia interna revelam com maior clareza a grande complexidade dos sistemas de canais radiculares e, com isso, a dificuldade para tratá-los (VILLAS BÔAS et al., 2011), principalmente quando se tratam de dentes com polpas necrosadas, altamente colonizados por micro-organismos.

In vivo a redução da carga microbiana e também de endotoxinas após o preparo biomecânico foi demonstrado em estudos recentes, evidenciando a importância do conjunto de ações que constituem o tratamento endodôntico (VIANNA et al., 2007) e envolve não só a instrumentação, como também o uso de substâncias químicas e medicação intracanal. A grande redução na quantidade de micro-organismos após o preparo químico-mecânico foi investigada em infecções primárias (MARTINHO et al., 2010) e secundárias (ENDO et al., 2012), com redução significativa, ratificando a importância desta etapa.

A medicação intracanal de escolha nos tratamentos endodônticos de polpa necrosadas, com ou sem lesão periapical evidente radiograficamente, é o hidróxido de cálcio, substância que atua por dissociação iônica, culminando na liberação de

---

íons cálcio e hidroxila. A liberação dos íons promove uma alcalinização do meio, sendo responsável pela desnaturação proteica e agressão à membrana plasmática dos micro-organismos. Desta forma, a dissociação iônica e a capacidade de difusão destes íons pelos túbulos dentinários são imprescindíveis à ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio. Para isso, a presença de solução aquosa é necessária, além de um espaço de tempo para a ação e da proximidade com o local de ação (LEONARDO et al., 2006).

A complexidade anatômica do local de ação do hidróxido de cálcio mostra-se como uma característica desfavorável para esta medicação, em decorrência da dificuldade de alcançar áreas de difícil acesso e que permanecem intocadas pelo preparo biomecânico. Outra dificuldade é a resistência de alguns micro-organismos frente às medicações utilizadas, como ocorre com *Enterococcus faecalis*, que possuem mecanismos de sobrevivência ao pH alcalino (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; EVANS et al., 2002; PINHEIRO et al., 2012).

Estudos anteriores com *E. faecalis* mostraram a pouca efetividade do hidróxido de cálcio contra este micro-organismo, quando se utilizou uma contaminação dentinária por 14 dias, segundo o protocolo clássico de Haapasalo; Orstavik (1987). Este protocolo de contaminação vem sendo utilizado para estudos de substâncias com potencial antimicrobiano, como medicação intracanal e solução irrigadora (MOHAMMADI et al., 2011).

Com objetivo de potencializar a ação do hidróxido de cálcio, algumas substâncias estão sendo acrescentadas e estudadas, dentre elas a clorexidina (GOMES et al., 2006), a própolis (MATTIGATTI et al., 2012, MONCLA et al., 2012) e outras (KANDASWAMY et al., 2010) com potencial anti-inflamatório e antimicrobiano. Os fitoterápicos são medicamentos obtidos por tecnologia farmacêutica e industrializados para comercialização com origem vegetal, caracterizados por apresentar várias substâncias químicas (fitoquímicos) responsáveis por efeitos terapêuticos. Estas substâncias podem ter potencial anti-inflamatório, analgésico e antimicrobiano.

A própolis é uma substância resinosa, extraída pelas abelhas de diferentes espécies de plantas para a proteção da colmeia contra fungos, bactérias e outros insetos. A composição da própolis é variável e dependente da planta da qual foi extraída, do local e do clima da região. O alto teor de flavonóides, substância com potencial antimicrobiano, é frequentemente relatado e atua como antibiótico natural,

---

além de estimular o sistema imunológico do hospedeiro (MARCUCCI 1995, MARCUCCI et al., 2001, MONCLA et al., 2012).

Apesar de algumas substâncias terem sido propostas para potencializar a ação antimicrobiana do HC, poucos relatos foram feitos do uso de meios mecânicos, como o ultrassom, para esta função. A literatura é vasta quando se estuda o ultrassom, sendo observado em muitas modalidades em Endodontia, tais como para irrigação ultrassônica, instrumentação, auxiliar na obturação dos canais radiculares, no auxílio à remoção de medicação intracanal (RÖDIG et al., 2011), instrumentos fraturados (ALOMAIRY, 2009) e pinos intrarradiculares, e principalmente, para auxiliar na limpeza de áreas de difícil acesso em conjunto com soluções irrigadoras com capacidade de dissolução de matéria orgânica, como o hipoclorito de sódio, remoção de *smear layer* e atuação em dissolução de biofilme microbiano (AL-JADAA et al., 2009).

A agitação de medicação intracanal, porém, não é alvo das pesquisas e por isso há uma escassez de trabalhos relacionados. O único relato é de Duarte et al. (2012), que demonstraram que o efeito da agitação ultrassônica da medicação intracanal de hidróxido de cálcio foi favorável, elevando o pH na superfície externa da raiz em reabsorções radiculares externas simuladas. Os resultados demonstraram um aumento do pH para os grupos que sofreram a agitação da medicação com ultrassom e maior liberação de íons cálcio.

A microscopia confocal de varredura a laser é um método que permite a visualização em profundidade, possibilitando a análise no interior dos túbulos dentinários e que vem sendo utilizada com êxito para estudos de potencial antimicrobiano (Ma et al., 2011) e de dissolução de biofilme (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011), com potencial promissor.

Baseado neste contexto e na falta de evidências científicas neste segmento é que este trabalho foi delineado, com o objetivo de verificar a ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio, quando submetidas à agitação ultrassônica sobre *E. faecalis*, além da análise do potencial antimicrobiano do extrato etanólico de própolis a 10% em propilenoglicol e da penetrabilidade das pastas no interior dos túbulos dentinários.

---

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os micro-organismos presentes no canal radicular de dentes com polpa necrosada e lesão periapical constituem uma população mista, com maioria de anaeróbios estritos (63,6%) e menor quantidade de anaeróbios facultativos (34,6%)(ABOU-RASS; BOGEN, 1998).

Enquanto nas infecções pulpare primárias ocorre predominância de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas (GOMES et al., 2004; MARTINHO et al., 2011), anaeróbios facultativos Gram-positivos são isolados frequentemente nas infecções pulpare secundárias (GOMES et al., 2006; PINHEIRO et al., 2003; SIQUEIRA, ROÇAS, 2004), sendo as espécies *E.faecalis* e *C. albicans* predominantes (PINHEIRO et al., 2003b; SIQUEIRA, SEM, 2004; SIQUEIRA, ROÇAS, 2004).

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e comumente presente em casos de lesões periapicais persistentes. São micro-organismos com grande capacidade de invasão dos túbulos dentinários, alta resistência a agentes antimicrobianos, inclusive ao hidróxido de cálcio (HC) medicação mais utilizada em Endodontia (KAYAOGLU et al., 2011).

Evans et al (2002) mostraram que *E. faecalis* possuem alguns mecanismos de resistência, tais como a presença de bomba de prótons que auxilia na acidificação do citoplasma e as torna resistente ao elevado pH, mecanismo de ação antimicrobiano da medicação de hidróxido de cálcio. A resistência fornecida com tais mecanismos não é absoluta, já que houve morte bacteriana quando o pH foi mantido em níveis iguais ou maiores a 11,5 para a medicação de hidróxido de cálcio.

Outros fatores de virulência já evidenciados incluem a presença de enzimas líticas, citolisina, substância de agregação, ferormônios e ácido lipoteicóico. Além disso, *E. faecalis* podem expressar proteínas capazes de alterar as respostas do hospedeiro, como a supressão de linfócitos, um fator de virulência que dificulta o combate aos agentes agressores e contribui para a ocorrência do fracasso endodôntico (STUART et al., 2006).

E. faecalis possui ainda a capacidade de compartilhar algumas das características de virulência com outras espécies, contribuindo para sua sobrevivência no sistema de canais radiculares (STUART et al., 2006).

Outras características foram demonstradas por estudo molecular, evidenciando a presença de genes associados à expressão de cápsula e produção de diversos fatores de virulência que possibilitam a sustentação de uma infecção bem sucedida por longo prazo, através da modulação da resposta imune, principalmente através da diminuição na produção de citocinas e redução da quimiotaxia para macrófagos e neutrófilos, diminuindo assim os mecanismos de fagocitose (PINHEIRO et al., 2012).

E. faecalis está associado a diferentes formas de infecções endodônticas, sendo encontrado com maior frequência em infecções secundárias assintomáticas, por serem capazes de invadir túbulos dentinários e sobreviver durante e após o tratamento endodôntico por até 13 meses (VIVACQUA-GOMES et al., 2005).

O tratamento endodôntico de dentes contaminados requer ação sobre os micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares, o que é realizado através do preparo biomecânico, mas não é o suficiente para deixar este ambiente completamente livre de micro-organismos, necessitando de outras etapas conjuntas e complementares (BYSTRÖM; SUNDQVIST, 1981).

A irrigação com substâncias de potencial antimicrobiano é recomendada durante todas as etapas do tratamento endodôntico para dentes com polpas necrosadas e o hipoclorito de sódio é a mais utilizada por apresentar muitas das características desejáveis, estando entre elas a baixa tensão superficial, capacidade de dissolução de matéria orgânica (recomendada também para polpas vitais) e ação antimicrobiana (ARIAS-MOLIZ et al., 2009).

A irrigação convencional coadjuvada pela aspiração simultânea mostra-se pouco eficiente quando comparada a outras técnicas recentes de irrigação, como o Endovac® e uso de ultrassom. A irrigação ultrassônica passiva, que consiste na agitação da substância irrigadora com um instrumento endodôntico fino, acionado por aparelho de ultrassom tem se mostrado bastante eficiente (ALVES et al. 2011) e promissora sobre diversas situações. Harrison et al. (2010) testaram a ação da irrigação ultrassônica passiva por 1 minuto em raízes de dentes humanos contaminados por *E. faecalis* por 4 semanas. Foi utilizado hipoclorito de sódio a 1% e medicação intracanal de hidróxido de cálcio por uma semana. Os resultados foram

---

satisfatórios e a medicação intracanal após a irrigação promoveu maior morte bacteriana.

Esta modalidade de irrigação é citada como a forma mais eficiente de remover debris do sistema de canais radiculares, inclusive de regiões de istmo (RÖDIG et al., 2010; ALVES et al., 2011) e dos canais laterais, reduzindo a população microbiana do sistema de canais, que apresentam áreas de difícil acesso pela complexidade anatômica presente (KLYN, KIRKPATRICK, RUTLEDGE, 2010).

Além disso, a utilização de irrigação com soluções adequadas (que promovam a dissolução de matéria orgânica) auxilia na remoção de restos de tecido nos casos de polpa vital e restos necróticos, nos dentes contaminados com áreas inacessíveis ao preparo biomecânico (BHUVA, et al., 2010).

Alves et al. (2011) demonstraram a habilidade da irrigação ultrassônica passiva (PIU) e do dispositivo criado a partir de instrumento do tipo Hedström. Este foi utilizado em dentes humanos ovais, contaminados por *E. faecalis* e preparados com instrumentação rotatória (BioRace). Os resultados mostraram que apesar da redução significativa na quantidade de micro-organismos, a técnica de irrigação não influenciou de modo significativo, enquanto que a adição de nova substância como irrigação final (clorexidina a 0,2%) foi responsável por uma redução significativa.

Diante das técnicas de irrigação e substâncias que podem ser utilizadas para esta etapa, a agitação ultrassônica ressurgiu no cenário endodôntico com grande notoriedade. O objetivo é promover o fenômeno da cavitação no interior do líquido com as bolhas produzidas a partir das ondas acústicas. Estas bolhas chegam ao colapso e a energia liberada é transferida para a parede do canal radicular, desta forma ocorre a liberação dos restos encontrados nas paredes dos canais, removidos posteriormente com a aspiração (AHMAD, PITTFORD, CRUM, 1987).

Estudos já demonstraram que o uso de instrumentação e irrigação ultrassônica final, possibilitaram a mensuração de pH elevado no terço apical dos dentes analisados. Este resultado foi associado a maior capacidade de difusão da pasta de hidróxido de cálcio após os procedimentos ultrassônicos, possibilitando a chegada de íons hidroxila na região apical (ZAMPRONIO, SIVIERI-ARAÚJO, BONETTI-FILHO, 2008).

A agitação da medicação intracanal com auxílio do ultrassom possui literatura escassa, mas apresenta resultado animador. Após a agitação de pastas de hidróxido

---

de cálcio foi demonstrado o aumento do pH na superfície externa da raiz em reabsorções simuladas após diferentes tempos de análise (DUARTE et al., 2012).

O preparo biomecânico é responsável por grande redução dos micro-organismos no interior do canal radicular, principalmente os anaeróbios, mas o uso de medicação intracanal potencializa esta redução (BYSTRÖM; SUNDQVIST, 1981; SJOGREN et al., 1997). Por isso, a medicação entre sessões é uma etapa importante durante o tratamento endodôntico e para esta finalidade muitas substâncias podem ser utilizadas, sendo a principal delas o hidróxido de cálcio. Este apresenta propriedades biológicas, que o diferenciam dos demais antissépticos anteriormente utilizados, como não ser irritante, controlar a intensidade e duração do processo inflamatório, debelar a infecção e não interferir ou potencializar o processo de reparo (SILVA, ALMEIDA, SOUSA, 2004).

Contudo, para que o hidróxido de cálcio seja efetivo é necessário que haja contato com os tecidos e a difusão iônica ocorra de maneira satisfatória, tornando o meio alcalino, inapropriado ao crescimento bacteriano, promovendo assim a inativação de porções tóxicas moleculares, como o lípide A das endotoxinas bacterianas (LPS), responsáveis por grande patogenicidade (ZAMPRONIO, SIVIERI-ARAÚJO, BONETTI-FILHO, 2008).

Byström, Claesson e Sundqvist (1985) avaliaram a redução bacteriana após instrumentação e medicação com pasta de hidróxido de cálcio sobre diferentes micro-organismos. Os resultados demonstraram que o *Enterococcus faecalis* foi o micro-organismo que ofereceu maior resistência, sobrevivendo até o pH de 11,5 e com necessidade de maior tempo de contato. No estudo *in vitro*, foram necessários seis minutos para morte desta espécie, enquanto apenas um minuto, por contato direto, foi suficiente para as demais espécies. No entanto, com pH de 12,5 estes micro-organismos não resistiram, concluindo que a medicação de hidróxido de cálcio é um potente agente antimicrobiano, capaz de eliminar grande quantidade de micro-organismos, inclusive *E. faecalis*.

Apesar da baixa atividade sobre *E. faecalis*, (VIANNA et al., 2005; SOUZA-FILHO et al., 2008) a pasta de hidróxido de cálcio atua em diferentes micro-organismos por causar ação destrutiva nas membranas celulares e proteínas estruturais com o aumento elevado do pH.

E. faecalis possui um mecanismo protetor, que lhe confere alguma resistência ao hidróxido de cálcio, pois possuem uma bomba de prótons que acidifica o citoplasma e permite a sobrevivência em pH básico (EVANS et al., 2002).

Os veículos utilizados nas pastas de hidróxido de cálcio influenciam na velocidade de dissociação iônica favorecendo sua penetrabilidade e/ou interação, potencializando ou retardando seu reconhecido poder antimicrobiano. Os veículos apresentam-se como hidrossolúveis: aquosos (soro fisiológico, água destilada e solução anestésica) e viscosos (polietilenoglicol, propilenoglicol, metilcelulose e a glicerina) e não hidrossolúveis (oleosos), como o paramonoclorofenolcanforado, óleo de oliva e lipiodol (ESTRELA; PESCE, 1996).

Um dos veículos mais utilizados com o hidróxido de cálcio é o propilenoglicol, um líquido incolor, que oferece as vantagens do etilenoglicol, mas com baixa toxicidade e pouca ação cumulativa. Possui efeito antimicrobiano e é uma substância higroscópica, benéfico para o uso em Endodontia, já que permite a manutenção da medicação intracanal íntegra por longo período (CRUZ et al., 2002). Foi demonstrado que os veículos aquosos e viscosos propiciam uma dissociação iônica rápida do hidróxido de cálcio (FERREIRA et al., 2004), permitindo maior difusão da pasta no interior do canal radicular. O tempo de permanência recomendado é de 14 a 21 dias para os veículos viscosos (LEONARDO et al., 2006).

Diferentes substâncias estão em estudo objetivando melhorar a atividade antimicrobiana, dentre elas os fitoterápicos, utilizados para diferentes propósitos pela medicina popular e também alvo de pesquisas em Odontologia. O extrato de própolis mostra-se como substância promissora para tratamento de ulcerações e gengivite (TANASIEWICZ et al., 2012). Seu potencial anti-inflamatório e antimicrobiano faz com que este extrato possa ser utilizado em Endodontia, como medicação intracanal (SILVA; ALMEIDA; SOUSA, 2004; FERREIRA et al., 2007).

A própolis é uma resina extraída pelas abelhas de diferentes espécies de plantas para proteção da colmeia contra fungos, bactérias e insetos e sua composição depende não só da planta a qual foi extraída, mas também do clima da região (NOGUEIRA et al., 2007; KAYOGLU et al., 2011).

Substância lipofílica, dura e quebradiça quando resfriada, mas macia, plástica e adesiva quando aquecida, a própolis possui um aroma agradável e cor variável, de acordo com sua origem. É composta por 50% de resinas, 40% de cera e até 10% de

---

substâncias voláteis, sendo a porção resinosa composta principalmente por substâncias fenólicas, tais como flavonóides, ácidos e ésteres e ainda outras substâncias como ácido benzóico, álcool benzil, ácido sórbico e vanilina, e na parte volátil, eugenol, esteróides e outros (RAMOS; MIRANDA, 2007). Todavia, a presença de aldeídos em sua composição (benzaldeído, vanilina) não está relacionada ao potencial mutagênico, já que estudos comprovam o efeito citostático dos seus extratos sobre células tumorais, tanto em cultura quanto em animais (MARCUCCI, 1995).

A ação decorre da composição rica em ésteres bioativos e derivados do ácido cinâmico. É um extrato rico em enzimas inibidoras da fosfolipase A2 e quando veiculada em álcool, promove inibição da enzima hialuronidase, que é responsável por gerar reação inflamatória (MARCUCCI, 1995).

Um estudo que comparou o extrato de própolis com o Otosporin demonstrou excelente ação da própolis no controle da fase aguda do processo inflamatório, já que seu pico de ação ocorre após três horas, diminuindo gradualmente com o tempo, e da ação anti-exsudativa após uma hora, mas demonstrando pouca eficácia sobre as prostaglandinas, mediadores da fase tardia da inflamação e responsáveis por muitas reações teciduais (SILVA; ALMEIDA; SOUSA, 2004).

Paulino et al. (2006) comprovaram a atividade anti-inflamatória do extrato de própolis, a qual está relacionada a grande quantidade de flavonóides que atuam sobre a síntese de óxido nítrico, modulando a inflamação, dentre outros fatores associados. Contudo, apesar dos extratos possuírem vários princípios ativos, que atuam de modo diferenciado, tais como através da inibição da lipoxigenase, proteína quinase C, a interação das substâncias componentes parece ter maior importância para sua ação antimicrobiana (MARCUCCI et al., 2001).

No mesmo sentido, estudos de capeamento pulpar direto em ratos com uso da própolis, demonstrou uma modulação efetiva da resposta inflamatória após uma semana para o grupo de extrato etanólico de própolis com flavonoides e formação de barreira parcial de tecido mineralizado após 4 semanas. Os grupos de extrato etanólico de própolis sem flavonóides e o controle com etanol promoveram, além de inflamação intensa, a não evidênciação de barreira mineralizada (SABIR et al., 2005).

Al Shafer et al. (2004), em estudo *in vitro* testaram a tolerância de fibroblastos periodontais e polpas dentárias humanas a diferentes concentrações de

---

extrato de própolis e hidróxido de cálcio. O trabalho permitiu concluir que há maior viabilidade celular (75%) mesmo em altas concentrações de extrato de própolis (4mg/ml) que em baixas concentrações de hidróxido de cálcio (0,4mg/ml), quando menos de 25% das células estavam viáveis, sendo uma possível alternativa de medicação intracanal com comportamento biocompatível.

Há diversos tipos de extratos de própolis, de acordo com o local de onde é extraído, do tipo e região do país. A própolis vermelha brasileira demonstrou no trabalho de Trusheva et al. (2008) componentes desconhecidos e com grande potencial antimicrobiano, concluindo que, apesar de composições diversas, os diferentes tipos de própolis possuem ação valiosa.

O extrato de própolis testado por Ferreira et al. (2007) em diversas espécies bacterianas comuns nas infecções endodônticas, inclusive sobre *E. faecalis* e cepas anaeróbias, demonstrou efeito antimicrobiano semelhante a outras medicações utilizadas como rotina para esta finalidade, tais como hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado e formocresol. Em lesões periapicais induzidas em dentes de cães o extrato de própolis em solução de propilenoglicol gerou resultados antimicrobianos semelhantes à clorexidina gel 2% e à pasta de hidróxido de cálcio em água destilada após 15 dias (FERREIRA et al., 2004).

A pasta à base de própolis, para medicação intracanal, constituída para combater os micro-organismos do interior do canal radicular entre sessões mostrou resultados semelhantes à pasta de hidróxido de cálcio, para as mesmas espécies bacterianas, quando testada por difusão em ágar (VICTORINO et al., 2010). Outros estudos demonstram a não efetividade de pastas de hidróxido sobre os micro-organismos *Enterococcus faecalis*, que são frequentes em casos de insucesso endodôntico, e apontam a própolis como uma alternativa àquelas medicações sabidamente eficazes, mas muito tóxicas, como paramonoclorofenol canforado (FERREIRA et al., 2007; REZENDE et al., 2008).

O estudo de Kandaswamy et al. (2010) em dentes extraídos e contaminados com *E. faecalis* demonstrou resultado promissor para o extrato de própolis utilizado como medicação intracanal, pois foi observada redução de 71% das bactérias, sendo maior que a pasta de hidróxido de cálcio (55%). A própolis também foi testada em blocos de dentina humana infectados com *E. faecalis*, sendo comparada à clorexidina e ao hidróxido de cálcio, com resultados intermediários, pois a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) foi menor quando comparada

---

à clorexidina, após o primeiro dia, mas similar a ela após o sétimo dia, concluindo que o extrato da própolis tem grande potencial antimicrobiano e mostrou-se superior ao hidróxido de cálcio (KAYAOGLU et al., 2011).

Assim, estudos de Rezende et al. (2008) ao comparar a eficácia de inibição antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio com propilenoglicol e hidróxido de cálcio com própolis, sobre a microbiota coletada de canais radiculares de molares decíduos com necrose pulpar e fístula, obtiveram maiores resultados com aquela que contém própolis, mostrando ser uma associação promissora para obturação de canais radiculares de dentes decíduos e para medicação intracanal de dentes permanentes.

Em busca de novas medicações e veículos que potencializem a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio, uma pasta à base de própolis foi proposta para o uso em Endodontia, na qual há uma concentração mínima efetiva de própolis em veículo aquoso para possibilitar a difusão e ser de fácil remoção, já que o uso do extrato puro, por ser uma resina, tem sua remoção dificultada (VICTORINO et al., 2010). Ferreira et al. (2002) avaliaram a limpeza de paredes dentinárias em microscopia eletrônica de varredura após uso de própolis e hidróxido de cálcio em diferentes veículos deixados como curativo intracanal. Observaram que a própolis no veículo propilenoglicol foi passível de remoção da dentina radicular, comportando-se melhor que a solução aquosa de hidróxido de cálcio.

Victorino et al. (2010) avaliou a dificuldade de remoção de pastas à base de hidróxido de cálcio e própolis utilizadas como medicação intracanal e os resultados não mostraram diferença após análise por microscopia eletrônica de varredura, concluindo que as características físicas das pastas com extrato de própolis são adequadas para serem utilizadas como medicação intracanal.

Para testar a ação de substâncias no interior do canal radicular como medicação entre sessões, alguns métodos já foram estabelecidos na literatura. Haapasalo; Orstavik estabeleceram em 1987 um método que permitia a contaminação intratubular, possibilitando o estudo de atividade antimicrobiana com maior realismo. Para isso, utilizaram dentes incisivos bovinos padronizados em tubos de 4mm de extensão, com 6mm de diâmetro externo e 2,3 mm de diâmetro interno. A contaminação foi realizada com *E. faecalis* por período de 21 dias e comprovada pela microscopia eletrônica de varredura.

A partir de então, algumas modificações foram realizadas com o passar dos anos, buscando uma maior aproximação com a realidade. Utilizando dentes humanos Mercade et al. (2009) realizaram a contaminação com *E. faecalis* por apenas 48h para testar a ação de solução irrigadora, hipoclorito de sódio, com variação do pH.

Para estudar a ação de uma nova solução de hipoclorito de sódio (*hipoclean*) em tubos de dentina confeccionados com dentes incisivos bovinos, **Mohammadi et al. (2011)** utilizaram inóculo de *E. faecalis* por 14 dias.

Para induzir biofilme em dentes bovinos Gründling et al. (2011) utilizaram um inóculo de *E. faecalis* variando entre 3.9×10^7 a 6.3×10^7 UFC/mL por um período de 50 dias.

Saber; El-Hady (2012) utilizaram 72h de contato com solução fresca de *E. faecalis*, ajustada a 1.0 na escala de Mac Farland, em espectrofotômetro, para induzir biofilme em dentina humana.

Utilizando um protocolo de centrifugação para amostras contendo inóculo de *E. faecalis* na concentração de 3×10^6 UFC/mL, Ma et al. (2011) utilizaram apenas 24h para induzir biofilme na superfície das amostras e promover a contaminação intratubular. As amostras confeccionadas a partir de dentes humanos unirradiculados foram padronizadas em 4 mm de comprimento e 1,5mm de diâmetro interno (Gates Glidden 6) e seccionadas para possibilitar a formação de biofilme na superfície interna da dentina.

Os resultados analisados por microscopia confocal de varredura a laser demonstraram bom padrão de contaminação. Uma restrição do modelo experimental utilizado foi a pouca fidelidade à infecção endodôntica real (ambiente oral), já que o modelo adotado foi seccionado, facilitando a penetração do micro-organismo no interior dos túbulos dentinários interna e externamente (Ma et al., 2011).

A análise por microscopia confocal permite a visualização em profundidade dos micro-organismos no interior dos túbulos dentinários, o que é possível pela fluorescência emitida por estes micro-organismos remanescentes ao tratamento após serem corados por 10 minutos com o corante Live/dead® BacLight™ Kit (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada). Este é um kit composto de dois fluorocromos de afinidade pelos ácidos nucleicos, o SYTO-9 e o Iodeto de propídeo. Através da coloração atribuída por esses fluorocromos, é possível determinar a viabilidade microbiana, tendo como parâmetro a integridade da membrana

---

citoplasmática que é imprescindível para a manutenção da viabilidade celular. Quando utilizado apenas um, o fluorocromo SYTO-9 penetra tanto em células vivas, tanto como em células mortas. Em contraste, o Iodeto de propídeo, penetra somente em micro-organismos mortos, com membrana comprometida (JIN et al., 2005).

Quando utilizados simultaneamente, o Iodeto de propídeo reduz o SYTO-9 no interior das células mortas. Deste modo, micro-organismos vivos, com membrana citoplasmática intacta, demonstram fluorescência verde, enquanto que, micro-organismos mortos, com membrana citoplasmática comprometida, apresentam fluorescência vermelha (JIN et al., 2005). Desta forma, é possível não só visualizar como também quantificar a viabilidade bacteriana.

Diante do exposto, a execução deste trabalho justifica-se pela falta de evidências científicas acerca da agitação mecânica de pastas de hidróxido de cálcio para medicação intracanal, assim como a ausência de trabalhos que mostrem a ação antimicrobiana das pastas com auxílio de dispositivo mecânico, o ultrassom, para a agitação, verificando seu alcance intratubular sobre os micro-organismos. Da mesma forma, é interessante avaliar a efetividade da pasta adicionada com própolis também sob agitação ultrassônica.

---

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Verificar a influência da agitação ultrassônica na ação antimicrobiana e penetrabilidade de pastas de hidróxido de cálcio associadas ou não ao extrato etanólico de própolis tipificada, em tubos de dentina contaminados com *Enterococcus faecalis*, através dos métodos de:

1. Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL);
2. Cultura microbiológica.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foi obtida a cepa bacteriana de referência de *Enterococcus faecalis* catalogada com o número de registro da American Type Culture Collection (ATCC) 29212. A verificação da morfologia colonial e pureza da cepa foram realizadas por cultura em placas de Petri e por coloração de Gram.

Os micro-organismos foram cultivados em caldo BHI e passaram por crescimentos sucessivos. O valor de absorbância, obtido pela turvação do meio de cultura medida no espectrofotômetro visível SF325NM (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil) foi relacionada à escala de Mac Farland e realizada a diluição de acordo com concentração desejada. Em estudo piloto foi estabelecida a concentração de 3×10^8 UFC/mL para confecção do inóculo.

4.2 Antimicrobianos

Foram utilizados como antimicrobianos o hidróxido de cálcio veiculado em propilenoglicol e a própolis extraída em etanol sendo posteriormente veiculada em propilenoglicol.

4.2.1 Hidróxido de Cálcio P.A.

- Hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brasil)

- O propilenoglicol foi obtido em farmácia de manipulação e utilizado como veículo para pastas de hidróxido de cálcio com e sem própolis.

- A manipulação das medicações foi realizada na proporção de 3:1 (pó/líquido) em peso e manipuladas em placas de vidro esterilizadas com auxílio de espátula 24. Para cada grupo de 5 dentes, foram utilizados 10g de pó de hidróxido de cálcio e 3,3g de propilenoglicol ou própolis em propilenoglicol.

4.2.2 Extrato etanólico de própolis a 10% (EEP)

O extrato etanólico da própolis foi obtido a partir de amostra tipificada de própolis verde, procedente do estado do Paraná. Para a confecção do extrato etanólico, 50g da própolis bruta (sólida) foi pulverizada e acondicionada em um extrator Soxhlet, utilizando-se etanol à ebulição. Cada Soxhlet recebeu nos cartuchos de celulose 8g da própolis pulverizada e 150 mL de álcool em ebulição, permanecendo conectado ao sistema por 24h. Após este período e o completo resfriamento, a cera foi removida por dupla filtração com filtro vegetal e etanol gelado.

O filtrado foi concentrado em um evaporador rotativo, obtendo-se desta forma o extrato mole, ou extrato etanólico de própolis (EEP). O procedimento de extração foi realizado na Universidade Bandeirantes – UNIBAN – São Paulo, sendo gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

Este extrato mole foi diluído em propilenoglicol com auxílio de balão volumétrico para obter a concentração desejada de 10%, definida em estudo piloto. O extrato de própolis utilizado foi então submetido à análise de fenóis, flavonóides, DPPH (técnica de supressão de radicais livres, empregando-se o radical difenilpicrilhidrazila), umidade, quantidade de cinzas, cera e sólidos solúveis, também na UNIBAN, para mensuração de seus constituintes, de acordo com as tabelas 2 e 3 (Anexo A).

4.3 Tubos de dentina

A confecção dos tubos de dentina foi baseada na metodologia proposta por Haapasalo; Orstavik (1987) com modificações. Os blocos de dentina foram confeccionados a partir de dentes incisivos bovinos recém-extraídos. Estes ficaram imersos por 48 horas em solução de hipoclorito de sódio a 1% para desinfecção superficial e dissolução de tecido mole aderido. Em seguida os dentes foram levados à máquina de corte (Isomet, Buehler, IL, EUA), com refrigeração, para remoção da coroa dentária e dos 5mm apicais, padronizando os tubos em 12 mm de comprimento a partir da junção amelo-cementária. A padronização do diâmetro

---

interno de 1,2 mm foi realizada com lima tipo K 120 (Dentsplay Maillefer, Ballaigues, Suíça).

Em seguida foi utilizada solução de EDTA 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã, PR, Brasil) por 3 minutos para remoção da *smear layer* oriunda do corte e instrumentação, além da irrigação com soro fisiológico.

Os tubos de dentina padronizados permaneceram em frascos com tampa, imersos em água destilada esterilizada e conservados em geladeira.

Os tubos de dentina padronizados receberam uma dupla camada de esmalte de unha na cor vermelha (Quarenta graus, Colorama, SP, Brasil) para impermeabilizar a superfície externa e possibilitar a contaminação via canal radicular apenas (Figura 1). Após 24h para a secagem completa do esmalte, os tubos de dentina foram acondicionados em microtubos plásticos (“ependorfs”) de 1,5 mL em uma base plástica própria (rack para microtubos) e esterilizados em autoclave a 121°C por 24 minutos para serem utilizados no dia seguinte.

Figura 1: Padronização dos dentes incisivos bovinos em tubos de 12 mm de comprimento e 1,2 mm de diâmetro interno. A: Máquina de corte Isomet; B: tubos padronizados; C: amostra impermeabilizada com 2 camadas de esmalte.

4.4 Protocolo de Contaminação

Previamente à contaminação, os blocos de dentina foram inseridos em meio de cultura BHI e submetidos a um banho ultrassônico durante 15 minutos para reidratar as amostras e possibilitar a penetração máxima do meio de cultura nos túbulos dentinários (Figura 2A). A contaminação com o micro-organismo traçador (cepa de referência *Enterococcus faecalis* ATCC – American Type Culture Collection

número 29212), em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth, Difco, EUA) por um período de cinco dias, foi realizada seguindo o protocolo de Ma et al. (2011) com modificações.

Figura 2: Banho ultrassônico e preparo do inóculo para protocolo de contaminação. A: Banho ultrassônico prévio ao procedimento de contaminação; B: Inóculo recém-preparado; C: Inóculo após 7h em estufa a 37°C.

O procedimento iniciou-se com a execução de culturas sucessivas, a partir da amostra inicial congelada. O procedimento foi repetido após 24h por duas vezes. O protocolo de contaminação seguiu por quatro dias a partir da obtenção da cultura em crescimento.

O primeiro dia de contaminação iniciou-se pela confecção do inóculo a uma concentração de 3×10^8 UFC/mL, baseada da absorbância dos tubos com cultura em crescimento, medidos em espectrofotômetro e comparados à escala de Mac Farland. O ajuste da concentração para a quantidade de meio suficiente para a contaminação, de acordo com a quantidade de amostras, foi realizado baseado na fórmula: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$

Este inóculo de *E. faecalis* foi armazenado em estufa bacteriológica (Estufa Modelo 502-42L, Fanem, SP, Brasil) a 37°C por 7 horas, para que o micro-organismo estivesse na fase de crescimento exponencial (Figura2 B e C) durante a contaminação das amostras. Este período de pré-incubação foi definido em estudo piloto através do estabelecimento da curva de crescimento para *E. faecalis* (Gráfico 1).

Gráfico 1: Curva de crescimento para *Enterococcus faecalis* estabelecida através da relação Absorbância x tempo.

Todos os procedimentos foram realizados dentro da câmara de fluxo laminar do Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru (Centro Integrado de Pesquisa, CIP-FOB/USP).

Após as 7 horas, o meio de cultura BHI utilizado para o banho ultrassônico foi removido e descartado. 1mL da solução inóculo de *E.faecalis* que passou por 7 horas em estufa foi despejada sobre as amostras no interior dos microtubos (Eppendorf, NY, USA). Os microtubos contendo as amostras com o inóculo foram levados à centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5417R, NY, USA), seguindo o protocolo de centrifugação proposto por Ma et al. (2011). Este protocolo prevê a centrifugação em quatro velocidades (1400g; 2000g; 3600g e 5600g), por duas vezes em cada uma delas, durante 5 minutos e na temperatura de 25°C.

O inóculo foi renovado a cada centrifugação. Após os oito ciclos de centrifugação, uma solução esterilizada de BHI foi colocada nos microtubos contendo as amostras, agitadas em vortex (Vortex-mix VX 200, USA) e armazenadas em estufa a 37°C por 24h.

No segundo dia (após 24h), as amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos e a solução turva dos microtubos removida. 1mL de BHI esterilizado foi despejado nas amostras, seguida de um ciclo de centrifugação a 3600g, por 5 minutos a 25°C e novamente armazenadas em estufa a 37°C por 24h.

O terceiro dia iniciou-se com a confecção de um novo inóculo e após 7h na estufa o protocolo de contaminação e centrifugação foi realizado de maneira idêntica àquele realizado no 1º dia. Após 24h em estufa bacteriológica a 37°C, o meio de cultura foi trocado e as amostras foram novamente armazenadas, de modo idêntico ao 2º dia.

O protocolo desenvolvido foi realizado a partir da repetição de metodologias anteriores (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; MA et al., 2011), que geraram resultados insatisfatórios para o modelo experimental e formas de análise adotadas. A partir de modificações destas metodologias consagradas, incluindo: o banho ultrassônico por 15 minutos, previamente a contaminação; maior concentração do inóculo (3×10^8 UFC/mL); utilização do inóculo com micro-organismos em fase de crescimento exponencial, após 7 horas em estufa bacteriológica; período total de contaminação de 5 dias e trocas de meio alternadas às centrifugações (2 vezes); o protocolo desenvolvido para este trabalho mostrou um padrão de contaminação superior (gráfico 2 e figuras 3 e 4).

Gráfico 2: Avaliação por escores dos protocolos analisados, quanto à contaminação dentinária por *Enterococcus faecalis*.

Figura 3: Imagens por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) das metodologias testadas em estudo piloto.

Figura 4: Imagens de MCVL metodologia desenvolvida para este trabalho. A e C: terço cervical; B e D: terço médio.

A comprovação da contaminação obtida com o protocolo desenvolvido foi realizada através da microscopia confocal de varredura a laser e também por microscopia eletrônica de varredura (figura 5).

Figura 5: Imagens obtidas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da metodologia desenvolvida para este trabalho. A e C: Contaminação no terço cervical ; B e D: Terço médio.

Com o término do protocolo de contaminação, os blocos de dentina foram divididos em quatro grupos e receberam as respectivas medicações:

- Grupo 1: pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol (HC);
  - Grupo 2: pasta de hidróxido de cálcio e extrato etanólico de própolis a 10% em propilenoglicol (HCP);
  - Grupo 3: pasta de hidróxido de cálcio com propilenoglicol e agitação com ultrassom (HCU);
  - Grupo 4: pasta de hidróxido de cálcio e extrato etanólico de própolis a 10% em propilenoglicol e agitação com ultrassom (HCPU).
-

Foram utilizados 10 dentes (tubos de dentina padronizados) para cada grupo, sendo que 05 deles foram submetidos à análise em MCVL e 05 outros submetidos ao método da cultura microbiológica.

4.5 Medicação Intracanal

Para a inserção da medicação intracanal e para a coleta microbiológica foi utilizado um dispositivo de aço inox (mesa, baseado no dispositivo desenvolvido na Endodontia da FOP-Unicamp) que apreende a amostra e evita o contato manual (figura 6). Além disso, todos os instrumentos e dispositivos utilizados foram previamente esterilizados e todo procedimento realizado no interior da câmara de fluxo laminar.

Figura 6: Dispositivo de aço inox utilizado para suporte das amostras e microtubos (*ependorfs*) durante os procedimentos.

As amostras removidas do meio de cultura foram seladas na porção inferior com cimento temporário (Coltosol, Vigodent Coltene, RJ, Brasil) e ajustadas ao dispositivo de apoio (mesa). Este cimento temporário foi selecionado pela facilidade de inserção e remoção sob condições assépticas e por apresentar capacidade seladora marginal intermediária, melhor que o cimento de óxido de zinco e eugenol (ÇIFTCI et al., 2009).

A irrigação com 2 mL de soro fisiológico para cada amostra foi realizada para remover as bactérias em suspensão, seguido pela solução de EDTA 17% por 3 minutos e nova irrigação com soro fisiológico (figura 7A e 7B). A seguir, as amostras foram secas com papel absorvente esterilizado e as medicações preparadas (figura 7C e 7D).

A medicação foi inserida nos tubos de dentina com auxílio de instrumento manual tipo K 90 (Dentsplay Maillefer, Ballaigues, Suíça), até o preenchimento completo do canal. Após o preenchimento do canal, a medicação foi pressionada com penso de algodão esterilizado e as amostras seladas na porção superior (Figura 7E).

Aquelas amostras dos grupos com agitação ultrassônica (Jet Sonic, Gnatus, SP, Brasil) foram preenchidas da mesma maneira e agitadas por 1 minuto com auxílio do inserto liso (TU13, Trinit Periodontia, SP, Brasil) esterilizado, sendo 30 segundos no sentido méso-distal e 30 segundos no sentido vestibulo-lingual. Foram realizados movimentos no sentido do longo eixo durante o tempo de agitação para não favorecer áreas específicas do canal radicular.

Após estas etapas, as amostras foram seladas na extremidade superior e acondicionadas em microtubos de 1,5 mL esterilizados e vazios e armazenados em estufa bacteriológica a 37°C por 15 dias.

Figura 7: Procedimentos para inserção da medicação intracanal. A: Irrigação com solução fisiológica; B: EDTA 17%; C: Secagem com cone de papel absorvente; D: Manipulação da medicação intracanal; E: Inserção da medicação com instrumento manual.

4.6 MCVL – Microscopia Confocal de varredura a Laser

Após 15 dias, as amostras submetidas a esta análise foram removidas dos microtubos e levadas a máquina de corte Isomet, refrigerada com solução fisiológica esterilizada para corte com disco diamantado no sentido longitudinal.

O corte com disco foi realizado para evitar perda de amostras durante o seccionamento com instrumentos manuais (por meio de fraturas) e também pela obrigatoriedade de uma superfície totalmente plana para alcançar o foco necessário para a visualização das amostras através da microscopia confocal.

As duas metades passaram por 5 minutos em solução de EDTA 17% para remoção da *smear layer* gerada pelo corte e lavagem em solução fisiológica esterilizada.

Este procedimento foi adotado para permitir a melhor penetração do corante utilizado e o tempo de EDTA 17% foi ajustado em estudo piloto, de acordo com a qualidade da fluorescência emitida pelas bactérias após coloração com o corante Live/dead® BacLight™ Kit (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) em microscopia confocal de varredura a laser.

Imediatamente após este tempo as amostras foram coradas com 30µL de Live/dead® BacLight™ Kit por período de 10 a 20 minutos e levadas a visualização em MCVL.

A aquisição das imagens foi realizada de acordo com a figura 8, em microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha), totalizando oito imagens por amostra, sendo 4 de terço cervical e quatro de terço médio de modo sequencial. O escaneamento foi realizado com a objetiva de 40X, a cada 1µm e a profundidade de 12 a 14 µm em alta resolução (1024 X 1024 pixels). Com cinco dentes ou tubos por grupo, totalizou-se 40 imagens por grupo de estudo.

Figura 8: Esquema mostrando as divisões em terços e as porções superficial (A) e profunda (B) do canal radicular, representando os locais para aquisição das imagens em MCVL.

As imagens adquiridas utilizando o programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence *software* (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha) foram levadas ao software Leica LAS AF Lite para fragmentação das camadas, já que a imagem gerada inicialmente é a superposição de diversas fotos de camadas diferentes em profundidade, captadas durante o escaneamento. Em seguida as imagens já fragmentas foram levadas ao software bioImager v2-1 (CHÁVEZ DE PAZ, 2009) para quantificação de bactérias vivas e mortas, baseada na fluorescência vermelha (morta) e verde (viva) emitida pelas bactérias nas imagens avaliadas. Este software permite a diferenciação de bactérias vivas e mortas em porcentagem por μm^3 , denominado de biovolume.

Para confirmação da eficácia do protocolo de contaminação, algumas amostras de seleção randomizada foram levadas a análise por microscopia eletrônica de varredura (JSMT220A, Jeol, Tokyo, Japan), confirmando a contaminação homogênea nas amostras, além dos grupos controle positivos e negativos analisados em microscopia confocal.

4.7 Cultura Microbiológica

Para esta etapa, as amostras foram removidas dos microtubos aos quais permaneceram armazenadas por 15 dias com a medicação intra canal e o selamento foi removido em câmara de fluxo laminar. Em seguida foram apreendidas na mesa de auxílio (dispositivo de aço inox) e irrigadas abundantemente com

---

solução fisiológica esterilizada para remoção da medicação intracanal. Um instrumento manual tipo K 90 foi utilizado para auxiliar na remoção da medicação.

Com as amostras sem medicação e acomodadas na mesa de auxílio, microtubos contendo 1 mL de meio de cultura BHI esterilizado foram encaixados na porção inferior do dispositivo e realizada a coleta microbiológica com auxílio de brocas de Largo 5 (1,5 mm) e 6 (1,7 mm) (Figura 9). As brocas de Largo foram selecionadas devido ao comprimento das amostras (12 milímetros), o que inviabilizaria o uso de brocas esféricas de diferentes diâmetros.

Figura 9: Dispositivo de aço inox com microtubos durante o procedimento de coleta de raspas de dentina.

Estas brocas foram montadas em contra ângulo em baixa rotação e permaneceram acionadas no interior das amostras por período padronizado de 10 segundos, utilizando o movimento de inserção e remoção no sentido do longo eixo das amostras (Figura 10).

A coleta iniciou-se com a broca menos calibrosa, broca de Largo 5 (1,5 mm), seguida pela broca de Largo 6 (1,7mm) em cada uma das amostras. As raspas de dentina excisadas caíam no interior dos microtubos encaixados na porção inferior da mesa de auxílio. Para cada broca utilizada foi utilizado 1 microtubo diferente, contendo 1mL de solução esterilizada de BHI.

Figura 10: Coleta das raspas de dentina para os procedimentos de cultura microbológica. A: dispositivo com microtubos encaixados contendo meio de cultura BHI esterilizado; B: Coleta com broca de Largo em baixa rotação; C: raspas de dentina coletadas nos microtubos.

Estes microtubos removidos do dispositivo de auxílio com as raspas excisadas foram denominados de concentração inicial da coleta. Estes microtubos foram homogeneizados em vortex por 10 segundos e diluídos à concentração de 10^{-1} , passando-se 100 μL do microtubo inicial para um segundo microtubo contendo 900 μL de meio BHI esterilizado (Figura 11).

Figura 11: Procedimento para diluição da solução de meio de cultura BHI e raspas de dentina coletadas na cultura microbológica. A: Coleta da solução inicial; B: Colocação da alíquota em um novo tubo contendo BHI esterilizado.

Os microtubos contendo as raspas de dentina em meio BHI foram identificados e homogeneizados. A seguir, alíquotas de 50 μL de cada microtubo (inicial e diluído) foram semeadas em placas de Petri contendo meio BHI-ágar, com auxílio de alça de Drigalski de vidro, previamente esterilizada. Para cada amostra foram semeadas alíquotas das coletas realizadas com broca 5 na concentração inicial e diluída (10^{-1}) e para as coletas com a broca 6 inicial e diluída (Figura 12).

Figura 12: Procedimentos de Cultura microbiológica. A: Coleta da alíquota de 50 μL ; B: Despejo da alíquota na placa de Petri contendo meio BHI/ágar e C: semeadura da alíquota.

As placas identificadas foram armazenadas em estufa bacteriológica por período de 48h para posterior contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

A contagem foi realizada com auxílio de fundo de papel preto e fosco para facilitar a visualização das colônias. A contagem foi realizada até o total de 100 UFC e partir de então considerado como crescimento confluyente, com impossibilidade de contagem.

A análise estatística foi realizada no Programa GraphPAD Prism 6, utilizando testes não paramétricos de Kruskal Wallis seguido de Dunn, pela ausência de normalidade apresentada.

Os procedimentos experimentais estão representados no quadro a seguir.

Figura 13: Fluxograma das etapas experimentais para contaminação dentinária e inserção de medicação intracanal.

4.8 Penetração da medicação Intracanal

Para este ensaio foram utilizados dentes incisivos bovinos padronizados em 12 mm de comprimento a partir da junção amelocementária e com diâmetro interno de 1,2mm. Foi seguido o protocolo de lavagem em solução fisiológica e uso de solução de EDTA 17% por 5 min para remoção da *smear layer* do corte em máquina Isomet e da instrumentação com lima tipo K 120.

As amostras (n=20) secas e seladas na porção inferior foram divididas em dois grupos de acordo com a medicação utilizada: A- Hidróxido de Cálcio e propilenoglicol (HC) e B- Hidróxido de Cálcio e EEP a 10% em propilenoglicol (EEP).

Metade das amostras de cada grupo recebeu a agitação ultrassônica por 1 minuto, com uso de inserto liso (TU13-Trinit, SP, Brasil) por 30 segundos no sentido méso-distal e 30 segundos no sentido vestibulo-lingual (figura 14A-C). Para não

favorecer nenhuma região específica, o operador, durante o tempo de execução, realizou movimento de penetração e remoção no sentido do longo eixo

Figura 14: Ativação ultrassônica da medicação intracanal. A: Aparelho de ultrassom Jet-Sonic; B: Ponta ultrassônica TU-13 (Trinit); C: Agitação ultrassônica da amostra para análise da penetração da medicação intracanal e D: amostras após cortes para análise em MCVL.

A medicação utilizada foi preparada na proporção de 3:1 (pó/líquido) acrescida de ínfima quantidade de corante Rodamina B a 1% para permitir a visualização em MCVL.

As medicações foram levadas às amostras com auxílio de instrumento manual tipo K 90 até o completo preenchimento e seladas na porção superior. As amostras foram armazenadas em estufa a 37°C por 48h para permitir o ressecamento parcial da medicação no interior dos tubos de dentina, possibilitando o corte das amostras em máquina Isomet com disco diamantado sob refrigeração.

Para visualização em MCVL foram realizados cortes transversais a cada 3mm, possibilitando a obtenção de três discos de dentina de 4 mm de espessura dos terços cervical, médio e apical da amostra (figura 14D).

Imediatamente após o corte, as amostras foram levadas ao microscópio confocal de varredura a laser para aquisição das imagens. Foram adquiridas duas imagens sequenciais de cada terço, a partir da luz do canal em direção à superfície externa da raiz para possibilitar a análise da penetração da medicação intracanal.

Esta avaliação foi realizada através de escores, por três examinadores treinados e calibrados previamente, de acordo com:

- 0- Sem medicação;
- 1- Penetração discreta;
- 2- Penetração profunda;
- 3- Penetração com preenchimento de túbulos.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (MCVL)

As análises por MCVL demonstraram que, de acordo com a viabilidade bacteriana detectada nas imagens, o grupo G1, hidróxido de cálcio em propileno glicol, demonstrou o pior desempenho.

A adição do EEP à pasta de hidróxido de cálcio (G2) foi benéfica, mostrando menor viabilidade celular bacteriana em comparação ao hidróxido de cálcio somente ($p < 0,04$), evidenciando uma ação química diferenciada com a adição do novo componente.

Melhor resultado foi alcançado com a pasta de hidróxido de cálcio quando agitada com ultrassom (G3), mostrando-se mais eficaz que a pasta de hidróxido de cálcio e própolis sem agitação (G2), ou seja, o efeito físico proporcionou maior atividade antibacteriana ($p < 0,05$).

Contudo, a pasta de hidróxido de cálcio e EEP quando submetida à agitação ultrassônica (G4) foi o grupo de melhor desempenho, demonstrando menor viabilidade celular bacteriana em relação à G3 ($p < 0,04$) (gráfico3).

Gráfico 3: Porcentagem de bactérias vivas por μm^3 , após medicação intracanal durante 15 dias através de microscopia confocal de varredura à laser.

Quando os grupos foram comparados nos terços cervical e médio isoladamente, observou-se que houve maior eficácia para as pastas que sofreram agitação ultrassônica, sendo a pasta de hidróxido de cálcio e EEP a que exibiu maior taxa de morte bacteriana ($p < 0,05$) seguida pela pasta de hidróxido de cálcio em propilenoglicol. Esta classificação entre os grupos foi similar nos dois terços. A maior eficácia foi mais fortemente evidenciada pelos grupos que sofreram energização ultrassônica no terço cervical (gráfico 4).

Para os grupos que não sofreram agitação (G1 e G2), a pasta de HC e EEP demonstrou superioridade ao hidróxido de cálcio em propilenoglicol nos dois terços avaliados quanto ao efeito antimicrobiano (gráfico 4).

Gráfico 4: Porcentagem de bactérias vivas por μm^3 nos terços cervical (C) e médio (M), após medicação intracanal dos diferentes grupos durante 15 dias.

Ao comparar a ação das pastas em regiões de profundidades diferentes na espessura dentinária do canal radicular, as pastas com agitação ultrassônica foram significativamente melhores nas duas regiões avaliadas, superficial (A) e profunda (B), e a pasta de HC com EEP (G2) foi superior ao hidróxido de cálcio em propilenoglicol (G1) ($p < 0,01$) (gráfico 5).

A comparação entre regiões no terço cervical mostrou que a pasta de HC com EEP agiu melhor na porção mais superficial ($p < 0,05$), enquanto que na mais profunda não houve diferença entre HC com EEP e HC somente em propilenoglicol. A diferença ficou evidenciada quando houve agitação ultrassônica (gráfico 5).

Gráfico 5: Porcentagem de bactérias vivas por μm^3 nas regiões superficial e profunda do terço cervical do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.

No terço médio a ultrassonoenergização da pasta de hidróxido de cálcio em propilenoglicol (G3) gerou resposta semelhante à pasta de HC com EEP sem agitação (G2) na região mais superficial, comportando-se igualmente a ação química da própolis e a ação física do ultrassom, o que não foi evidenciado na região mais profunda, na qual a ativação ultrassônica favorece o efeito antimicrobiano em profundidade ($p < 0,04$) (gráfico 6).

Gráfico 6: Porcentagem de bactérias vivas por μm^3 nas regiões superficial e profunda do terço médio do canal radicular, após medicação intracanal durante 15 dias.

Figura 15: Imagens da dentina contaminada após medicação de hidróxido de cálcio. Sem agitação na primeira coluna (esquerda) e com energização ultrassônica na segunda coluna (direita).

Figura 16: Imagens da dentina contaminada após medicação de hidróxido de cálcio e extrato etanólico de própolis. Sem agitação na primeira coluna (esquerda) e com energização ultrassônica na segunda coluna (direita).

5.2 AVALIAÇÃO POR CULTURA MICROBIOLÓGICA

Para a cultura microbiológica os resultados estão representados na tabela 1 e demonstraram a formação de unidades formadoras de colônias (UFCs) somente para o grupo do HC quando a coleta foi realizada com a broca de Largo 6 (maior profundidade). Para o grupo G2 (pasta de HC com EEP) somente uma amostra de tubo dentinário gerou crescimento bacteriano após a coleta realizada com broca 6. Para as amostras na diluição de 10^{-1} somente uma amostra apresentou crescimento bacteriano também no grupo de HC (G1).

Os grupos que sofreram agitação ultrassônica não apresentaram UFCs para as duas profundidades analisadas, brocas de Largo 5 (excisão de dentina superficial) e Largo 6 (excisão de dentina profunda) assim como para as duas diluições de cultura microbiológica analisadas (inicial e 10^{-1}).

Tabela 1- Quantidade de UFC/mL por grupo para coleta realizada com broca de Largo 6 (L6) nas concentrações inicial e 10^{-1} .

Grupos (L6)	HC	HC 10^{-1}	HCuS	HCuS 10^{-1}	P	P 10^{-1}	PuS	PuS 10^{-1}
UFC total	32	1	0	0	1	0	0	0

Os métodos utilizados para avaliar a ação antimicrobiana frente às pastas testadas – cultura microbiológica e análise por MCVL - demonstraram correlação positiva (correlação = 0,6) quando aplicado o teste de Sperman ($p < 0,05$), demonstrando, que apesar de diferentes, as metodologias apresentam resultados semelhantes e complementares.

5.3 AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO INTRATUBULAR DAS PASTAS

A análise da penetração da medicação intracanal foi realizada por 03 examinadores e categorizada em escores (ver material e métodos item 4.8), demonstrando não haver diferença entre os grupos G1 e G2, isto é, a presença do extrato etanólico da própolis não influenciou na penetração nos túbulos dentinários, utilizando o propilenoglicol como veículo (gráfico 7).

Gráfico 7: Avaliação por escores da penetração das pastas de Hidróxido de Cálcio e Extrato Etanólico de Própolis com Hidróxido de Cálcio.

A agitação ultrassônica possibilitou maior preenchimento dos túbulos dentinários (gráfico 8), quando comparado àqueles grupos que receberam a mesma medicação somente com a introdução por instrumento manual (K 90) ($p < 0,04$), exceto para a medicação de HC e EEP no terço apical, que não evidenciou diferença na profundidade de penetração das pastas com ou sem a energização ultrassônica (gráfico 9). As figuras 17 e 18 mostram imagens da penetração das medicações, evidenciada com corante Rodamina B após o corte.

Gráfico 8: Avaliação por escores da penetração das pastas de Hidróxido de Cálcio e propilenoglicol com e sem agitação ultrassônica.

Gráfico 9: Avaliação por escores da penetração das pastas de Hidróxido de Cálcio e Extratao etanólico de própolis com e sem agitação ultrassônica.

Figura 17: Imagens da penetração da medicação intracanal de hidróxido de cálcio (HC) e Hidróxido de cálcio com ultrassom (HCuS).

Figura 18: Imagens da penetração da medicação intracanal de hidróxido de cálcio e Própolis (P) e Hidróxido de cálcio e própolis com agitação ultrassônica (PuS).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 DA METODOLOGIA

Nesta pesquisa, dois métodos diferentes, mas complementares foram utilizados para análise das substâncias testadas em dentes bovinos, objetivando resultados mais precisos: a cultura microbiológica e a análise em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

Desde Haapasalo; Ørstavik (1987), o modelo experimental em tubos de dentina bovina e o uso de *Enterococcus faecalis* passaram a ser comuns para testar medicamentos de interesse endodôntico (EVANS et al., 2003). O estudo de GONZALEZ-CABEZAS et al. (1999) mostrou que a MCVL foi capaz de detectar bactérias em amostras de lesões cáries, pelo uso da técnica de imunofluorescência e também para a detecção da viabilidade de determinados micro-organismos que colonizavam as paredes do canal radicular (GEORGE, KISHEN, SONG, 2005; KISHEN, GEORGE, KUMAR, 2006; FIMPLE et al., 2008).

Neste estudo a MCVL foi escolhida por permitir a visualização das bactérias em profundidade no interior dos túbulos dentinários, através da fluorescência emitida pelos micro-organismos corados, no interior dos túbulos dentinários.

Além deste, a cultura microbiológica foi utilizada como o método clássico de análise de substâncias antimicrobianas, que possibilita a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) após 48h da execução do procedimento de coleta.

Os critérios utilizados para estabelecer a metodologia de contaminação dentinária foram baseados na determinação da viabilidade bacteriana. Para isso, o modelo experimental utilizado foi constituído na intenção de se aproximar ao máximo da situação real que ocorre nas infecções endodônticas no ambiente oral. Para isso, dentes incisivos bovinos, na forma de tubos padronizados em comprimento e diâmetro interno foram utilizados. A dentina bovina é reconhecida pela similaridade com a dentina humana na estrutura, composição e diâmetro dos túbulos (EVANS et al., 2003).

Com base no presente modelo experimental utilizado, foi estabelecido o novo protocolo de contaminação, ao qual foram adicionadas algumas etapas, dentre elas

---

o banho ultrassônico prévio a contaminação, um novo tempo para a preparação do inóculo, tomando como base a curva de crescimento do micro-organismo teste (*E. faecalis*), além do aumento no número de dias de contaminação, com trocas de meio em dias alternados ao protocolo de centrifugação.

Estudos piloto foram necessários para alcançar o protocolo final que possibilitou uma contaminação satisfatória, com maior quantidade de bactérias vivas e com distribuição homogênea, quando comparada a protocolos anteriores (HAAPASALO; ORSTAVIK 1987; MA et al., 2011). Por este estudo paralelo, a análise estatística (Kruskal Wallis e teste de Dunn) das metodologias testadas mostrou que na avaliação subjetiva, através de escores classificados em 0- sem contaminação, 1- pouco contaminado, 2- contaminação mediana e 3- muito contaminado, não houve diferença entre os protocolos de Haapasalo; Orstavik (1987) e Ma et al. (2011). No entanto, a metodologia aqui apresentada demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às duas outras testadas.

A análise objetiva, realizada pela medição do biovolume das bactérias presentes na amostra, com auxílio do Software biomagel v2-1, mostrou não haver diferença significativa entre os protocolos de Ma et al. (2011) e o aqui apresentado neste trabalho. Contudo, ao verificar a quantidade de micro-organismos mortos foi possível notar que, apesar de bastante contaminado, grande parte das bactérias apresentava-se inviável (10%) através do protocolo de Ma et al. (2011). A presença de grande quantidade de bactérias mortas não é ideal, pois os testes com substâncias antimicrobianas pretendem verificar os micro-organismos atingidos pela substância teste. Desta forma, a presença de grande quantidade de bactérias mortas poderia gerar um resultado falso-negativo, favorecendo a medicação ou substância testada.

Ao comparar a metodologia aqui desenvolvida com o protocolo clássico de Haapasalo; Orstavik (1987) através da análise de biovolume foi possível verificar a superioridade do padrão de contaminação do protocolo FOB, demonstrando além de grande quantidade de bactérias, a imensa maioria viva, diferente do protocolo clássico, que mostra inicialmente boa contaminação, mas com alta porcentagem de bactérias mortas (30%).

Assim, a metodologia desenvolvida para o protocolo de contaminação deste trabalho possibilitou a obtenção de uma contaminação homogênea, com alta taxa de viabilidade bacteriana no interior dos túbulos dentinários (bactérias vivas de 95-

---

98%), já que a execução do protocolo original possibilitava alta viabilidade bacteriana, mas sem homogeneidade na amostra, com áreas pouco contaminadas e outras sem contaminação. Isto pode ser explicado pelo modelo experimental utilizado por Ma et al. (2011), que previa a utilização de um tubo de dentina cortado ao meio para possibilitar não só a contaminação intratubular como também a formação de biofilme superficial.

Para este trabalho os dentes bovinos foram seccionados para formar amostras de 12mm de comprimento e 1,2 cm de diâmetro interno. A superfície externa foi impermeabilizada com dupla camada de esmalte e as amostras utilizadas sem cortes na tentativa de simular com maior veracidade o ambiente oral, objetivando a penetração de micro-organismos somente via canal radicular para contaminação *in vitro*.

Os ajustes realizados até o estabelecimento de um novo protocolo de contaminação possibilitaram a penetração maciça de micro-organismos, da forma mais homogênea possível para que a ação da medicação intracanal pudesse ser avaliada de maneira segura e efetiva. Para isso, foram realizados estudos piloto e delineados grupos para o controle da esterilização e da contaminação.

Para confirmação da contaminação efetiva e homogênea após os ajustes no protocolo de contaminação, as amostras foram visualizadas em MCVL e em microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde foi possível observar a presença de bactérias em toda extensão da amostra não só na superfície dentinária, como também no interior dos túbulos dentinários. Nas imagens de MEV foi possível visualizar algumas das características do micro-organismo utilizado (*E. faecalis*), como a forma de cocos de pequeno diâmetro, organizados em duplas ou formando correntes que invadem os túbulos dentinários.

E. faecalis foi escolhido para contaminação intratubular por ser o micro-organismo com comprovada capacidade e facilidade de infectar os túbulos dentinários (HAAPASALO; ØRSTAVIK, 1987), tolerar níveis elevados de pH (ROSENTHAL, SPANGBERG, SAFAVI, 2004) e por sobreviver em ambientes desfavoráveis, tais como canais radiculares já selados (CAMARGO et al., 2007). Além disso, é o micro-organismo mais frequentemente associado aos casos de lesões endodônticas persistentes, o que já foi demonstrado por meio de cultura microbiológica e também por métodos moleculares, em estudos anteriores (CHAVEZ DE PAZ et al., 2007; SHIN et al., 2008).

Estudos moleculares demonstram também que outros fatores estão relacionados à resistência de *E. faecalis*, como a expressão de cápsula em algumas linhagens coletadas de canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical. A expressão destas cápsulas poderiam explicar o potencial patogênico destes micro-organismos e ser responsável pela produção de fatores de virulência diversos (PINHEIRO et al., 2012).

A resistência ao alto pH do *E. faecalis* foi demonstrada na literatura como consequência a presença de bomba de prótons que promove a acidificação do citoplasma bacteriano e torna resistente o micro-organismo em ambientes com pH em torno de 11. Contudo, pH elevados acima de 11,5 seriam letais mesmo na presença da bomba de prótons (EVANS et al., 2002).

Os medicamentos utilizados neste estudo foram a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol (HC) e a pasta de hidróxido de cálcio veiculada em propilenoglicol com extrato etanólico de própolis a 10% (EEP).

A inserção das medicações foi realizada da mesma maneira para todos os grupos. A fim de não promover regiões específicas do canal radicular, as amostras que receberam agitação ultrassônica tiveram esta etapa executada por único operador e com a execução de movimentos de penetração e remoção no sentido do longo eixo. Além disso, o tempo de agitação foi igualmente dividido para os sentidos vestibulo-lingual (30 seg) e méso-distal (30 seg).

Estudos anteriores demonstraram a eficiência do hidróxido de cálcio como medicação intracanal e atribuem sua ação à dissociação iônica em solução aquosa, que gera íons cálcio e hidroxila (HEITHERSAY, 1975), responsáveis pela alcalinização do meio, com pH que alcança valores em torno de 11 (FAVA, SAUNDERS, 1999). O elevado pH torna-se impróprio para a sobrevivência de muitos micro-organismos, por ter efeito destrutivo sobre proteínas e membrana celular.

No entanto, o hidróxido de cálcio não é citado como uma medicação intracanal universal, já que é apontado como medicação pouco eficiente para determinados micro-organismos encontrados no canal radicular, como *E. faecalis* (SOUZA-FILHO et al., 2008). De fato, tem sido relatada a falha do (HC) na eliminação de *Enterococcus faecalis* (GOMES et al., 2006), que se mostram tolerantes a valores de pH elevados (9 a 11,5).

Através de estudo molecular, realizado com molares necrosados, Paiva et al. (2012) demonstraram que a utilização de medicação intracanal de hidróxido de cálcio após o preparo biomecânico foi mais eficaz na redução do contingente microbiano do canal radicular, quando comparada aos grupos que receberam somente o preparo biomecânico, utilizando hipoclorito de sódio e também com o acréscimo de uma irrigação final com clorexidina. Apesar da redução causada pela irrigação final com clorexidina, o uso do hidróxido de cálcio como medicação entre sessões ainda é indicado e outros trabalhos que utilizam metodologias moleculares para identificação dos micro-organismos remanescentes comprovam sua eficácia e uso como medicação de escolha (MANZUR et al., 2007; SAKAMOTO et al., 2008).

A associação de outras substâncias ao HC é comum e objetiva melhorar a ação antimicrobiana do mesmo. Algumas substâncias têm sido utilizadas para promover aumento na eficácia da pasta de hidróxido de cálcio, dentre elas a própolis, que em formulação de pasta já foi estudada e demonstrou resultados preliminares positivos em relação ao hidróxido de cálcio somente com propilenoglicol (REZENDE et al., 2008).

O EEP foi produzido com base no protocolo farmacêutico desenvolvido pela Professora Doutora Maria Cristina Marcucci (Universidade Bandeirantes SP, Brasil) e gentilmente cedido para esta pesquisa.

A amostra utilizada passou pela análise de componentes (cromatograma) e pelos testes de pH, além da quantificação de DPPH (antioxidante), fenóis, flavonóides, umidade, cinzas, resíduos sólidos solúveis, cera e outros que demonstraram a qualidade da amostra utilizada. O extrato mole produzido ao final do processo foi diluído em propilenoglicol, com auxílio de balão volumétrico para atingir a concentração de 10%. Esta solução foi armazenada em recipiente de vidro esterilizado com tampa de rosca e mantido em geladeira durante todo o período experimental.

A composição química da própolis é bastante variável e depende da flora no local da coleta (SABIR et al., 2005; BANKOVA, 2005). A amostra de própolis utilizada nesta pesquisa teve sua composição analisada, de acordo com o cromatograma (tabelas 2 e 3), mostrando que a amostra estava dentro dos padrões definidos pela legislação.

Estudo de capeamento pulpar direto utilizando EEP, com e sem flavonóides isolados, demonstrou que a própolis sem flavonóides promoveu nível médio de

---

inflamação após 1 semana e níveis elevados após 2, 3 e 4 semanas, sem formação de barreira mineralizada. Já o grupo de própolis com flavonóides apresentou inflamação após 1 semana, assim como aquele grupo sem flavonoides, com redução ao passar das semanas e presença de barreira mineralizada parcial após 4 semanas (SABIR et al., 2005).

A eficácia antimicrobiana da própolis é atribuída à ação em conjunto dos componentes, que vem sendo demonstrada com maior importância do que a ação individual de algum componente em específico, apesar das potencialidades individuais de cada substância. Portanto, o sinergismo dos componentes seria o fator responsável pela ação benéfica da própolis (KAYOUGLU et al., 2011). Porém, estudos sobre o comportamento biológico desta substância devem ser realizados para que formulações possam ser utilizadas e comercializadas com segurança para medicação intracanal em Endodontia. Ademais, pesquisas posteriores em dentes humanos também devem ser realizadas para obter resultados mais precisos.

Especificamente contra espécies de *Enterococcus*, isoladas de lesões endodônticas persistentes de humanos e macacos, além de *Lactobacillus* provenientes de suplementos alimentares, Moncla et al. (2012) estudaram a atividade inibitória da própolis de origem brasileira. Os resultados, através de difusão em ágar, demonstraram a ação efetiva da própolis contra espécies isoladas de *E. faecium* e *E. faecalis* de humanos e animais.

Estes resultados mostram-se de acordo com outros trabalhos da literatura recente, que demonstram ação efetiva da própolis em comparação as medicações clássicas da Endodontia (Hipoclorito de sódio 2%, Clorexidina 2%, EDTA, MTAD e hidróxido de cálcio) sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, quando avaliado por difusão em ágar. Apesar de a Clorexidina e MTAD terem sido os mais efetivos, a própolis apresentou-se melhor que o hidróxido de cálcio (MATTIGATTI et al., 2012), resultado também confirmado por metodologia de diluição em caldo (FERREIRA et al., 2007).

6.2 DOS RESULTADOS

Os resultados de cultura microbiológica demonstraram algumas colônias bacterianas para todas as amostras coletadas com brocas de Largo 6 para o grupo do hidróxido de cálcio (grupo 1), em acordo com os resultados demonstrados na MCVL, que demonstrou a maior viabilidade bacteriana para este grupo, sendo clara sua menor efetividade como medicação intracanal contra *E. faecalis*.

Através da correlação de Spearman positiva, comparando-se os resultados das duas metodologias, MCLV e cultura microbiológica, é possível certificar-se de resultados fidedignos para ambas, apesar de a cultura microbiológica analisar somente as raspas de dentina excisadas pelas brocas de Largo, enquanto que a microscopia confocal analisa o espécime em maior detalhe, já que a penetração do laser permite a captura do corante em profundidade ao longo da amostra. Com isso é possível afirmar que a cultura microbiológica não é um método antiquado, nem a MCVL impreciso, e podem ser utilizadas para análise de substâncias antimicrobianas com sucesso.

Os presentes resultados demonstraram que, após 15 dias de medicação, a ação química da própolis ou a física da ultrassonoenergização podem trazer melhores resultados na redução ou eliminação de *E. faecalis* nos túbulos dentinários, mesmo com uso de medicação de hidróxido de cálcio somente com propilenoglicol, na qual a ação antimicrobiana ocorre por elevação do pH.

Além disso, estudos anteriores concluíram que não houve diferença no efeito antibacteriano de pastas de HC com clorexidina e HC somente contra *E. faecalis* e *P. gingivalis*, quando utilizado como medicação intracanal em dentes decíduos necrosados, com ou sem áreas de radiolucência sugestivas de lesões crônicas periapicais (GONDIM et al., 2012).

Os presentes resultados, com baixa viabilidade bacteriana para os grupos contendo EEP, confirmam a ação antimicrobiana da própolis pelos dois métodos (MCVL e microbiologia cultura) com o modelo experimental utilizado. Esse recurso é especialmente importante para a associação ao hidróxido de cálcio para medicação intracanal de dentes com necrose pulpar e lesão periapical, lesões persistentes, reabsorções radiculares e casos de traumatismos dento-alveolares, quando se pretende alcalinizar o meio de maneira eficiente e obter ação antimicrobiana, utilizando-se da medicação de rotina (hidróxido de cálcio), mas que possui alguma

---

dificuldade em determinados micro-organismos, como *E. faecalis* (VIANNA et al., 2005; GOMES et al., 2006). Além disso, a adição da própolis possivelmente irá melhorar a característica de reparo, uma vez que é uma substância biocompatível (AL SHAHER et al., 2004, SILVA; ALMEIDA; SOUSA, 2004, PAULINO et al., 2006).

No presente estudo, a pasta de própolis com hidróxido de cálcio foi a medicação mais eficaz, atuando de maneira expressiva sobre *Enterococcus faecalis* e de acordo com trabalhos anteriores da literatura (FERREIRA et al., 2007; AWAWDEH, AL-BEITAWI, HAMMAD, 2009; KANDASWAMY et al., 2010), que comprovaram a ação da própolis sobre micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Também Victorino et al. (2010) pelo método de difusão em ágar, comprovaram que formulações farmacêuticas de pastas de HC com própolis mostraram melhores resultados que o grupo controle com hidróxido de cálcio apenas.

A agitação ultrassônica do HC (Grupo 3) promoveu melhora significativa, demonstrada pela a baixa viabilidade bacteriana na MCVL e pela ausência de UFCs para este grupo na cultura microbiológica, nas coletas realizadas com brocas de Largo 5 e 6, demonstrando a efetividade da medicação mesmo na porção mais profunda do canal radicular, alcançada com a excisão de raspas de dentina com broca de Largo 6 (1,70 mm).

Não houve a formação de UFCs também para o grupo 4 (pasta com EEP com agitação ultrassônica) nas concentrações inicial e diluída com brocas de Largo de 5 e 6. O grupo 2 (pasta com EEP) apresentou somente uma amostra com colônia bacteriana, quando a coleta foi realizada com broca de Largo 6.

Este resultado concorda com Duarte et al. (2012) que demonstraram maior liberação de cálcio e elevado pH na porção externa da raiz, em reabsorções externas simuladas, quando a pasta de hidróxido de cálcio sofreu a energização ultrassônica. Esses resultados foram explicados pelos autores por uma provável intensificação da ionização promovida pela agitação ultrassônica, ou ainda em decorrência da maior penetração das partículas de hidróxido de cálcio nos túbulos dentinários com a agitação. A menor tensão superficial do propilenoglicol permitiria também uma maior penetração de íons de cálcio (DUARTE et al., 2012).

A atividade antimicrobiana em túbulos dentinários aqui estudada foi melhor quando ocorreu a agitação ultrassônica, para as duas medicações testadas. Estes

---

resultados sugerem que a maior penetração de HC poderia gerar pH elevado em maior profundidade nos túbulos dentinários.

Ao analisar a penetração das medicações estudadas em túbulos dentinários, não foi evidenciada diferença significativa entre as medicações utilizadas, refutando a ideia de que a presença da própolis na pasta de HC, por ser uma substância resinosa e que contém cera, teria uma penetração prejudicada em túbulos dentinários. Além disso, a agitação ultrassônica proporcionou maior preenchimento de túbulos dentinários, quando comparada a mesma medicação sem a agitação. Este dado pode auxiliar na elucidação da melhora do efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio ao sofrer a energização ultrassônica.

A ausência de trabalhos anteriores na literatura sobre a agitação de medicação intracanal com uso de ultrassom limita as inferências, mas é incontestável que o hidróxido de cálcio, por ser uma substância que atua por elevação de pH e promoção de alterações proteicas, necrose superficial e eventos que resultam em morte bacteriana e melhora no processo de reparo, foi beneficiado com o impulsionamento da pasta promovido pela energização ultrassônica. A medicação pode atuar nas porções mais profundas de modo semelhante ao que ocorre nas proximidades da luz do canal radicular, isto é, com maior proximidade e em contato com o local de ação.

A agitação promovida pelo ultrassom possibilitou com o maior impulsionamento da pasta, uma maior penetração intratubular observada por MCVL. O contato com maior proximidade da pasta com os micro-organismos pode ter sido a causa da menor viabilidade bacteriana quando a agitação foi realizada. Ademais, a lei de Flick, sobre a movimentação de fluidos, explica que em situações nas quais existem gradientes de concentração de uma substância, ou de temperatura, se produz um fluxo de partículas ou de calor que tende a homogenizar a dissolução e uniformizar a concentração ou a temperatura, através de um movimento aleatório no sentido oposto ao do gradiente. Assim, a dissociação do hidróxido de cálcio em maior profundidade na dentina faria com que, através da movimentação do gradiente, esta dissociação alcançasse ainda mais distante, atingindo micro-organismos em profundidade com maior eficiência.

Desta forma, a metodologia utilizada neste estudo possibilitou a análise da taxa de viabilidade bacteriana em profundidade após 15 dias de medicação intracanal. A medicação de HC com EEP (grupos 2 e 4) demonstrou taxas menores

---

de viabilidade bacteriana e por isso obtiveram melhor comportamento antimicrobiano para os dois métodos analisados. Além disso, a agitação ultrassônica promoveu uma diminuição significativa e mais proeminente de *E. faecalis* para as duas pastas testadas.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando a metodologia e modelo experimental utilizados neste trabalho foi possível observar excelente ação antimicrobiana para as pastas agitadas com ultrassom nas regiões superficial e profunda e superior ação química promovida pela adição do Extrato Etanólico de Própolis ao Hidróxido de Cálcio, principalmente na região mais superficial, demonstrando melhora significativa na ação antimicrobiana da pasta sobre *E.faecalis*. A utilização do ultrassom proporcionou maior penetração intra-dentinária das pastas antimicrobianas.

Referências

REFERÊNCIAS

Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J*. 1998 Jan;31(1):39–47.

Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role. *J Endod*. 1987 Oct;13(10):490–9.

Al-Jadaa A, Paque F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J*. 2009 Jan;42(1):59-65.

Alomairy KH. Evaluating two techniques on removal of fractured rotary nickel-titanium endodontic instruments from root canals: an in vitro study. *J Endod*. 2009 Apr;35(4):559-62.

Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod*. 2004 May;30(5):359-61.

Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rocas IN, Siqueira JF. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod*. 2011 Apr;37(4):496-501.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, et al. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod*. 2009 May;35(5):711–4.

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*. 2009 Aug;35(2):52–8.

Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*. 2005 Aug 22;100(1-2):114-7.

Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular Enterococcus faecalis biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J*. 2010 Mar;43(3):241-50.

Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.

Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol*. 1985 Oct;1(5):170-5.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981 Aug;89(4):321-8.

Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod*. 2007 Apr;33(4):422-6.

Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Mar;75(6):1734-9.

Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J*. 2007 May;40(5):344-55.

Ciftçi A, Vardarli DA, Sönmez IS. Coronal microleakage of four endodontic temporary restorative materials: An in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Oct;108(4):e67-70.

Cruz EV, Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. *Int Endod J*. 2002 Apr; 35(4):330-6.

Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, Bernardineli N, de Andrade FB, Ordinola-Zapata R. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1134-8.

Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, Vivan RR, Morais CA, Tanomaru-Filho M, Ordinola-Zapata R, Moraes IG. Effect of ultrasonic activation on pH and calcium released by calcium hydroxide pastes in simulated external root resorption. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):834-7.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(10):2575-83.

Estrela C, Pesce HF. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide pastes in the presence of connective tissue of the dog. Part I. *Braz Dent J*. 1996;7(1):41-6.

Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod*. 2003 May;29(5):338-9.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):221-8.

Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*. 1999 Aug;32(4):257-82.

Ferreira FBA, Gomes BPFA, Rabang HRC, Marcucci MC, Lauris JRP, Souza-Filho FJ. Antimicrobial evaluation of endodontic treatment in dog's teeth. In: 82st General Session of the International Association of Dental Research, 2004, Honolulu. *J Dent Res*, 2004; 83:3033.

Ferreira FBA, Aznar FD, Souza PARS, Garcia RB, Marcucci MC. Propolis as intracanal medication – SEM of residual in dentine. *J Dent Res*. 2002; 81:262. Presented at 19th Annual Meeting of the Brazilian Society for Dental Research; 2002 Sep; Águas de Lindóia, SP.

Ferreira FBA, Silva e Souza PA, Vale MS, Morais IG, Granjero JM. Evaluation of pH levels and calcium ion release in various calcium hydroxide endodontic dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Mar;97(3): 388-392.

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 Nov;104(5):709-16.

Fimpe JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*. 2008 Jun;34(6):728-34.

George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005 Dec;31(12):867-72.

Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of Calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Oct;102(4):544-50.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):71-6.

Gondim JO, Avaca-Crusca JS, Valentini SR, Zanelli CF, Spolidorio DM, Giro EM. Effect of a calcium hydroxide/chlorhexidine paste as intracanal dressing in human primary teeth with necrotic pulp against *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. *Int J Paediatr Dent*. 2012 Mar;22(2):116-24.

Gonzalez-Cabezas C, Li Y, Gregory RL, Stookey GK. Distribution of three cariogenic bacteria in secondary carious lesions around amalgam restorations. *Caries Res*. 1999 Sep-Oct;33(5):357-65.

Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, Oliveira SO, Figueiredo AP. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1128-33.

Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1375-9.

Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J*. 2010 Nov;43(11):968-77.

Heithersay GS. Calcium hydroxide in treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Br Endod Soc*. 1975 Jul;8(2):74-93

Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendram D, Shah HN. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Dec;22(6):403-10.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 2005;159(3):353-60.

Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2010 May;43(5):419-23.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9.

Kayouglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay E, Sorkun K, Salih B. Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):376–381.

Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2006 May;77(2):406-15.

Klyn SL, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. In vitro comparisons of debris removal of the endo activator system, the F file, ultrasonic irrigation, and NaOCl irrigation alone after hand-rotatory instrumentation in human mandibular molars. *J Endod*. 2010 Aug;36(8):1367-71.

Leonardo MR, Hernandez MEFT, Silva LAB, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Nov;102(5):680-5.

Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod*. 2011 Oct;37(10):1380-5.

Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod*. 2007 Feb;33(2):114-8.

Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties, and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995;26:83-99.

Marcucci MC et al. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2001 Feb;74(2):105-12.

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF et al. Clinical investigations of the efficacy os chemo-mechanical preparation with rotatory nickel-titatum files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod*. 2010a; 36(11):1766-9.

Mattigatti S, Ratnakar P, Moturi S, Varma S, Rairam S. Antimicrobial effect of conventional root canal medicaments vs propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Contemp Dent Pract*. 2012 May 1;13(3):305-9.

Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Feb;107(2):295-8.

Metzger Z, Zary R, Cohen R, Teperovich E, Paqué F. The quality of root canal preparation and root canal obturation in canals treated with rotary versus self-adjusting files: a three-dimensional micro-computed tomographic study. *J Endod*. 2010 Sep;36(9):1569-73.

Mohammadi Z, Mombeinipour A, Giardino L, Shahriari S. Residual antibacterial activity of a new modified sodium hypochlorite-based endodontic irrigation solution Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011 Jul 1;16(4):e588-92.

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981 Dec;89(6):475-84.

Moncla BJ, Guevara PW, Wallace JA, Marcucci MC, Nor JE, Bretz WA. The inhibitory activity of typified propolis against *Enterococcus* species. *Z Naturforsch C*. 2012 May-Jun;67(5-6):249-56.

Nogueira MA, et al. Atividade anti-microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. *Rev Cienc Farm Basica Apl*. 2007;28(1):93-7.

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC et al. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J*. 2012 Jul 10.

Paulino N, et al. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory of brazilian green propolis. *Planta Med.* 2006 Aug;72(10):899-906.

Pinheiro E, Penas PP, Endo M, Gomes BP, Mayer MP. Capsule Locus Polymorphism among Distinct Lineages of *Enterococcus faecalis* Isolated from Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions. *J Endod.* 2012 Jan;38(1):58–61.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):1-11.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003b Apr;18(2):100-3.

Ramos AFN, Miranda JL. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing action. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2007;13(4):697-710.

Rezende GP, da Costa LR, 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(4):301-5.

Rödig T, Hirschleb M, Zapf A, Hülsmann M. Comparison of ultrasonic irrigation and RinsEndo for the removal of calcium hydroxide and Ledermix paste from root canals. *Int Endod J.* 2011 Dec;44(12):1155-61.

Rödig T, Sedghi M, Konietschke F, Lange K, Ziebolz D, Hülsmann M. Efficacy of syringe irrigation, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. *Int Endod J.* 2010 Jul;43(7):581-9.

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Oct;98(4):488-92.

Saber MH, Schwarzberg K, Alonaizan FA, Kelley ST, Sedghizadeh PP, Furlan M, Levy TA, Simon JH, Slots J. Bacterial flora of dental periradicular lesions analyzed by the 454-pyrosequencing technology. *J Endod.* 2012 Nov;38(11):1484-8.

Saber Sel-D, El-Hady SA. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent.* 2012 Jan;6(1):43-50.

Sabir A, Tabbu C, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analyses of rat dent pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci.* 2005 Sep;47(3):135-8.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug;23(4):275-81.

Shin SJ, Jee SW, Song JS, Jung IY, Cha JH, Kim E. Comparison of regrowth of *Enterococcus faecalis* in dentinal tubules after sealing with gutta-percha or Resilon. *J Endod* 2008 Apr;34(4):445-8.

Silva FB, Almeida JM, Sousa SMG. Natural medicaments in endodontics- a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res.* 2004 Apr/Jun; 18(2):174-9.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infections by 16S rDNA-directed multiplex PCR. *J Endod.* 2004 Dec;30(12):851-4.

Siqueira JF Jr, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 May;97(5):632-41.

Siögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Sep;30(5):297-306.

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.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006 Feb;32(2):93-8.

Tanasiewicz M, Skucha-Nowak M, Dawiec M, Król W, Skaba D, Twardawa H. Influence of hygienic preparations with a 3% content of ethanol extract of Brazilian propolis on the state of the oral cavity. *Adv Clin Exp Med.* 2012 Jan-Feb;21(1):81-92.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, da Rocha Pasin F, Tsvetkova I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006 Jun;3(2):249-54.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6): 411-8.

Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Braz Dent J.* 2005;16(3):175-80.

Vianna M, Zilio D, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Concentration of hydrogen ions in several calcium hydroxide pastes over different periods of time. *Braz Dent J.* 2009;20(5):382-8.

Victorino FR, Bramante CM, Zapata RO, Casaroto AR, Garcia RB, Moraes IG, Hidalgo MM. Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. *J Appl Oral Sci.* 2010 Dec;18(6):621-4.

Villas-Bôas MH, Bernardineli N, Cavenago BC, Marciano M, Del Carpio-Perochena A, de Moraes IG, Duarte MH, Bramante CM, Ordinola-Zapata R. Micro-computed tomography study of the internal anatomy of mesial root canals of mandibular molars. *J Endod.* 2011 Dec;37(12):1682-6.

Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J.* 2005 Oct;38(10):697-704.

Wu MK, Wesselink PR. Efficacy of three techniques in cleaning the apical portion of curved root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995 Apr;79(4):492-6.

Zampronio CF, Sivieri-Araújo G, Bonetti-Filho I, Berbert FL. pH changes after manual or ultrasonic instrumentation and smear layer removal with EDTA or ultrasonic. *Dent Traumatol.* 2008 Oct;24(5):542-5.

Anexos

ANEXO A – Tabelas com as propriedades da amostra de própolis utilizada

Tabela 2- Análise gravimétrica com a amostra de própolis utilizada e padrões estabelecidos pelo Ministério de Agricultura.

Experimentos	Resultados	Requisitos do Ministério da Agricultura¹
Teor de cinzas	2,76%	Máximo 5%
Resíduos insolúveis	41,48%	Máximo 40%
Teor de cera	9,74%	Máximo 25%

¹:Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2003.

Tabela 3- Resultados das análises de fenóis, flavonoides e ação antioxidante total e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura.

Experimentos	Resultados	Requisitos do Ministério da Agricultura¹
Fenóis	15%	Mínimo 5%
Flavonóides	0,15%	Mínimo 0,5%
DPPH (ED50)	11 ug/mL	Máximo 22s

¹:Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2003.

ANEXO B - Gráficos da equação da reta para análises de Fenóis, Flavonóides e DPPH

Gráfico 10: Gráfico do relatório de validação de flavonóides através do método analítico para quercetina.

Abs – DPPH

Gráfico 11: Gráfico do relatório de validação de DPPH – antioxidade, através do método analítico para quercetina.

Gráfico 12: Gráfico do relatório de validação de fenóis através do método analítico para quercetina.

ANEXO C – Artigo formatado para publicação no *Journals of Endodontics***Influence of ultrasonic activation on the antimicrobial effect of calcium hydroxide and propolis paste****Abstract**

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial potential of calcium hydroxide (CH) pastes with or without the ethanolic extract of propolis (EEP) and ultrasonic activation in propylene glycol using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and microbiological cultures (MC) of infected dentin. Forty cylindrical dentin specimens were infected with *Enterococcus faecalis* using a new contamination protocol for 5 days with centrifugations. During the experimental period, the specimens were divided into 4 groups and dressed with the following: Group 1- CH paste with propylene glycol, Group 2 - CH plus 10% EEP in propylene glycol. The medications utilized in Group 3 was CH/propylene glycol and 4 was CH/EEP/propylene glycol, both of them submitted to ultrasonic agitation for 1 minute, with the aid of plain point insertion. The medications remained in the root canals for 15 days. The CLSM analysed the viable (green) and dead (red) bacteria in the infected dentinal tubules, with Live and Dead dye. The colony forming unit (CFU) count was made possible with the MC method. The dentinal wall debris were collected and diluted to be seeded on Petri BHI-agar plates. Group 1 showed the greatest bacterial viability in the infected dentinal tubes and Group 4 the lowest. Ultrasonic activation created a significant reduction of bacteria viability. The CH with EEP paste was more bactericidal than the CH with propylene glycol alone ($p < 0.05\%$). The results demonstrated advantages in using EEP with CH pastes as an intracanal medication and better results for ultrasonic agitation.

Introduction

Bacterial invasion of the dentin due to caries or fracture results in inflammation, necrosis of the dental pulp, root canal infection and apical periodontitis (1). To reduce the bacteria during endodontic treatment, irrigants and intracanal medication must be used. However, some bacteria such as *Enterococcus faecalis* possess some resistance to endodontic treatment, confirmed with an adaptive response in the alkaline pH and a functioning proton pump with the capacity to acidify the cytoplasm. (2). Therefore, many substances have been studied to improve the antimicrobial activity of intracanal medications and propolis is one of them.

Propolis is a resinous substance collected by honeybees to protect the beehive from insects and microorganisms. Popular medicine has utilized propolis for a long time and its biological actions have been recognized recently (anti-inflammatory, hepatoprotective, antifungal and antimicrobial) (3). Propolis has a complex and variable composition according to the site of collection and the phenolic compounds, terpenes, aromatic acids and esters have also been reported with antimicrobial combined activities (4).

Different procedures have been researched to improve the antimicrobial activity. Ultrasound is used for many purposes in endodontics, such as agitation of irrigants, root canal instrumentation, fillings and removal of dressings and posts, but not for agitation of medications (5, 6).

The bacteria's ability to penetrate into the dentin can be determined through microbiological analyses by the number of colony forming units (7,8), by the number of infected tubules in the histological sample (9), or by the presence of bacteria in the root canal walls (10). Each one of these methods has its advantages.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) permits the obtainment of a series of optical sections as thin as 0.3 μm of intact biological samples. It is commonly used with vital staining techniques to determine the viability profile, architecture and spatial distribution in microbial biofilms (11). Moreover, it is possible to observe the dentinal tubules infection and differentiated live and dead bacteria.

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste with 10% ethanolic extract of propolis in propylene glycol (vehicle) with or without ultrasonic activation. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) and microbiological culture techniques were used for detection of *Enterococcus*

---

faecalis inside the infected dentinal tubules of bovine origin, after chemical action of the pastes and physical activation of the ultrasound.

Materials and Methods

Specimen Preparation

Fifty-two non-carious bovine teeth were selected and stored in 1% sodium hypochlorite for 48 hours. A root segment with a length of 12mm was prepared by sectioning the crown and apical third. Each root canal was enlarged to a size of a #120 K file and the smear layer was removed using 17% EDTA for 3 minutes. The teeth were washed with sterile water for 10 min. The specimens received a double layer of red nail polish and after complete drying (24hrs), the samples were sterilized by autoclave for 20 min at 121°C. The incubation of the specimens in 5mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth at 37°C for 24 hrs and the CLSM analysis confirmed the sterility of samples.

Dentin infection

The strain *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) from the American Type Culture Collection was used in this study. Isolated colonies of *E. faecalis* after successive cultures were used to create the bacterial inocula in BHI suspension.

The cell suspension was spectrophotometrically measured according to the turbidity of the McFarland scale and adjusted to 3×10^8 CFU/mL. This suspension was incubated for 7 hours to achieve the exponential growth of *E. faecalis*, based on the growth curve established previously.

For the infection of the dentin, under a hood, the blocks were individually inserted into 1 ml of sterilized BHI solution and transferred to an ultrasonic bath for 15 minutes to allow the penetration of the culture medium inside the dentinal tubules. The BHI inocula was added into the microtubes and the centrifugation protocol was performed according to Ma et al. (12). After 24h, the BHI solution was changed and the centrifugation protocol was repeated twice. The contamination of all samples was achieved after 5 days and checked by CLSM.

Medication Dressing

The medications utilized were calcium hydroxide pastes with propylene glycol (CH) (3:1 ratio) and calcium hydroxide with 10% ethanolic extract of propolis (EEP) in propylene glycol (3:1 ratio). The manipulation was made with sterilized materials

---

under a hood. Half of the samples received ultrasonic activation (Jet Sonic, Gnatus, SP, Brazil) by a plain insert (TU13, Trinit Periodontology, SP, Brazil) for 1 minute.

To remove non-adherent bacteria from the root canal walls, the specimens were irrigated with saline and 17% EDTA solution for 3 minutes. The root canals were dried with sterilized absorbent paper points, the medications were inserted with a K 90 manual instrument (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Swiss) until the whole extension of the root canals and then sealed with temporary cement (Coltosol, Vigodent Coltene, RJ, Brazil).

The ultrasonic agitation during 1 minute was made with vertical movements in the buccal-lingual and mesial-distal direction. The root canals were sealed in the upper portion and incubated for 15 days at 37°C in sterilized microtubes.

CLSM analysis

The longitudinal grooves in the specimens were done with a diamond disc and saline sterilized solution in an Isomet machine (Isomet, Buehler, IL, EUA). Next, 17% EDTA was utilized for 5 minutes to remove the groove smear layer and then washed in saline solution. The halves of the dentinal tubes were stained with 30 µL of Live and Dead® dye for 10 minutes.

The samples were examined on an inverted Leica TCS-SPE confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany) using a 40X magnification oil lens. The pictures were obtained by using 23 sections of 1 µm step size in a format of 1024 X 1024 pixels. The pictures of the cervical and middle thirds were taken. For each third, the images were taken in (A) the most superficial region, near the canal, and (B) in the greater depth. Images were acquired using the Leica Application Suite-Advanced Fluorescence software (LAS AF, Leica Mannheim, Germany). The evaluation of bacterial viability was made with the bioImageL TM v21 software (13), for the bacterial count (green/live and red/dead).

Microbiological culture analysis

After the removal of the medications with saline solution and sterilized manual instruments, the dentinal tubes were positioned for collection. Largo burs (#5 and #6) with low speed were used for 10 seconds to collect the dentin debris from the internal surface and directly dropped into the microtubes with fresh sterilized BHI solution. These tubes were homogenized and diluted to facilitate the counting of the CFUs. A rate of 50 µL was spread on Petri dishes from the microtubes of the dentin debris and

---

incubated at 37°C for 48 hrs. All these steps were accomplished with a sterilized stainless steel table device, avoiding hand contact with the samples.

Results

CLSM analysis

After the 15th day of medication insertion, the CLSM results demonstrated greater amount of dead bacteria for the calcium hydroxide with 10% ethanolic extract of propolis in propylene glycol (HC/EEP - 45% of bacterial viability). The bacterial viability was high when calcium hydroxide was only used with propylene glycol (CH) (70%), similar to the positive control group (100%). The use of the ultrasonic device improved the CH antimicrobial action (30% viability) but the group that received ultrasonic activation and the CH/EEP medication was responsible for the lower bacterial viability (20%) (Figures 1 e 2).

The cervical and middle thirds were separately analyzed. The results showed more effectiveness for all the medications in the cervical third (viability 5%-60%). But, with the use of ultrasound, there was considerable antimicrobial improvement in the middle third, showing less bacterial viability (10%-80%), without a statistical significance with the cervical third.

Different depths of the root canal, the area closest to the main root canal (superficial) and the farthest one (deep), were analyzed. The analyses demonstrated that the group with CH/EEP medication was more effective in the deeper portion (10%-60%). The use of ultrasonic agitation resulted in better results for all groups in the two regions (Figure 3).

Microbiologic Culture

After 48h of incubation, the CFU count was obtained and are displayed in Table 1. The group 1 presented more CFUs than the other groups and only in the samples when a #6 Largo bur was utilized (deeper layer of root canal dentine). Only one sample showed bacterial growth in the G2 (CH and EEP paste) with the same bur. The groups with ultrasonic agitation (G3 and G4) did not show any colony in both depth, when using #5 or 6 Largo burs.

The Spearman correlation between the two methodologies, microbiologic culture and CLSM, was positive (correlation = 0.6), showing similarity of the results in both experiments.

Discussion

Two different methodologies were utilized in this study to verify the antimicrobial action of dressing pastes inside bovine root canal: microbiologic culture and confocal laser scanning microscopy (CLSM).

The bovine dentinal block model and the *Enterococcus faecalis* bacterial strain have been commonly used as a reference to test endodontic medications (13, 14) since the Haapasalo and Ørstavik study (8). The *Enterococcus faecalis* strain has shown an ability to infect the dentinal tubules (8), to tolerate high pH levels (15) and to survive in sealed root canals (16). It is also the most prevalent bacterial strain in endodontic cases with persistent lesions (17,18).

Previous studies (19) showed that CLSM is able to detect the vitality of bacteria in carious lesions samples via the use of the immunofluorescence technique (20,21) as well as providing information about the severity of the dentinal infection within the dentinal tubules. In this work, the criteria to establish an adequate methodology consisted of determining the bacterial viability by CLSM. To achieve this, the experimental model tried to simulate the real situation, utilizing bovine dentinal blocks, which are similar to human dentin in structure (22).

The bovine dentin contamination established in the Ma et al. study (12) suffered some modifications. Two ultrasonic baths, a new inocula period based on the *E. faecalis* growth curve and changes in the media and number of days of bacterial growth were added to the new dentin contamination protocol. Therefore it was possible to have a homogeneous contamination and high viability rates within the dentinal tubules (95-98% live bacteria).

The medications utilized in this study were calcium hydroxide with propylene glycol (CH) and CH with 10% ethanolic extract of propolis (EEP) in propylene glycol.

The efficiency of calcium hydroxide as an intracanal dressing is due to its ionic effect based on the chemical dissociation of the calcium and hydroxyl ions (25), which are responsible for the alkalization of the environment (26). Its high pH induces hard tissue formation through mineralization and is also responsible for its bactericidal effect, with a pronounced destructive effect on the bacterial cell membranes. However, CH is not cited as an universal intracanal medication since it is not equally effective against all the microorganisms found in the root canal (27) like enterococci (28, 29), since they tolerate high pH levels.

Various substances and associations with CH are common to achieve better options for *E. faecalis* antimicrobial action, such as Chlorexidine (28). Propolis is one that presents good results (29).

The EEP was extracted based on the biochemical protocol developed and provided by Marcucci (Bandeirantes University SP, Brazil). The chemical composition of propolis is highly variable and depends on the local flora at the site of collection (30, 31). The typified sample used was previously purified and analyzed by high performance liquid cromathography (HPLC) in order to verify the components. The soft solid extract produced was dissolved in propylene glycol to obtain a concentration of 10%.

The similar results, with a positive correlation, of the CLSM and the microbiological culture proved that these methodologies can be safely used for this type of analysis (32). The present results, with low viability for the EEP groups, confirm the antimicrobial action of propolis by the two methods for the experimental model used.

The association of CH and EEP against polymicrobial cultures collected from necrotic and fistulae root canals in the primary molars was effective (33). Via the diffusion agar method, pharmaceutical formulations with propolis showed better results than the control group with calcium hydroxide (34). In addition, propolis has shown biocompatibility, inducing a mineralized barrier formation in direct pulp capping (35). However, before the clinical application, the cytotoxicity of the material and tissue response at implantation can be considered for further studies.

The results demonstrated that CH presented poor antimicrobial action against *E. faecalis* when used only with propylene glycol. However, the association with 10% EEP or mechanical agitation with an ultrasonic device, presented low bacteria viability. This information, according to Duarte et al. (36), demonstrated that the ultrasonic activation of CH pastes favored a higher pH level and calcium ion release in simulated external root resorptions. The hypothesis is that the results probably occurred because of a higher ionization that such an apparatus can provide or perhaps because of the higher penetration of the CH particles into the dentinal tubules. Also, the lesser surface tension of propylene glycol allowed for a greater calcium ion penetration.

The present study has shown that the viability of bacteria in the infected dentin can be determined *in situ*, in an effective way by confocal laser scanning microscopy

---

and microbiological culture. The association of calcium hydroxide and 10% ethanolic extract of propolis are better than the isolated use of CH against *E. faecalis*. In addition, the use of ultrasonic agitation for one minute on the intracanal medication is a simple way to achieve better antimicrobial results for the CH pastes.

References

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
  2. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 35, 221–228, 2002.
  3. Kayouglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay E, Sorkun K, Salih B. Antibacterial Activity of Propolis versus Conventional Endodontic Disinfectants against *Enterococcus faecalis* in Infected Dentinal Tubules. *J Endod* 2011;37:376–381.
  4. Plotinno G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. *J Endod* 2007;33:81–95.
  5. Wiseman A, Cox TC, Paranjpe A, Flake NM, Cohenca N, Johnson JD. Efficacy of sonic and ultrasonic activation for removal of calcium hydroxide from mesial canals of mandibular molars: a microtomographic study. *J Endod* 2011;37:235-8.
  6. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2010 May;43(5):419-23.
  7. Tandjung L, Waltimo T, Hauser I, Heide P, Decker EM, Weiger R. Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo. *Int Endod J* 2007;40:845-51.
  8. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.
  9. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.
  10. Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 2008;41:227-39.
-

11. Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001;80:1436-40.
  12. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A New Noninvasive Model to Study the Effectiveness of Dentin Disinfection by Using Confocal Laser Scanning Microscopy *J Endod*. 2011 Oct;37(10):1380-5. Epub 2011 Jul 30.
  13. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2003;29:338-9.
  14. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:488-92.
  15. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 2007;33:422-6.
  16. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J* 2007;40:344-55.
  17. Shin SJ, Jee SW, Song JS, Jung IY, Cha JH, Kim E. Comparison of regrowth of *Enterococcus faecalis* in dentinal tubules after sealing with gutta-percha or Resilon. *J Endod* 2008;34:445-8.
  18. Gonzalez-Cabezas C, Li Y, Gregory RL, Stookey GK. Distribution of three cariogenic bacteria in secondary carious lesions around amalgam restorations. *Caries Res* 1999;33:357-65.
  19. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31:867-72.
  20. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008;34:728-34.
  21. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2003;29:338-9.
  22. Heithersay GS. Calcium hydroxide in treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Brit Endod Soc* 1975;8:74-98.
  23. Fava LRG, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999;32:257-282.
-

24. Gomes BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J* 2008;19:28-33.
  25. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, et al.. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of Calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:544-550.
  26. Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Braz Dent J* 2005;16:175-180.
  27. Gondim JO, Avaca-Crusca JS, Valentini SR, Zanelli C, Spolidorio DMP, Giro EM. Effect of a calcium hydroxide/chlorhexidine paste as intracanal dressing in human primary teeth with necrotic pulp against *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. *Int J Paediatr Dent*. 2012 Mar;22(2):116-24.
  28. Ferreira FBA, 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 Nov;104(5):709-16.
  29. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 2005;100:114–7.
  30. Uzel A, Sorkun K, Onc,a_g O, Co_gulu D, Genc,ay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 2005;160:189–95.
  31. Pinheiro E, Penas PP, Endo M, Gomes BP, Mayer MP. Capsule Locus Polymorphism among Distinct Lineages of *Enterococcus faecalis* Isolated from Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions. *J Endod* 2012;38(1):58–61.
  32. Rezende GPSR, Costa LRRS, Pimenta FC, Baroni DA. of Endodontic Pastes with Propolis Extracts and Calcium Hydroxide: A Preliminary Study. *Braz Dent J* (2008) 19(4): 301-305.
  33. Victorino FR, Bramante CM, Watanabe E, Ito IY, Franco SL, Hidalgo MM. Antibacterial activity of propolis-based toothpastes for endodontic treatment. *Braz J Pharm Sci* 2009; 45(4): 795-800.
-

34. Sabir A, Tabbu C, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analyses of rat dent pulp tissue capped with propolis. J Oral Sci. 2005; 47(3): 135-8.
35. Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, Vivan RR, Morais CA, Tanomaru-Filho M, Ordinola-Zapata R, Moraes IG. Effect of Ultrasonic Activation on pH and Calcium Released by Calcium Hydroxide Pastes in Simulated External Root Resorption. J Endod 2012;38:834–837.

Figure 1: Images by CLSM after medication for 15 days. A: calcium hydroxide. B: calcium hydroxide with ultrasonic agitation. C: calcium hydroxide with ethanolic extract of propolis. D: calcium hydroxide with ethanolic extract of propolis and ultrasonic agitation.

Figure 2: Graphic on bacterial viability after intracanal medication.

Figure 3: Graphic on bacterial viability in different depths for cervical and middle thirds.

Table 1- Number of UFC/mL for gathering held with Wide drill 6 (L6).

Grupos (L6)	HC	HCuS	P	PuS
UFC	32	0	1	0
total				