

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA CONSERVADORA

FRANCISCO COLPANI ROSALES INÁCIO
LUCAS HENRIQUE TELLES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE UMA SUSPENSÃO
DE PRÓPOLIS FRENTE AO *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Porto Alegre

2010

FRANCISCO COLPANI ROSALES INÁCIO
LUCAS HENRIQUE TELLES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE UMA SUSPENSÃO
DE PRÓPOLIS FRENTE AO *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentando à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof^a Dr. Marcus Vinícius Reis Só

Porto Alegre

2010

ABSTRACT

Objective: Evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of propolis suspension 5.0% and 10.0% propolis suspension against *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Methods: The agar diffusion test and the disc method were used for the following substances: propolis dry extract at 5.0% (n=19) and 10.0% (n=19), chlorhexidine (n=19 positive control) and propylene glycol (n=19 negative control). The halos diameters of the bacterial inhibition were measured after 24 hours.

Results: Statistically significant difference were observed through the Kruskal Wallis test ($p < 0.001$). The chlorhexidine group showed inhibition halos of bacterial growth with average of 6.631 mm, while propolis at 5.0% and 10.0% and the propylene glycol didn't develop halos.

Conclusion: The propolis extract at 5.0% and 10.0 % in the propylene glycol suspension didn't show antimicrobial activity, *in vitro*, against *Enterococcus faecalis*.

Indexing terms: Propolis, *Enterococcus faecalis*, Agar diffusion, Endodontics.

RESUMO

Objetivos: Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana, da suspensão de própolis 5 e 10%, sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Métodos: A técnica de disco-difusão em Ágar foi empregada para determinar a ação antimicrobiana das seguintes substâncias: extrato seco de própolis a 5% (n=19) e 10% (n=19), Clorexidina (n=19 controle positivo) e propilenoglicol (n=19 controle negativo). O diâmetro dos halos de inibição bacteriana foi medido após 24 horas.

Resultados: Diferenças estatisticamente significante foram observadas através do teste de Kruskal Wallis ($p < 0,001$). O grupo da clorexidina mostrou halos de inibição de crescimento bacteriano com média de 6,631 mm, enquanto o própolis a 5 e 10% e o propilenoglicol não apresentaram halos.

Conclusão: O extrato de própolis a 5 e 10% suspenso em propilenoglicol não evidenciou atividade antimicrobiana, *in vitro*, frente ao *Enterococcus faecalis*.

Termos de indexação: Própolis; *Enterococcus faecalis*; Difusão em ágar; Endodontia.

INTRODUÇÃO

A necessidade de novos materiais que apresentem propriedades biológicas e antimicrobianas, aliada ao grande avanço da fitoterapia nos últimos anos tem estimulado a avaliação de diferentes substâncias que possuam propriedades terapêuticas para a odontologia¹⁻³. Exemplo desses produtos é o própolis, uma resina de coloração e consistência variada, produzida pelas abelhas, a partir da mistura de substâncias coletadas de diferentes partes das plantas (brotos, botões florais e exsudatos resinosos) com secreções produzidas em seu organismo⁴. Investigações científicas revelaram efeitos antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, antiinflamatórios, antitumorais e com propriedades imunomoduladoras⁵.

Koo et al.⁶ avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato de própolis a 10% e *Arnica montana* 10% sobre 15 microrganismos da microbiota endodôntica, dentre eles o *E. faecalis*. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em Agar. O extrato de própolis inibiu significativamente todos os microrganismos testados, com maiores halos de inibição para o *actinomyces spp.*⁶

Groisman et al.⁷ avaliaram o efeito do própolis, a 1,5% e 3% e da clorexidina 0,06% e 0,12%, sobre os microrganismos salivares. Os autores verificaram que a solução de própolis a 3% associada à clorexidina 0,12% e que as soluções de própolis 3% e 1,5% associadas à clorexidina 0,06% reduziram o número de *Streptococcus sp* em 26,7 %, 25,9% e 24,9% respectivamente.⁷

Maia Filho et al.⁸ compararam a eficácia de três irrigantes empregados em endodontia e o extrato de própolis frente ao *E. faecalis*. Foi utilizado o teste de difusão em Agar e as seguintes substâncias: hipoclorito de sódio 5%, gel de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio e extrato hidroalcolico de própolis. O extrato de própolis apresentou uma boa atividade antimicrobiana sendo maior que o hipoclorito de sódio 5%, entretanto o gel de clorexidina foi mais efetivo contra o *E. faecalis*.⁸

Awawdeh et al.⁹ compararam a atividade antimicrobiana do própolis e do hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, durante 1 e 2 dias, em um modelo de dentina infectada com *E. faecalis*. Cinquenta discos de dentina de 7 mm de comprimento, obtidos de dentes humanos, foram empregados. Destes 45 foram infectados com *E. faecalis* e divididos em 2 grupos de 20 dentes, (hidróxido de cálcio ou própolis) e 5 dentes como controle positivo. Os

resultados demonstraram que o própolis foi significativamente mais efetivo do que o hidróxido de cálcio, após um curto período de tempo.⁹

Kandaswami et al.¹⁰ investigaram a atividade antimicrobiana da *morinda citrifolia juice*, gel de clorexidina 2%, própolis, povidone iodine 2% e hidróxido de cálcio sobre a dentina do canal radicular infectada com *E. faecalis*, em duas profundidades, 200 e 400 micrometros e em três intervalos de tempo (1, 3 e 5 dias). A redução do número de unidades formadoras de colônia foi estatisticamente significativa para todos os grupos quando comparado com o grupo controle (solução salina). O grupo da clorexidina gel apresentou a melhor eficácia antimicrobiana (100%), seguido pelo grupo da *povidone iodine* (87%), própolis (71%) *morinda juice* (69%) e hidróxido de cálcio (55%). Não houve diferença significativa entre a *morinda citrifolia juice* e o própolis bem como relação às duas profundidades.¹⁰

A instalação de processos infecciosos no sistema de canais radiculares tem como consequência a periodontite apical, sendo o controle dos microrganismos no sistema de canais radiculares um grande desafio do tratamento endodôntico¹¹⁻¹². Para tanto, necessitamos de substâncias que penetrem no sistema de canais e atuem sobre microbiota endodôntica. O hidróxido de cálcio tem sido escolhido em razão das suas propriedades biológicas e antimicrobianas¹³⁻¹⁵. Entretanto, evidências científicas vêm apontando para a resistência de alguns microrganismos ao hidróxido de cálcio¹⁶⁻¹⁷.

Os *E. faecalis* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, encontrados isolados, aos pares ou em cadeias curtas¹⁸. Esse microorganismo é raramente encontrado em infecções primárias¹⁹ mas é uma das espécies mais frequentemente encontradas em casos de retratamento endodôntico.²⁰⁻²¹ Alguns autores relatam que o *E. faecalis* pode estar presente em 38% a 70% dos casos de insucesso do tratamento endodôntico^{18,,22,23} sendo detectado em 20 de 30 casos de infecções endodônticas persistentes associados a dentes com canais obturados¹⁸. Essa alta prevalência nas complicações pós-tratamento endodôntico é atribuída, de modo especial, à sua capacidade de aderir ao colágeno, potencializada pela presença de soro humano e, no processo de colonização, invadir os túbulos dentinários, além de interferir nas defesas do hospedeiro e resistir à ação de substâncias antimicrobianas, fazendo de sua colonização uma constante fonte de reinfecção do canal obturado.^{13,24,26}

Diante dessas questões, o presente estudo tem por objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana, de cepas padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) frente à solução de própolis seco veiculado a propilenoglicol, nas concentrações de 5% e 10%.

MÉTODOS

Este é um estudo experimental, *in vitro*, controlado, realizado no laboratório de bioquímica e microbiologia da Faculdade de Odontologia do Rio Grande do Sul, Brasil (LABIM), no período de Abril a Novembro de 2010.

Procedimentos experimentais

Obtenção das amostras de própolis

O extrato seco de própolis foi obtido no estado do Rio Grande do Sul e analisado pelo Laboratório All Chemistry (Certificado: 37542-1). As soluções de própolis a 5% e a 10% suspensas em propilenoglicol foram manipuladas no laboratório da Farmácia Marcela (Porto Alegre, Rio grande do Sul, Brasil).

Preparo do Ágar

Inicialmente foram preparados 300 mL de meio de cultura ágar cérebro-coração – BHIA (HIMEDIA, Mumbai, Índia) - utilizando-se água destilada como solvente. A seguir, o meio preparado foi esterilizado e, após resfriamento até a temperatura de 50°C, transferido para 19 placas de Petri (150x10mm) esterilizadas. Cada placa recebeu 15 mL de meio de cultura, ficando com uma espessura de 2 mm. Posteriormente, as placas foram levadas à capela de fluxo laminar, em temperatura ambiente, até ocorrer o completo resfriamento do meio de cultura.

Microrganismo utilizado

O *E. faecalis* foi obtido a partir de cepas padrão (ATCC 29212), que foi previamente semeado em uma placa de Petri, contendo BHIA. Após, com uma alça de platina, o microrganismo foi semeado em um tubo contendo 10 mL de caldo de soja tryptcase - TSB (HIMEDIA, Mumbai, Índia) Este tubo foi levado à estufa de cultura e incubadas por um período de 24 horas a 37°C.

Passado esse período, suspensões bacterianas ajustadas de acordo com a turbidez do tubo número 1 da escala de Mac Farland foram obtidas diluindo as colônias bacterianas, crescidas no caldo TSB, em 20 mL de água destilada.

Processo de inoculação do meio

A seguir, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão microbiana foi transferida para cada uma das 19 placas de Petri, contendo meio de cultura. A suspensão foi semeada em toda superfície do meio de cultura com o auxílio de um *swab*, de modo a se obter um crescimento confluyente.

Técnica de disco-difusão em Ágar

Na superfície do meio de cultura inoculado de cada uma das 19 placas foram colocados 4 discos de papel filtro, de um centímetro de diâmetro, previamente confeccionados e esterilizados no Laboratório de microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Antes de serem levados à superfície do meio de cultura, os discos foram embebidos, de forma aleatória, durante o período mínimo de 1 minuto, em 1 mL de uma das substâncias em estudo: C+ (controle positivo, n=19) solução de clorexidina 2%; C- (controle negativo, n=19): propilenoglicol; S1 (n=19): solução de própolis 5%; S2 (n=19): solução de própolis 10%.

Pré-incubação e Incubação

As placas de Petri foram pré-incubadas em temperatura ambiente, por 1 hora, a fim de permitir a difusão das substâncias antes do desenvolvimento microbiano. A seguir, foram incubadas a 37°C, por 24 horas em microaerofilia. Decorrido o período de incubação, com o auxílio de uma régua milimetrada e uma boa fonte de luz refletida, foi realizada a mensuração do diâmetro da zona de inibição do crescimento microbiano ao redor de cada um dos discos. Foram realizadas duas medidas por dois examinadores diferentes. A média de ambas foi calculada e utilizada para fins de análise dos resultados.

Interpretação dos resultados

As medidas dos halos de inibição de crescimento bacteriano, dos grupos experimentais, foram analisadas pela Análise da variância (1 via) e Teste de Tukey com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados do presente estudo demonstram diferença estatisticamente significativa entre a clorexidina a 2% (controle positivo) e os demais grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores de média e desvio-padrão para os halos de inibição de crescimento do *E. faecalis* frente as soluções (em mm)

GRUPO	n	Média	Desvio Padrão
Clorexidina 2%	19	6,631	0,597
Propilenglicol	19	0,000	0,000
Própolis 5%	19	0,000	0,000
Própolis 10%	19	0,000	0,000

Análise de Variância -1 via e Teste de Tukey – Nível de significância 5% ($p < 0,001$).

O grupo da clorexidina mostrou halos de inibição de crescimento bacteriano com média de 6,631 mm, enquanto o própolis a 5 e 10% e o propilenoglicol (controle negativo) não apresentaram halos ($P < 0,001$).

DISCUSSÃO

Em Endodontia, no tratamento de dentes com canais infectados, a preocupação em diminuir a população de microrganismos, promovendo a sanificação do sistema de canais radiculares, é motivo de inquietantes pesquisas no campo da microbiologia endodôntica.

O hipoclorito de sódio e a clorexidina, durante o preparo biomecânico, a pasta de hidróxido de cálcio em suas diferentes veiculações, como curativo de demora, são exemplos de substâncias que venceram a barreira do tempo e são empregadas com o intuito de combater as infecções endodônticas. Cada uma delas tem a sua devida importância. Entretanto, a busca por uma substância ideal, na qual se consiga uma maior efetividade sobre os microrganismos

endodontopáticos e ao mesmo tempo apresente biocompatibilidade e não citotoxicidade norteiam as pesquisas da comunidade científica.

A escolha do *E. faecalis* se justifica em função de ser um microrganismo que compõe a microbiota endodôntica, principalmente relacionado aos casos de insucessos endodônticos, onde lesões refratárias ao tratamento não reparam através da terapia endodôntica convencional. Esse microrganismo Gram-positivo e anaeróbio facultativo tem demonstrado tolerar níveis de pH elevados (acima de 12), suportando o mecanismo de ação do hidróxido de cálcio até mesmo quando em contato direto^{12,25,26,27}.

O teste de difusão em meio sólido é uma técnica consagrada para avaliar a atividade antibacteriana de uma determinada substância. Entretanto, há de se considerar as limitações que o mesmo apresenta. Entre elas, pode-se citar a sua incapacidade de fornecer condições de igualdade para se comparar substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas²⁸. Além disso, a presença de enzimas bacterianas, a composição do meio, a densidade do inóculo, o tempo de incubação, a temperatura e a estabilidade do medicamento são fatores que influenciam resultados conflitantes.

Considerando que o teste de disco-difusão em ágar é mais eficiente para as substâncias solúveis em água, nesse estudo, empregou-se o extrato seco de própolis suspenso em propilenoglicol. Sendo assim, é possível fazer-se a ilação de que sendo o propilenoglicol hidrossolúvel, a utilização do teste de disco-difusão em ágar possa estar justificada.

Um aspecto que merece atenção é a presença de estudos que veiculam o própolis em substâncias como o etanol a 70 ou 80%^{6,8}, clorexidina a 0,06 e 0,12%⁷. A opção pelo propilenoglicol se justificou pelo interesse em estudar apenas a ação do própolis frente ao *E. faecalis*, evitando qualquer tipo de alteração na atividade deste.

Os resultados obtidos para o extrato seco de própolis 5% e 10 % com ausência de halos de inibição, mostraram a falta de ação destes sobre o *E. faecalis*. Esse fato permite questionarmos o emprego destas substâncias nas situações clínicas onde ocorre a viabilidade desse microrganismo. Por outro lado, estudos de Awawdeh et al.⁹ e Kandaswami et al.¹⁰ demonstraram resultados de boa eficácia antimicrobiana para o própolis. Entretanto, os estudos citados foram realizados, ex vivo, em dentina infectada com *E. faecalis*, não podendo ser confrontados com esse trabalho devido as diferenças metodológicas.

Os resultados do presente estudo também diferem dos resultados obtidos por Koo et al.⁶ e Maia Filho et al.⁸ onde estes autores encontraram atividade antimicrobiana para o extrato de própolis frente ao *E. faecalis*. Um das explicações para essas diferenças podem estar

relacionadas ao veículo. A maioria dos estudos emprega extrato hidroalcolico, enquanto o presente estudo optou pelo emprego do propilenoglicol, substância desprovida de qualquer atividade antibacteriana.

Entretanto, a não produção de halos de inibição nem sempre podem significar que as substâncias não apresentam atividade antibacteriana, pois elas podem não apresentar boa difusão em ágar. Isso pode ocorrer devido ao fato dos meios de cultura apresentarem substâncias tamponadoras. Assim, mesmo que sofram difusão, essa pode ser lenta devido a baixa solubilidade da substância, o que faz com que os níveis de pH alcançados pelo meio não sejam elevados o suficiente para apresentar atividade antimicrobiana²⁹.

Esse foi o primeiro estudo que empregou o própolis suspensa em propilenoglicol, sendo necessário compreender melhor o comportamento dessa substância nesse veículo. O própolis é uma substância não solúvel em água, fato esse que explica a confecção de uma suspensão através do processo de levigação, onde se colocou o própolis em um gral e aos poucos foi adicionado o propilenoglicol, levigando o própolis nesse veículo e gerando uma suspensão facilmente dispersível. Para avaliar a veracidade dos resultados torna-se importante o emprego de outras metodologias, como os testes que apresentam meio de cultura líquido, pois eles oferecem maiores condições de igualdade para substâncias que possam apresentar dificuldades de dissociação e difusão em ágar.

Outro ponto que deve ser ressaltado é a diversidade dos componentes presentes em cada amostra de própolis. Alguns estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies de determinadas plantas e regiões. Pelo menos 200 componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origens diversas, entre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonóides, terpenos, esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftalina³⁰. A atividade antimicrobiana possui maior ou menor efeito mediante os componentes químicos, o gênero da abelha coletora e os meios de preparo do própolis³¹. Essa constatação pode explicar a discrepância de resultados entre estudos de semelhante metodologia.

CONCLUSÃO

Baseado na metodologia empregada e nos resultados obtidos neste estudo *in vitro*, pode-se concluir que o extrato de própolis suspenso em propilenoglicol nas concentrações de 5% e 10% não evidenciou atividade antimicrobiana frente ao *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

1. Time RVE. Análise histológica comparativa entre o extrato de própolis verde, óleo-resina da copaíba e a pasta Guedes-Pinto no processor de reparação da polpa dental de ratos [Dissertação] 2007.
2. Arruda AO, Souza LG, Biz MT, Ramos IFAS, Figueiredo JAP, Mazzuoo C. Análise macroscópica e MEV da superfície do canal radicular após utilização do extrato de própolis a 0,25% como irrigante. JBE. 2004; 5(19): 280-87.
3. Bretz W, Chlegov RDJ, Cunhal MMC, Custodio A, Schneider, L.G. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. Z Naturforsch. 1998; 53(11I12): 1045-48.
4. Ghisalberti CL. Própolis: a review. Bee world. 1979; 60: 59-84.
5. Kosalec , Pepeljnjak S, Bakmaz M, Vladimir-Knezevic S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta Pharm. 2005; 55: 423-30.
6. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000; 45(2): 141-8.
7. Groisman S et al. Antibacterial effects of solutions of propolis, chlorhexidine and their combinations on saliva microorganisms. Caries Research. 2005; 39(4): 329.
8. Maia Filho EM, Maia CCR, Bastos ACSC, Novais TMG. Efeito Antimicrobiano *in vitro* de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre o *E. faecalis*. RGO. 2008; 56(1): 21-25.
9. Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *E. faecalis*: A laboratory study. Aust Endod J 2009; 35: 52–58.

10. 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.
11. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006; 39(4): 249-81.
12. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 234-39.
13. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dental tubules. *J Endod.* 1998; 24: 15-7.
14. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study basic on scientific evidences. *J Appl Oral Sci.* 2003; 11(4): 269-82.
15. Silveira AM, Vieira LHP, Siqueira Jr JF, Macedo SB, Consolaro A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz. Dent. J.* 2007; 18(4): 299-304.
16. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *End Dent Traumatol.* 1990; 6: 142-49.
17. Waltimo T. et al. Susceptibility of oral candida species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J.* 1999; 32: 96-101.
18. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5): 315-20.
19. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990; 16(10): 498-504.

20. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31(1): 1-7.
21. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod.* 2000; 26(10): 593.
22. Peciuliene V, Reynayd AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001; 34(6): 429-34.
23. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ Evaluation of root canal microorganisms isolate from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(2): 100-3.
24. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Aboim MC, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98(6):741-9.
25. Portenier I.; Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* - the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. *Endod Topics.* 2003; 135-139.
26. Figdor D. Sundqvist G. A big role for the very small - understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J.* 2007; p.538-551.
27. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J. Oxford.* 2001; 399-405.
28. Estrela C, Rodrigues de Araújo Estrela C, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod.* 2001 Dec;27(12):720-3.

29. Gomes BPFAG, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, 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; 102:544-50.
30. Marcucci, MC. Própolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 1995; 83-89.
31. Swerts MSO, Freitas E, Silva DS, Maldonato DV, Totti DA, Costa JM et al. Atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias bucais. *JBE.* 2002; 3: 256.