



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA**

JOCILENE CRISTINA EVANGELISTA BAGATELI

**EFICÁCIA *EX VIVO* DE UMA
MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE PRÓPOLIS
NA DESINFECÇÃO DE TÚBULOS DENTINÁRIOS
E NA CONTENÇÃO DE INFILTRAÇÃO MICROBIANA**

Orientadora: Mírian Marubayashi Hidalgo (DOD)

Coorientadora: Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (DAB)

**Maringá
2011**

JOCILENE CRISTINA EVANGELISTA BAGATELI

**EFICÁCIA *EX VIVO* DE UMA
MEDICAÇÃO INTRACANAL À BASE DE PRÓPOLIS
NA DESINFECÇÃO DE TÚBULOS DENTINÁRIOS
E NA CONTENÇÃO DE INFILTRAÇÃO MICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado.

Orientadora: Profa. Dra. Mírian Marubayashi Hidalgo

Coorientadora: Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

**Maringá
2011**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B144e	<p>Bagateli, Jocilene Critina Evangelista Eficácia ex vivo de uma medicação intracanal à base de própolis na desinfecção de túbulos dentinários e na contenção de infiltração microbiana / Jocilene Cristina Evangelista Bagateli. -- Maringá, 2011. 52 f. : il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientador : Prof.^a Dr.^a Mirian Marubayashi Hidalgo. Co-Orientador : Prof.^a Dr.^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski. Dissertação (mestrado em Odontologia Integrada) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2011.</p> <p>1. Endodontia - Canal radicular - Tratamento - Própolis. 2. Tratamento de canal - Própolis - Avaliação. 3. Própolis - Tratamento de canal - Desinfecção de túbulos. 4. Própolis - Tratamento de canal - Infiltração microbiana. I. Hidalgo, Mirian Marubayashi, orient. II. Svidzinski, Terezinha Inez Estivalet, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada. IV. Título.</p>
-------	---

CDD 21.ed. 617.6342

Jocilene Cristina Evangelista Bagateli

27 de abril de 1986	Nascimento – Maringá – PR
Filiação	José Romildo Bagateli Lídia Aparecida Evangelista Bagateli
2004 - 2008	Curso de Graduação em Odontologia, na Universidade Estadual de Maringá, PR
2009 - 2011	Curso de Mestrado em Odontologia Integrada, no Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, PR
Agosto de 2010	Prefeitura de Caarapó – MS, atuando como Odontóloga da Estratégia de Saúde da Família

***Dedico este trabalho
aos meus pais, José e Lídia;
aos meus irmãos, Joceline e Leonardo;
e ao meu namorado, Márcio.***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, que me deu vida, sabedoria, discernimento e equilíbrio, para seguir em busca de meus ideais. Que me agraciou com maravilhosas oportunidades e colocou pessoas admiráveis em meu caminho, com as quais eu muito aprendi e que se tornaram essenciais para a conclusão desta etapa da minha formação.

Aos meus pais, **José e Lídia**, por me apoiarem incondicionalmente, pelo incentivo e afeto que tornaram mais fácil e agradável minha caminhada.

Aos meus irmãos, **Joceline e Leonardo**, pelo companheirismo e carinho.

Ao meu namorado, **Márcio**, pelo amor, paciência e compreensão. Por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre contribuindo para a realização do meu trabalho, oferecendo desde uma simples companhia a até auxílio nas etapas laboratoriais.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Mírian Marubayashi Hidalgo**, pelos ensinamentos, incentivo e apoio. Por sua ética e perfeição em tudo que se propõe a realizar. Pelas oportunidades, confiança e compreensão em todos momentos. Agradeço pela maravilhosa orientação, simplesmente insuperável, pelo exemplo de pessoa e profissional e, sobretudo, pela amizade.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**, pela imensurável ajuda, por todos os ensinamentos, por ceder gentilmente seu tempo e permitir nossa permanência em seu laboratório, sempre nos apoiando e nos inspirando com sua maneira afetuosa.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lourdes Botelho Garcia e ao Prof. Dr. Fausto Rodrigo Victorino, pela leitura criteriosa e por todas as sugestões no exame de qualificação. Ao Fausto, ainda, agradeço toda a ajuda durante a realização do trabalho e pela disponibilidade sempre que foi necessário.

Às Profas. Dras. Flaviana Bombarda de Andrade Ferreira e Maria Cristina Bronharo Tognim, por participarem da banca de defesa, enriquecendo imensamente este trabalho.

À Profa. Dra. Selma Lucy Franco, pela disponibilidade da própolis e por todos os ensinamentos.

Às alunas de iniciação científica, hoje grandes amigas, Cristiane e Christine, por tornarem possível parte deste trabalho, pela dedicação e amizade.

Aos colegas da Pós-Graduação, especialmente Juliana e Thaís, pela amizade, cumplicidade e por estarem ao meu lado em cada conquista e nos momentos de dificuldade.

Ao colega André Zuchinni, que cedeu gentilmente o instrumental necessário para a execução da pesquisa.

Aos pacientes, que gentilmente doaram seus dentes extraídos, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação e do Curso de Odontologia, pelos valiosos ensinamentos e por contribuírem efetivamente para a minha formação profissional.

Aos funcionários do DOD e COD, pelo auxílio durante todos esses anos, especialmente à secretária Sônia, por atender prontamente minhas necessidades.

Às professoras, pós-graduandas e funcionários do Laboratório de Micologia Médica, por ajudarem gentilmente em cada momento de dificuldade.

Ao Prof. Dr. Emílio Augusto Coelho Barros, pela análise estatística e orientação nos dados.

Agradeço sinceramente a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Júlio Santiago Prates Filho;

À Pró-reitoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do Pró-reitor, Prof. Dr. Mauro Antônio da Silva Sá Ravagnani;

Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa da Chefe, Profa. Dra. Mírian Marubayashi Hidalgo;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, na pessoa do Coordenador, Prof. Dr. Adilson Luiz Ramos;

À CAPES, pelo apoio pecuniário.

*“Mestre não é aquele que tudo ensina, mas aquele
que de repente, aprende”*

Guimarães Rosa

RESUMO

Introdução: A própolis, substância natural produzida pelas abelhas, tem demonstrado atuação contra micro-organismos presentes nas alterações pulpares e periapicais. O objetivo deste estudo foi avaliar *ex vivo* a eficácia de uma pasta à base de própolis na desinfecção de túbulos dentinários e na contenção da infiltração microbiana através dos canais radiculares. **Metodologias:** Tubos de dentina bovinos (n=36) esterilizados foram infectados com *Enterococcus faecalis* e tratados com própolis, Calen[®] ou soro fisiológico, separadamente, durante sete e 15 dias. Findo o período, amostras foram coletadas, mantidas em BHI por 24h e lidas por espectrofotometria. Dentes humanos extraídos (n=54) preenchidos com própolis ou Calen[®], ou não tratados, foram fixados em dispositivos que permitiram o contato da porção apical da raiz com BHI e, separadamente, do terço cervical com *Candida albicans*, *E. faecalis* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Todos eles foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C, durante 60 dias. Diariamente, verificou-se a ocorrência de turvação do caldo. **Resultados:** O tratamento própolis foi equivalente ao Calen[®] na avaliação da desinfecção dos túbulos dentinários e ambos diferiram significativamente ($p < 0,05$) do soro. Dos dentes tratados com própolis, 33% sofreram infiltração microbiana, enquanto o percentual foi de 61% para Calen[®] e 100% para os espécimes sem tratamento. A própolis impediu a infiltração de *C. albicans*, enquanto *E. faecalis* ou *P. aeruginosa* infiltraram entre o 6^o-30^o dia. Os três micro-organismos infiltraram entre o 1^o-25^o dias com Calen[®] e entre 1^o-15^o dias nos dentes mantidos sem medicação. **Conclusões:** Os resultados sugerem que a pasta à base de própolis é eficaz na desinfecção de túbulos dentinários e na contenção de infiltração microbiana, podendo ser recomendada como futura medicação intracanal na endodontia.

Palavras-chave: própolis, endodontia, tratamento do canal radicular.

ABSTRACT

Introduction: Propolis, a bees natural product, had demonstrated effect against microorganisms associated with apical and periapical lesions. The aim of this study was to evaluate the *ex vivo* ability of a propolis-based paste in disinfecting dentinal tubules and avoiding the microbial leakage through root canals. **Methods:** Sterile bovine dentinal tubes (n=36) were infected by *Enterococcus faecalis*, and treated separately with propolis, Calen[®] or saline for 7 and 15 days. After these times, samples were collected, maintained in BHI for 24h, and read by spectrophotometry. Human extracted teeth (n=54) dressed with propolis or Calen[®], or untreated, were fixed in apparatus which kept the root apical third in contact with BHI and, separately, the cervical third with *Candida albicans*, *E. faecalis* or *Pseudomonas aeruginosa*. They were all incubated at 37°C for 60 days. Daily, it was verified the occurrence of broth turbidity. **Results:** The propolis treatment was similar to Calen[®] in the tubules disinfection evaluation, and both significantly differed ($p<0.05$) from saline. From propolis treated teeth, 33% of them leakage, while to Calen[®] and untreated specimens, this occurrence was respectively 61% and 100%. Propolis avoided *C. albicans* leakage, while *E. faecalis* or *P. aeruginosa* leakage between 6th-30th days. The 3 microorganisms leakage between 1st-25th days with Calen[®] and 1st-15th days when there was no medication. **Conclusions:** The results suggest that propolis-based paste is able to disinfect dentinal tubules and to avoid the microbial leakage, being possibly recommended as a future intracanal dressing in Endodontics.

Key-words: propolis, endodontics, root canal therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metodologia para avaliação da desinfecção dos túbulos dentinários.....	24
Figura 2	Metodologia para avaliação da infiltração microbiana.....	26
Figura 3	Média das densidades ópticas dos espécimes após 24h de incubação.....	28
Figura 4	Infiltração microbiana através dos canais tratados com as diferentes medicações, durante 60 dias.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de espécimes que sofreram infiltração microbiana através do canal radicular, ao longo de 60 dias, após tratamento com as diferentes medicações.....	29
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATCC *American Type Culture Collection*

BHI *Brain Heart Infusion*

DO Densidade Óptica

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

h Hora

INPI Instituto Nacional de Propriedade Industrial

K Tipo Kerr

mL Mililitro

mm Milímetro

N Distribuição normal

n Tamanho da amostra

n° Número

nm Nanômetro

p Nível de significância estatística

pH Pressão Hidrogeniônica

UFC Unidade Formadora de Colônia

#	Número
%	Porcentagem
*	Diferença estatisticamente significativa
<	Menor
®	Marca registrada de produto ou de empresa
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	17
2	ARTIGO	21
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
	ANEXO A – Normas para a publicação de artigos no Journal of Endodontics (JOE).....	41
	ANEXO B – Parecer do Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEM.....	45
	APÊNDICE A – Densidade óptica e contagem das unidades formadoras de colônia dos espécimes tratados com própolis, Calen [®] e soro fisiológico, durante 7 e 15 dias.....	46
	APÊNDICE B – Descrição da variável DO em relação à medicação, ao tempo de tratamento e à profundidade de dentina coletada.....	48
	APÊNDICE C – Significância dos parâmetros do Modelo Linear de Efeitos Mistos.....	49
	APÊNDICE D – Pós-teste de Contraste utilizado para comparar as covariáveis significativas, conforme a diferença evidenciada pelo Modelo Linear de Efeitos Mistos.....	50
	APÊNDICE E – Valores das repetições e médias dos brancos obtidos para cada medicação intracanal testada, nos respectivos tempos de tratamento.....	51
	APÊNDICE F – Momento de contaminação (turvação) dos espécimes tratados com própolis, Calen [®] ou soro fisiológico durante os períodos de 7 e 15 dias, após incubação a 37°C por até 96h.....	52

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo especializado, confinado entre paredes de dentina por ela produzida, capaz de relacionar-se com os tecidos periodontais através de forames e canais laterais (ESTRELA, 2004) que, por conseguinte, sofrem também as consequências de uma alteração patológica nela instalada (LEONARDO, 2005). Dentre os fatores mais comumente relacionados à agressão pulpar estão os micro-organismos associados à cárie dentária (LOPES; SIQUEIRA JR, 2004) que, em uma infecção endodôntica persistente, se propagam ao longo de todo o sistema de canais radiculares, inclusive em ramificações, istmos, deltas apicais e túbulos dentinários (BARBOSA *et al.*, 1997).

Diversas espécies de micro-organismos têm sido identificadas nos dentes com alterações pulpares e periapicais, podendo-se citar *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (MOLANDER *et al.*, 1998), além dos fungos do gênero *Candida*, principalmente *Candida albicans* (BAUMGARTNER *et al.*, 2000). Estabelecida a infecção pulpar, uma reação inflamatória de intensidade variável dos tecidos adjacentes ao dente pode ser observada (SIQUEIRA JR *et al.*, 2001).

Ao tratamento endodôntico cabe eliminar a fonte de irritantes, situada no interior do sistema de canais radiculares (GOMES *et al.*, 2003), e obliterá-lo em toda extensão tri-dimensional. Se o canal radicular é tratado convenientemente, a lesão perirradicular, quando existente, regride (LOPES; SIQUEIRA JR, 2004). Embora o preparo biomecânico, aliado à irrigação com soluções antimicrobianas auxiliares, seja a fase da terapia endodôntica responsável pela eliminação ou redução dos micro-organismos, após sua realização os mesmos podem permanecer viáveis e se multiplicarem (BARBOSA *et al.*, 1997; COHEN; HARGREAVES, 2007). Há relatos de que aproximadamente 50% dos canais radiculares permanecem infectados após o preparo biomecânico (BYSTROM; SUNDQVIST, 1981; SJOGREN *et al.*, 1991). Isso pode ser resultado da complexidade e diversidade anatômica dos canais radiculares, onde os micro-organismos se alojam e permanecem inacessíveis aos instrumentos e soluções irrigadoras (SJOGREN *et al.*, 1991; SUNDQVIST *et al.*, 1998; JUNG *et al.*, 2005; KANDASWAMY *et al.*, 2010). Torna-se, portanto, essencial a utilização de uma medicação intracanal ou curativo de demora como coadjuvante na terapia (BYSTROM; SUNDQVIST, 1981; SJOGREN *et al.*, 1991; BARBOSA *et*

al., 1997), a fim de otimizar a desinfecção já obtida, favorecendo, conseqüentemente, o reparo tecidual (SIQUEIRA JR; UZEDA, 1997). Para isso, é imprescindível que a mesma exerça efeito antimicrobiano (LEONARDO, 2005).

Pelo fato de permanecer no interior do canal radicular, o medicamento tem maiores possibilidades de atuar em áreas não afetadas pela instrumentação e pela substância auxiliar. Faz-se necessário que tal medicação possua uma viscosidade que permita seu contato com todas as áreas do canal radicular (FERRAZ *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2001) e atue como barreira física e química contra a infecção ou reinfecção por micro-organismos da saliva (LOPES; SIQUEIRA JR, 2004). Finalmente, é papel da medicação, reduzir a inflamação perirradicular, com o conseqüente alívio da dor, se existente (CHONG; FORD, 1992; LEONARDO; LEONARDO, 2009).

A partir dos anos 80, as verificações das excelentes propriedades biológicas e antimicrobianas do hidróxido de cálcio tornaram-no o produto de escolha para curativos de demora em canais radiculares infectados (BYSTROM *et al.*, 1985; SJÖGREN *et al.*, 1991). Trata-se de uma base, cujas propriedades derivam de sua dissociação em íons cálcio e hidroxila que agem sobre tecidos, estimulando reparo por induzir a mineralização, e, sobre micro-organismos, eliminando-os por meio da inativação enzimática das células decorrente da alcalinização do meio, dentre outros mecanismos (LOPES; SIQUEIRA JR, 2004). Entretanto, tal medicação parece incapaz de desinfetar túbulos dentinários contaminados com *E. faecalis* (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; GOMES *et al.*, 2003), pelo menos mediante uma única aplicação, pois os íons hidroxila requerem tempo para se difundirem através da dentina em níveis suficientes para promoverem o efeito letal (BARBOSA *et al.*, 1997; LOPES; SIQUEIRA JR, 2004). Aliada a esse fato está a capacidade de tais micro-organismos de sobreviverem em meios que apresentam maiores valores de pH (BYSTROM *et al.*, 1985).

Esses achados antecipam a necessidade de se desenvolverem novas alternativas para melhorar a erradicação da microbiota resistente ao tratamento endodôntico. Uma tendência mundial está voltada para as substâncias naturais, sendo a terapia com produtos da abelha alvo de grande interesse, em virtude de seus comprovados efeitos benéficos (DOBROWOLSKI *et al.*, 1991).

Dentre esses produtos destaca-se a própolis, uma resina balsâmica usada para isolamento térmico, vedação e proteção da colméia contra micro-organismos invasores (DOBROWOLSKI *et al.*, 1991; BURDOCK, 1998; FRANCO; BUENO, 1999). Dentre os componentes ativos podem ser citados os flavonóides, os ácidos fenólicos e seus ésteres, mas o valor farmacológico do produto é atribuído à mistura de componentes naturais que ele representa, e não a alguma substância individualmente (KUJUMGIEV *et al.*, 1999). Amplamente utilizada na medicina popular, de forma empírica, a própolis tem seus efeitos antibacteriano (GRANGE; DAVEY, 1990; KUJUMGIEV *et al.*, 1999; AWAWDEH *et al.*, 2009; VICTORINO *et al.*, 2009), antifúngico (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; LONGHINI *et al.*, 2007), cicatrizante (CARVALHO *et al.*, 1991), anti-inflamatório (DOBROWOLSKI *et al.*, 1991; VICTORINO *et al.*, 2007) e imunomodulador (DIMOV *et al.*, 1992) comprovados em diversas pesquisas.

Entretanto, alguns estudos têm associado própolis à endodontia avaliando seu desempenho como medicação intracanal (ONCAG *et al.*, 2006; AWAWDEH *et al.*, 2009; VICTORINO *et al.*, 2009; 2010; KANDASWAMY *et al.*, 2010). Há relato da eficácia de extratos de própolis utilizados no capeamento pulpar direto, retardando a resposta inflamatória e contribuindo para a formação de uma barreira dentinária parcial, o que sugere a capacidade de indução de reparo proporcionada por esse produto (SABIR, *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* têm comprovado a ação de formulações de própolis contra micro-organismos resistentes, presentes nas alterações pulpares e periapicais persistentes, inclusive *E. faecalis* (ONCAG *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2007; VICTORINO *et al.*, 2007; AWAWDEH *et al.*, 2009) em tratamentos de até sete dias (LEE *et al.*, 2008). Apesar das propriedades descritas, há uma dificuldade no manuseio da própolis no interior do canal radicular, pois o extrato bruto apresenta-se resinoso (VICTORINO *et al.*, 2007). Isso ressalta a importância do desenvolvimento de formulações em pasta à base de própolis que facilitem seu emprego na endodontia. Ensaios biológicos iniciais prévios com diferentes extratos brutos e formulações à base de própolis vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa multidisciplinar da Universidade Estadual de Maringá (UEM), que envolve professores e alunos dos Departamentos de Odontologia, Análises Clínicas e Biomedicina, Farmacologia e Terapêutica, e Farmácia. Os resultados favoráveis alcançados (VICTORINO *et al.*, 2007, 2009,

2010; CASAROTO *et al.*, 2010), além de demonstrarem a viabilidade da utilização da própolis no tratamento endodôntico, como curativo de demora, apontam para a necessidade de outros testes de biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e propriedades físicas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, antes da sua possível recomendação para uso clínico, em humanos.

Todas as vantagens e propriedades atribuídas à própolis colocam-na como um produto extremamente promissor no arsenal de possíveis medicações intracanal e os novos estudos assumem um papel de grande relevância na construção de uma prática endodôntica cada vez mais segura e de qualidade.

2 ARTIGO

Eficácia *ex vivo* de uma medicação intracanal à base de própolis na desinfecção de túbulos dentinários e na contenção de infiltração microbiana

*Jocilene Cristina Evangelista Bagateli**, *Cristiane Yuri Kohiyama Schutz**, *Christine Men Martins**, *Terezinha Inez Estivalet Svidzinski[#]*, *Fausto Rodrigo Victorino^{##}*, *Selma Lucy Franco[†]*, *Ronald Ordinola Zapata***, *Mírian Marubayashi Hidalgo**

O sucesso do tratamento endodôntico está associado à eliminação ou redução dos micro-organismos situados no interior do sistema de canais radiculares (1,2) e ao reparo da região periapical por eles afetada (3). Embora o preparo biomecânico concomitante ao uso de soluções antimicrobianas atue nesse sentido, 50% dos canais radiculares permanecem infectados após a sua realização (4,5), provavelmente em função da complexidade e diversidade anatômica existente (5-7). Assim, a utilização de uma medicação intracanal ou curativo de demora como coadjuvante na terapia pode ser benéfica (4,5).

O hidróxido de cálcio tem sido rotineiramente utilizado com essa finalidade (2,8). No entanto, novas alternativas devem ser buscadas, em especial quando se considera a tendência mundial voltada para as substâncias naturais (9), diante da qual a terapia com produtos da abelha, como a própolis, tem sido alvo de grande interesse, em virtude de seus comprovados efeitos benéficos (10).

A própolis é uma substância de complexa composição química (11), amplamente utilizada na medicina popular de forma empírica. Porém, diversas pesquisas têm comprovado seus efeitos antibacteriano (12-15), antifúngico (13,16), cicatrizante (17), anti-inflamatório (10,18) e imunomodulador (19). Alguns estudos têm associado própolis à endodontia, avaliando seu desempenho como medicação intracanal (7,14,15,20). Tal qual o hidróxido de cálcio, ela possui um potencial antimicrobiano contra micro-organismos presentes nas alterações pulpares e periapicais que permite sua utilização como curativo de demora (21). Atua inclusive contra *Enterococcus faecalis*, geralmente encontrados quando há resistência à terapia convencional (14,18,20-22). Quando utilizada no capeamento pulpar direto, a própolis retardou a resposta inflamatória e contribuiu para a formação de uma

Dos Departamentos de *Odontologia, [#]Análises Clínicas e Biomedicina e [†]Farmácia, da Universidade Estadual de Maringá, Maringá; **Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru; ^{##}Odontologia, do Centro Universitário de Maringá, Maringá, Brasil.

barreira dentinária parcial, sugerindo apresentar capacidade de indução de reparo (23). Quando utilizada em cultura de células do ligamento periodontal, foi capaz de mantê-las viáveis (24,25).

Apesar das propriedades descritas, há uma dificuldade no manuseio da própolis no interior do canal radicular, pois o extrato bruto apresenta-se resinoso (18). Isso ressalta a importância do desenvolvimento de formulações que facilitem seu emprego na endodontia. Ensaio biológicos iniciais prévios, com diferentes extratos brutos e formulações à base de própolis, vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa multidisciplinar da Universidade Estadual de Maringá (UEM), que envolve professores e alunos dos Departamentos de Odontologia, Análises Clínicas e Biomedicina, Farmacologia e Terapêutica, e Farmácia, alcançando resultados favoráveis (15,18,26,27).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar, *ex vivo*, a eficácia de uma medicação intracanal na forma de pasta à base de própolis na desinfecção de túbulos dentinários bovinos e na contenção de infiltração microbiana através dos canais radiculares de dentes humanos extraídos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pasta à base de própolis

A pasta à base de própolis foi desenvolvida a partir de um extrato estabelecido em estudos anteriores (11,15,18), preparada e gentilmente cedida pelo Laboratório de Farmacotécnica da UEM. Possui depósito de patente em nome de HIDALGO, FRANCO, BERSANIAMADO e VICTORINO no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), nº PI 0506243-8, de 25 de abril de 2006.

Avaliação *ex vivo* da desinfecção de túbulos dentinários bovinos

Foram utilizados 36 dentes bovinos unirradiculados extraídos, obtidos por doação de um frigorífico regulamentado e certificado, para realização da metodologia proposta por HAAPASALO; ORSTAVIK (28) com algumas

modificações. Resumidamente, os dentes foram mantidos em hipoclorito de sódio 1% por 7 dias para desinfecção e preparados como tubos de dentina, conforme ilustração na Figura 1A e B. A *smear-layer* foi removida, os tubos permaneceram estocados em água e foram autoclavados para, em seguida, cada espécime ser inserido em um micro-tubo, tipo Eppendorf[®], contendo 1,0mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI – Himedia[®], Mumbai, Índia) esterilizado. Foi feito teste de esterilização e os conjuntos foram submetidos a um banho ultrassônico diário, durante 7 dias, para que o meio de cultura atingisse a máxima penetração nos túbulos dentinários. Em câmara de fluxo laminar, os espécimes foram secos internamente com pontas de papel esterilizadas e suas superfícies externas foram impermeabilizadas com esmalte de unha (Colorama[®], São Paulo, Brasil). Em seguida, os dentes foram fixados em uma de suas extremidades conforme apresentado na Figura 1C.

E. faecalis (ATCC 29212) com turvação compatível com o tubo 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foram depositados diariamente, durante 7 dias, no lúmen do canal de todos os espécimes, os quais permaneceram incubados em estufa. Findo o período de contaminação, a dentina da luz dos tubos, na profundidade de 200µm, foi coletada com brocas Gates-Glidden #4 (Quimidrol[®], Joinville, Brasil), semeada em 2,5mL de caldo BHI e incubada em estufa bacteriológica a 37°C, por 24h. A densidade óptica (DO) foi mensurada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530nm, para assegurar a ocorrência de infecção.

Os espécimes foram divididos em 3 grupos (n=12), conforme a medicação: 1 – pasta de própolis, 2 – pasta Calen[®] (SS White, Rio de Janeiro, Brasil), 3 – soro fisiológico, sendo os dois últimos considerados, respectivamente, controles padrão, à base de hidróxido de cálcio, e negativo. A extremidade exposta foi selada com cimento obturador provisório (Villevie[®], Joinville, Brasil) e os espécimes foram incubados durante os períodos previamente estabelecidos de 7 e 15 dias. Ao final de cada período, a medicação foi removida pela irrigação com soro fisiológico, o canal foi preenchido com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 17%, lavado novamente com soro fisiológico e seco com pontas de papel estéreis. A manipulação foi feita de maneira asséptica e raspas de dentina foram coletadas nas profundidades de 400µm e 600µm (Figura 1D), com o uso sucessivo de brocas Gates-Glidden (Quimidrol[®]) #5 (dentina superficial) e #6 (dentina profunda).

Amostras de cada profundidade foram cultivadas em caldo BHI e mantidas em estufa durante 24h. As amostras foram submetidas à espectrofotometria (530nm), conforme descrito por LEE e colaboradores (22). Como branco, foi utilizado caldo BHI estéril com raspas de dentina livres de micro-organismos contendo os respectivos medicamentos testados em cada grupo.

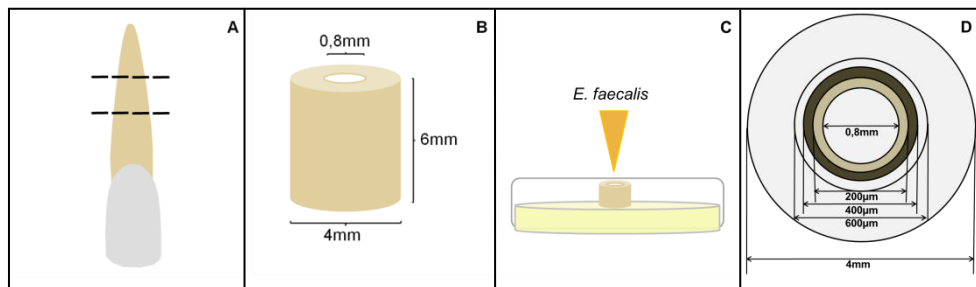


FIGURA 1. Metodologia para avaliação da desinfecção dos túbulos dentinários. **A:** Área de corte do dente bovino. **B:** Padronização do comprimento e diâmetros interno e externo dos espécimes. **C:** Fixação dos espécimes em placa de Petri contendo ágar-ágar para a inserção do inóculo e posterior tratamento com as medicações testadas. **D:** Representação do lúmen do canal, com as profundidades de dentina coletadas.

Avaliação *ex vivo* da infiltração microbiana através dos canais radiculares

O Projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEM, CAAE nº 0250.0.093.224-09.

Dentes humanos unirradiculados (54) que apresentaram aos exames visual e radiográfico, canal único, reto, com rizogênese completa e ausência de tratamento endodôntico prévio, com extrações devidamente indicadas e realizadas na Clínica Odontológica da UEM, foram utilizados para a realização da metodologia proposta por ESTRELA (29), com algumas modificações. Resumidamente, os dentes tiveram suas superfícies externas devidamente limpas e foram divididos em: Grupo 1 – pasta de própolis, Grupo 2 – pasta Calen[®] (SS White), Grupo 3 – sem medicação, sendo os dois últimos considerados, respectivamente, controles padrão, à base de hidróxido de cálcio, e negativo, livre de preparo endodôntico e, portanto, sem qualquer medicação intracanal. Nos grupos 1 e 2 foram realizados preparos endodônticos pela técnica escalonada com recuo programado até a lima #60K, lima memória #40K (SybronEndo[®], Glendora, EUA), irrigação com hipoclorito de sódio

1% e limpeza final com EDTA 17%. Todos os dentes tiveram suas coroas cortadas de modo que os remanescentes radiculares passassem a apresentar o mesmo comprimento (Figura 2A). As pastas à base de própolis e de hidróxido de cálcio foram inseridas e tomadas radiográficas foram realizadas para confirmar o preenchimento completo dos canais radiculares.

Para a análise microbiológica, os espécimes foram montados em dispositivos conforme apresentado na Figura 2B a D. Os espaços entre a superfície radicular e a parte externa do micro-tubo, assim como desse com a tampa de borracha, foram selados com resina epóxi (Araldite[®], Boituva, Brasil), éster cianoacrilato de etila (SuperBonder[®], 3M, Ribeirão Preto, Brasil) e esmalte para unhas (Colorama[®]), cada qual com o intervalo de 1h. Na superfície interna, entre a estrutura dentária e o micro-tubo, aplicou-se também o esmalte para unhas. O conjunto foi esterilizado em óxido de etileno. Nos frascos de vidro foram introduzidos 7mL de caldo BHI estéril e, para assegurar a eficácia da esterilização, os mesmos foram mantidos 24h em estufa. Decorrido esse período, em câmara de fluxo laminar, os conjuntos dente/micro-tubo/tampa de borracha foram acoplados aos frascos de vidro. As raízes ficaram cerca de 3mm imersas no meio de cultura e, finalmente, realizou-se o selamento entre a tampa de borracha e o frasco de vidro.

Procedeu-se a inoculação de *E. faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27883) e *Candida albicans* (ATCC 90028) em suspensão em soro fisiológico estéril, com turvação compatível com o tubo 0,5 de Mc Farland. A suspensão de cada micro-organismo foi adicionada ao BHI, correspondendo a 30% da mistura e, assim, 6 dentes de cada grupo receberam 500µL de cada inóculo no compartimento específico, formando 3 subgrupos de acordo com os micro-organismos testados (Figura 2D). Todos os conjuntos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C e, a cada 7 dias, metade do volume da suspensão de micro-organismos da câmara superior do micro-tubo foi renovada. A leitura foi realizada a cada 24h, durante 60 dias, avaliando-se a ocorrência de turvação no meio de cultura na parte do tubo correspondente ao ápice dentário. Se positivo, amostras foram recolhidas para confirmação morfológica e tintorial do micro-organismo, pela coloração de Gram.

A cada 7 dias, confirmação da pureza e da viabilidade dos micro-organismos localizados no compartimento superior dos dentes que não apresentaram turvação

foi realizada. Para controle de eventual contaminação externa ao inóculo, conjuntos idênticos, mas sem micro-organismos foram preparados e mantidos na mesma estufa durante todo o período experimental. Como controle adicional, foram confeccionados outros 6 dispositivos nos quais além do preenchimento do canal com própolis ou Calen[®] empregou-se um cimento obturador provisório (Villevie[®]) selando o terço cervical do remanescente radicular.

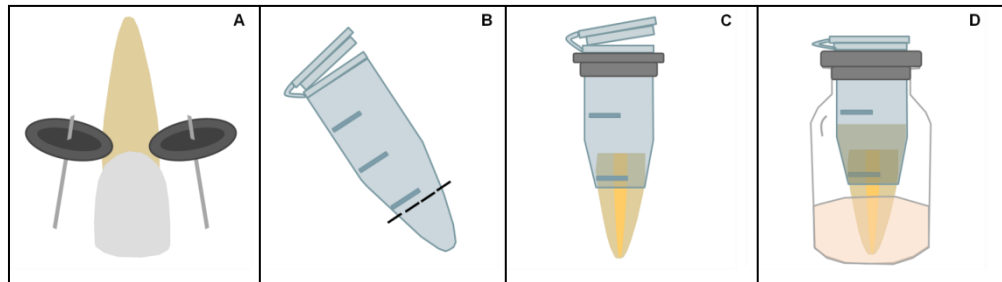


FIGURA 2. Metodologia para avaliação da infiltração microbiana. A: Corte das coroas dos dentes extraídos. **B:** Corte do micro-tubo. **C:** Início da montagem do dispositivo com micro-tubo, tampa de borracha perfurada e raiz já preenchida com a respectiva medicação intracanal. **D:** Montagem final do dispositivo, com o terço apical da raiz em contato com caldo BHI estéril. Dentro do micro-tubo, o terço cervical permanece completamente imerso no inóculo.

Análise dos resultados

Na avaliação da desinfecção dos túbulos dentinários, para verificar o efeito das covariáveis medicação, tempo de tratamento e profundidade de dentina coletada em relação à variável dependente densidade óptica (DO), foi utilizado o Modelo Linear de Efeitos Mistos (efeitos aleatórios e fixos). Essa escolha foi decorrência da suposição de homogeneidade de variâncias dentro da combinação Medicação X Tempo de tratamento X Profundidade não ter sido satisfeita (30). O modelo considerado na análise foi:

$$y_{ijkl} = \eta + \beta_i + \alpha_j + \gamma_k + \theta_{ij} + \delta_{ik} + \lambda_{jk} + \mu_{ijk} + w_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

em que: y_{ijkl} é a observação da variável DO na i -ésima medicação, no j -ésimo tempo de tratamento, na k -ésima profundidade, para a l -ésima medida; η é uma constante (um intercepto); w_{ijk} é um efeito aleatório que captura uma possível correlação entre as medidas do mesmo indivíduo; β_i é o efeito da i -ésima medicação (i = própolis,

Calen[®] ou soro); α_j é o efeito do j -ésimo tempo de tratamento ($j = 7$ ou 15 dias); γ_k é o efeito da k -ésima profundidade ($k = 400\mu\text{m}$ ou $600\mu\text{m}$); os parâmetros θ_{ij} , δ_{ik} , λ_{jk} e μ_{ijk} representam os efeitos de interação entre as covariáveis; ε_{ijkl} é o erro aleatório associado ao modelo, com distribuição $N(0, \sigma^2_{ijkl})$. Para essa análise foi utilizado o procedimento PROC MIXED do software SAS versão 9. Quando verificada a existência de diferença estatisticamente significativa entre as covariáveis, em nível de significância de 5%, procedeu-se o Teste de Contraste. O software utilizado foi o Statistica versão 7.0.

Na avaliação da infiltração microbiana, foi realizada análise qualitativa, observando-se a ocorrência de turvação do meio de cultura. Os resultados foram apresentados em porcentagem simples.

RESULTADOS

Avaliação *ex vivo* da desinfecção de túbulos dentinários bovinos

O uso da pasta à base de própolis proporcionou resultado semelhante ao Calen[®] e ambos foram significativamente mais eficientes que o soro fisiológico ($p < 5\%$) na desinfecção dos túbulos dentinários, independente da duração do tratamento e da profundidade de coleta (Figura 3A). Houve uma tendência de melhor desinfecção com o uso da própolis durante 7 dias e do Calen[®] aos 15 dias, quando considerada a ação das medicações em cada período de tratamento. A pasta de própolis apresentou uma tendência satisfatória em relação ao Calen[®] na porção menos profunda, o que pôde ser observado na coleta com o uso sucessivo das brocas #5 e #6. Mas, diferenças estatisticamente significantes não foram encontradas (Figura 3B e C). O soro fisiológico apresentou sempre a maior média de DO (Figura 3). Vale ressaltar que 8 espécimes apresentaram meio límpido decorridas as 24h de incubação, sendo 5 tratados com a formulação à base de própolis (APÊNDICE F).

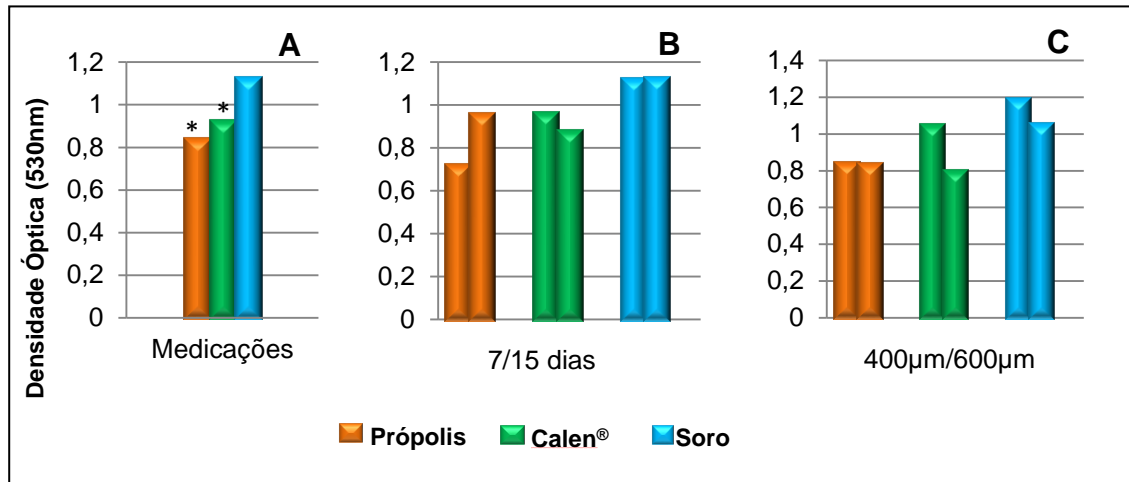


FIGURA 3. Média das densidades ópticas dos espécimes após 24h de incubação. **A:** Com as medicações avaliadas. **B:** Com as medicações mantidas durante 7 e 15 dias. **C:** Com as medicações nas profundidades de 400µm e 600µm, coletadas por brocas #5 e #6. Modelo Linear de Efeitos Mistos e Teste de Contraste. *Diferença estatisticamente significante ($p < 5\%$) em relação ao soro fisiológico.

Avaliação *ex vivo* da infiltração microbiana através dos canais radiculares

Os resultados gerais estão explicitados na Tabela 1, que sinaliza o momento de infiltração dos espécimes no decorrer dos 60 dias de acompanhamento. A infiltração nos dentes tratados com própolis ocorreu posteriormente (entre 6º e 10º dias) à dos espécimes dos grupos controles, com Calen® e sem medicação (ambos entre 1º e 5º dias). Esse grupo também apresentou a menor quantidade de dentes infiltrados no final do período experimental (33,33%), enquanto a medicação tradicionalmente utilizada (pasta Calen®) permitiu que os micro-organismos infiltrassem 61,11% dos espécimes. Todos os dentes utilizados como controle negativo, sem tratamento nem medicação, foram infiltrados.

Tabela 1. Quantidade de espécimes que sofreram infiltração microbiana através do canal radicular, ao longo de 60 dias, após tratamento com as diferentes medicações.

Tempo decorrido (dias)	Própolis (n = 18)			Calen [®] (n = 18)			Sem Medicação (n = 18)		
	C.a.	P.a.	E.f.	C.a.	P.a.	E.f.	C.a.	P.a.	E.f.
1 a 5				1	1		4	5	4
6 a 10		3	2	2	3		1	1	2
11 a 15				1			1		
16 a 20				1					
21 a 25				2					
26 a 30		1							
31 a 35									
36 a 40									
41 a 45									
46 a 50									
51 a 55									
56 a 60									
Total/m.o.	0	4	2	3	4	4	6	6	6
Total	33,33%			61,11%			100%		

C.a. = *Candida albicans*; P.a. = *Pseudomonas aeruginosa*; E.f. = *Enterococcus faecalis*.

Os resultados obtidos para cada micro-organismo avaliado estão representados na Figura 4. Na presença de *C. albicans* (Figura 4A), não houve infiltrações durante os 60 dias no grupo tratado com própolis. Metade dos espécimes tratados com Calen[®] foi infiltrada por esse fungo entre o 11^o e 25^o dia. O grupo sem medicação sofreu infiltração microbiana em todos os espécimes até o 15^o dia. Nos espécimes contaminados com *P. aeruginosa* (Figura 4B), o preenchimento dos canais com pasta à base de própolis permitiu infiltração a partir do 6^o dia até o 30^o para 4 dos 6 dentes analisados. Com o uso do Calen[®] ou mantidos sem medicação, as infiltrações se iniciaram entre o dia 1 e 5, estendendo-se até o dia 20 para 4 dentes e dia 10 para todos os dentes, respectivamente. Quando da contaminação

com *E. faecalis* (Figura 4C), 2 dentes sofreram infiltração entre o 6º e o 10º dia perante o tratamento com a pasta experimental. Os espécimes tratados com Calen® ou mantidos sem medicação foram infiltrados pelos micro-organismos entre o 1º e o 10º dia, respectivamente para 4 e 6 dentes.

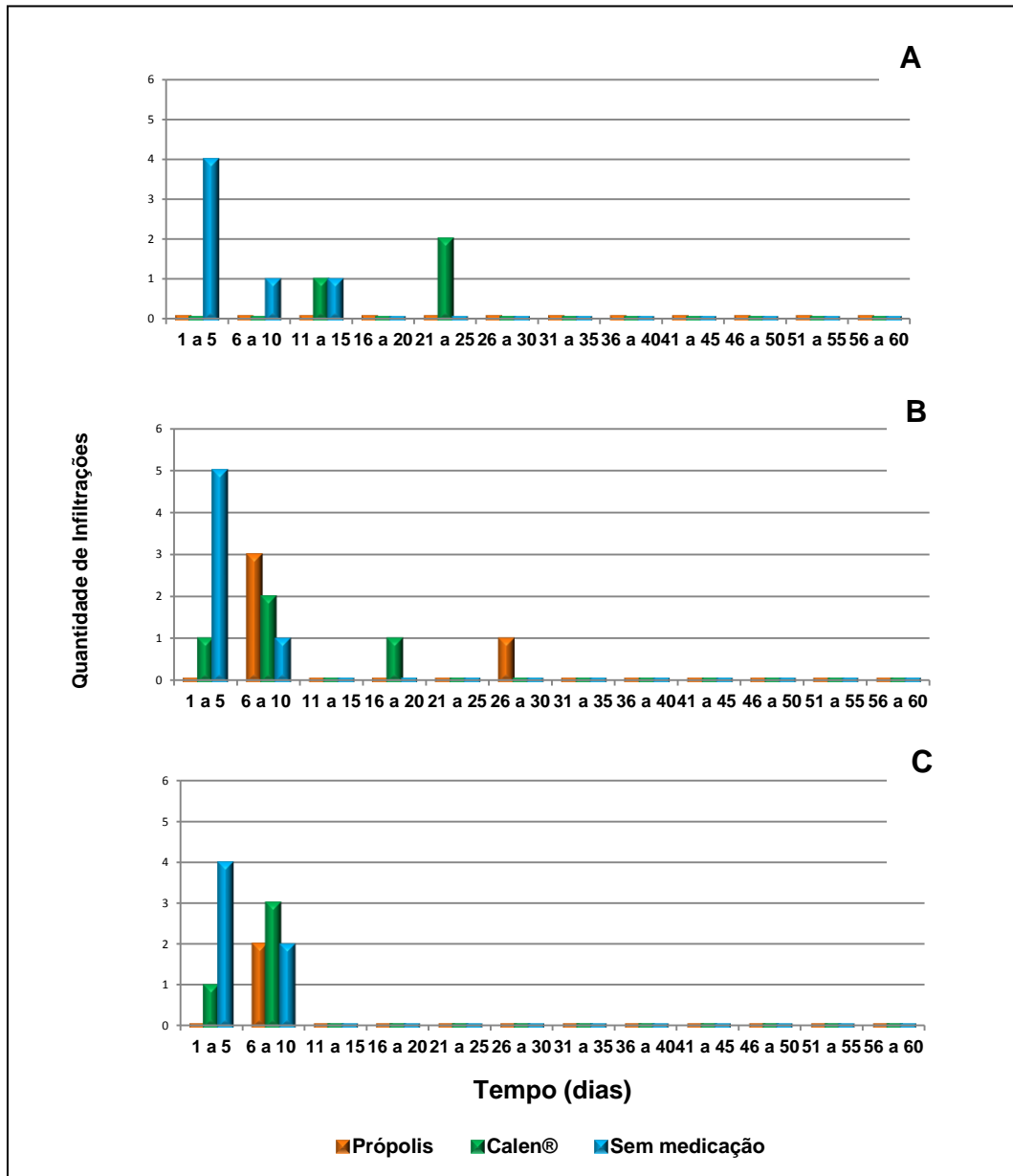


FIGURA 4. Infiltração microbiana através dos canais tratados com as diferentes medicações, durante 60 dias. A: *C. albicans*; B: *P. aeruginosa*; C: *E. faecalis*.

Na observação dos espécimes do controle adicional com medicações e emprego de um cimento obturador provisório, a infiltração ocorreu posteriormente que o respectivo grupo comparado, iniciando a partir do 16º dia. O dispositivo para

controle de eventual contaminação externa ao inóculo não apresentou turvação durante todo o período experimental. A confirmação de pureza e a viabilidade dos micro-organismos foram sempre positivas.

DISCUSSÃO

A medicação intracanal pode ser coadjuvante na terapia endodôntica (4,5,8) e este estudo foi o primeiro a avaliar a eficácia de uma formulação experimental à base de própolis, desenvolvida na forma de pasta, no que se refere à sua capacidade de desinfecção dos túbulos dentinários e contenção de infiltração microbiana através dos canais radiculares. Em ambas avaliações, a formulação testada mostrou-se tão eficiente quanto o produto habitualmente utilizado, pasta à base de hidróxido de cálcio, superando-a em algumas comparações.

Na verificação da desinfecção dos túbulos dentinários, por meio da DO obtida pode-se extrapolar a quantidade de micro-organismos presentes. Assim, quanto menor a DO apresentada, maior a atividade antimicrobiana do material avaliado. O grupo própolis analisado como um todo apresentou desempenho semelhante ao do Calen[®], comumente utilizado, e estatisticamente melhor que o soro fisiológico (Figura 3A), o que corrobora trabalhos como o de Kandaswamy e colaboradores (7). Quando se considerou o tempo de tratamento e a profundidade da desinfecção (Figura 3B e C), a própolis apresentou uma tendência a promover melhor desinfecção em tratamentos mais curtos, de 7 dias, e em menor profundidade de dentina, a 400µm. Awawdeh e colaboradores (14) também demonstraram efeito superior da própolis quando utilizada em tratamentos de 1 e 2 dias e Oncag e colaboradores (20) verificaram atividade equivalente entre própolis e hidróxido de cálcio em tratamentos de 2 dias e superior do produto natural aos 10 dias.

Estudo anterior evidenciou não ser necessário estender a contaminação microbiana além dos 7 dias e a oportunidade de se utilizar dentes bovinos devido à anatomia semelhante à dos humanos e pela elevada disponibilidade (28). Ainda, conforme preconizado por Gomes e colaboradores (1), utilizou-se um neutralizador após a remoção das medicações testadas, a fim de evitar uma ação antimicrobiana residual. O produto escolhido foi o EDTA 17% com o intuito de reproduzir a prática

clínica, mas, sem a posterior aplicação do hipoclorito de sódio, igualmente para que não interferisse nos resultados.

Os achados deste estudo antecipam a possibilidade do profissional possuir alternativa viável, favorável às suas necessidades clínicas, uma vez que o hidróxido de cálcio, embora atue em maiores profundidades de dentina, requer período mais longo para exercer efeito antimicrobiano satisfatório (5), em especial se usada a pasta Calen[®] comercialmente disponível, que emprega o polietilenoglicol como veículo, o que promove uma dissociação iônica lenta do produto (3).

A evidência da melhor atividade da pasta de própolis pode ser observada ainda pelo fato de 5 dos 8 espécimes apresentarem meios de cultura límpidos em 24h de incubação, demonstrando sua capacidade antimicrobiana a ponto de não se detectar crescimento.

No combate à infiltração de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*, a própolis demonstrou eficácia satisfatória, contendo a infecção por maior tempo e, quando essa ocorreu, foi em menor quantidade de espécimes (33,33%) em relação aos controles (Tabela 1). Estudo anterior, utilizando metodologia semelhante (31), descreve resultados similares aos aqui encontrados com o uso da medicação de rotina, colocando em evidência o melhor desempenho da pasta de própolis como antimicrobiano e como barreira física. O efeito do produto natural contra os micro-organismos supracitados é corroborado por diversos autores (13,18,32,33).

Quanto à ação contra cada um dos micro-organismos avaliados, mediante contaminação com *C. albicans* a própolis foi potencialmente eficaz, impedindo a infiltração em 100% da amostra, e atuou de modo mais satisfatório que Calen[®] com demais micro-organismos (Figura 4A, B e C), o que é semelhantemente descrito por outros autores (12,13). Pelo pior desempenho ter acontecido frente a *P. aeruginosa* e por ter atuado favoravelmente contra *E. faecalis*, pode-se inferir que a ação antimicrobiana da própolis não está relacionada com aumento de pH e que, uma vez mais, apresenta-se como alternativa clínica para casos de resistência e dificuldade com o uso da medicação tradicional.

A escolha do *E. faecalis* nessa metodologia e na avaliação da desinfecção dos túbulos dentinários se deu justamente em função dos relatos na literatura sobre

a atuação dessa bactéria nas dificuldades endodônticas, pela resistência apresentada (1,7,14,20-22,28) e por sua habilidade de alojar-se rapidamente no interior de túbulos dentinários (34).

A metodologia utilizada para verificação da infiltração microbiana tem sido utilizada poucas vezes para avaliar medicação intracanal. No entanto, por seu intermédio, pode ser comprovada a boa atuação da própolis para além do poder antimicrobiano: a ação como barreira física, o que torna este estudo ainda mais relevante. Uma restrição observada foi a variação no diâmetro dos forames apicais dos dentes utilizados, o que foi minimizado pela distribuição dos espécimes de modo equivalente em todos os grupos avaliados.

Os diversos estudos anteriores com extratos e formulações à base de própolis *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (7,10,12-14,16,19-21,23-25,32,33), corroborados pelos resultados já verificados com a pasta experimental (15,18,26,27) apontam para a biocompatibilidade e a viabilidade de seu uso clínico na prática endodôntica. Estudos *in vivo*, em humanos, devem ser agora desenvolvidos.

CONCLUSÃO

As condições experimentais permitiram concluir que a medicação intracanal na forma de pasta à base de própolis é eficaz na desinfecção de túbulos dentinários bovinos e na contenção de infiltração microbiana em canais radiculares de dentes humanos extraídos, podendo ser considerada uma alternativa viável para uso endodôntico. Avaliados em conjunto com os resultados já obtidos, seus efeitos descritos permitem a experimentação em humanos para prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J* 2003;36:267-275.
2. Leonardo MR, Leonardo RT. Endodontia: conceitos biológicos e recursos tecnológicos. São Paulo: Artes Médicas, 2009.
3. Lopes PL, Siqueira Jr JF. Endodontia. Biologia e técnica. Rio de Janeiro: Medsi; 2004.
4. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981;89:321-328.
5. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991;24:119-125.
6. Sundqvist G, Figdor D, Endo D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg* 1998;85:86-93.
7. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morindacitrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J* 2010;43:419-423.
8. Holland R, De Mello W, Nery MJ, Bernabe PF, De Souza V. Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1977;3:63-67.
9. Li JWH, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009;325:161-165.
10. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991;35:77-82.
11. Franco SL, Bueno JHF. Otimização de processo extrativo de própolis. *Infarma* 1999;11:48-51.
12. Grange JM, Davey RM. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med* 1990;83:159-160.
13. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999;64:235-240.

14. Awawdeh L, Beitawi MA, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. *Aust Endod J* 2009;35:52-58.
15. Victorino FR, Bramante CM, Watanabe E, Ito IY, Franco SL, Hidalgo MM. Antibacterial activity of propolis-based toothpastes for endodontic treatment. *Braz J Pharmac Sci* 2009;45:795-800.
16. Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev Bras Farmacog* 2007;17:388-395.
17. Carvalho PSP, Tagliavini DG, Tagliavini RL. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas – Estudo clínico e histológico em ratos. *Rev Ciênc Bioméd* 1991;12:39-50.
18. Victorino FR, Franco SL, Svidzinski TIE, Ávila Campos MJ, Hidalgo MM, Bersaniamado CA. Pharmacological evaluation of propolis solutions for endodontic use. *Pharm Biol* 2007;45:721-727.
19. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of water-soluble derivative. *Vaccine* 1992;10:817-823.
20. Oncag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Gen Dent* 2006;54:319-322.
21. Ferreira FBA, Torres SA, Rosa OPS, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BPFA. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod* 2007;104:709-716.
22. Lee Y, Han SH, Hong SH, Lee JK, Ji H, Kum KY. Antimicrobial efficacy of a polymeric chlorhexidine release device using *in vitro* model of *Enterococcus faecalis* dentinal tubule infection. *J Endod* 2008;34:855-858.
23. Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci* 2005;47:135-138.
24. 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;30:359-361.
25. Ozan F, Polat ZA, Er K, Ozan U, Değer O. Effect of propolis on survival of periodontal ligament cells: new storage media for avulsed teeth. *J Endod* 2007;33:570-573.

26. Victorino FR, Bramante CM, Zapata RO, Casarotto AR, Garcia RB, Moraes IG, Hidalgo MM. Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. *J Appl Oral Sci* 2010;18:621-624.
27. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RKN, Moreschi E, Victorino FR, Steffens VA, Bersani-Amado CA. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. *Dental Traumatol* 2010;26:323-331.
28. Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-1379.
29. Estrela C. *Metodologia científica*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005.
30. Schall R. Estimation in generalized linear models with random effects. *Biometrika* 1991;78:719-727.
31. Siqueira Jr JF, Lopes HP, Uzeda M. Recontamination of coronally unsealed root canals medicated with camphorated paramonochlorophenol or calcium hydroxide pastes after saliva challenge. *J Endod* 1998;24:11-14.
32. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural* 2004;34:159-163.
33. Sonmez AS, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yucel B, Yilmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *J Ethnopharmacol* 2005;102:371-376.
34. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:142-149.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AWAWDEH, L.; BEITAWI, M.A.; HAMMAD, M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. **Aust. Endod. J.**, n.35, p.52-58, 2009.
- BARBOSA, C.A.M.; GONÇALVES, R.B.; SIQUEIRA JR, J.F.; UZEDA, M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. **J. Endod.**, v.23, n.5, p.297-300, 1997.
- BAUMGARTNER, J.C.; WATTS, C.M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, v.26, n.12, p.695-698, 2000.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem. Toxicol.**, n.36, p.347-363, 1998.
- BYSTROM, A; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand. J. Dent. Res.**, v.89, n.4, p.321-328, 1981.
- BYSTROM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod. Dent. Traumatol.**, v.1, n.5, p.170-175, 1985.
- CARVALHO, P.S.P.; TAGLIAVINI, D.G.; TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas – Estudo clínico e histológico em ratos. **Rev. Ciênc. Bioméd.**, v.12, n.1, p.39-50, 1991.
- CASAROTO, A.R.; HIDALGO, M.M.; SELL, A.M.; FRANCO, S.L.; CUMAN, R.K.N.; MORESCHI, E.; VICTORINO, F.R.; STEFFENS, V.A.; BERSANI-AMADO, C.A. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. **Dental Traumatol.**, v.26, n.1, p.323-331, 2010.
- CHONG, B.S.; FORD, T.R.P. The role of intracanal medication in root canal treatment. **Int. Endod. J.**, v.25, n.2, p.97-106, 1992.
- COHEN, S.; HARGREAVES, C.M. **Caminhos da polpa**. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of water-soluble derivative. **Vaccine**, v.10, n.12, p.817-823, 1992.

- DOBROWOLSKI, J.W.; VOHORA, S.B.; SHARMA, K.; SHAH, S.A.; NAQVI, S.A.H.; DANDIYA, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **J. Ethnopharmacol.**, v.35, n.1, p.77-82, 1991.
- ESTRELA, C. **Ciência Endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, 2004.
- FERRAZ, C.C.R.; GOMES, B.P.F.A.; ZAIA, A.A.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J. Endod.**, v.27, n.7, p.452-455, 2001.
- FERREIRA, F.B.A.; TORRES, S.A.; ROSA, O.P.S.; FERREIRA, C.M.; GARCIA, R.B.; MARCUCCI, M.C.; GOMES, B.P.F.A. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.104, n.5, p.709-716, 2007.
- FRANCO, S.L.; BUENO, J.H.F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v. 11, n.11, p. 48-51, 1999.
- GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; VIANNA, M.E.; BERBER, V.B.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int. Endod. J.**, v.34, n.6, p.424-428, 2001.
- GOMES, B.P.F.A.; SOUZA, S.F.C.; FERRAZ, C.C.R.; TEIXEIRA, F.B.; ZAIA, A.A.; VALDRIGHI, L.; SOUZA-FILHO, F.J. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. **Int. Endod. J.**, v.36, n.4, p.267-275, 2003.
- GRANGE, J.M.; DAVEY, R.M. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J R. Soc. Med.**, v.83, n.3, p.159-160, 1990.
- HAAPASALO, M ; ORSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J. Dent. Res.**, v.66, n.8, p.1375-1379, 1987.
- JUNG, I.Y.; SEO, M.A.; FOUAD, A.F.; SPANGBERG, L.S.W.; LEE, S.J.; KIM, H.J.; KUM, K.Y. Apical anatomy in mesial and mesiobuccal roots of permanent first molars. **J. Endod.**, v.31, n.5, p.364-368, 2005.
- KANDASWAMY, D.; VENKATESHBABU, N.; GOGULNATH, D.; KINDO, A.J. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morindacitrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, v.43, n.5, p.419-423, 2010.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacol.**, v.64, n.3, p.235-240, 1999.

- LEE, Y.; HAN, S.H.; HONG, S.H.; LEE, J.K.; JI, H.; KUM, K.Y. Antimicrobial efficacy of a polymeric chlorhexidine release device using *in vitro* model of *Enterococcus faecalis* dentinal tubule infection. **J. Endod.**, v.34, n.7, p.855-8, 2008.
- LEONARDO, M.R. **Endodontia. Tratamento de canais radiculares.** São Paulo: Artes Médicas, 2005.
- LEONARDO, M.R.; LEONARDO, R.T. **Endodontia: conceitos biológicos e recursos tecnológicos.** São Paulo: Artes Médicas, 2009.
- LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, n.3, p.388-395, 2007.
- LOPES, P.L.; SIQUEIRA JR, J.F. **Endodontia. Biologia e técnica.** Rio de Janeiro: Medsi, 2004.
- MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v.31, n.1, p.1-7, 1998.
- ONCAG, O.; COGULU, D.; UZEL, A.; SORKUN, K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. **Gen. Dent.**, v.54, n.5, p.319-322, 2006.
- SABIR, A.; TABBU, C.R.; AGUSTIONO, P.; SOSROSENO, W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. **J. Oral Sci.**, v.47, n.3, p.135-138, 2005.
- SIQUEIRA JR, J.F.; UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J. Endod.**, v.23, n.3, p.167-169, 1997.
- SIQUEIRA JR, J.F.; RÔÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.M.; SANTOS, K.R.N. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. **J. Endod.**, v.27, n.3, p.164-167, 2001.
- SJOGREN, U.; FIGDOR, D.; SPANGBERG, L.; SUNDQVIST, G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int. Endod. J.**, v.24, n.3, p.119-125, 1991.
- SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; ENDO, D.; PERSSON, S.; SJOGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg.**, v.85, n.1, p.86-93, 1998.
- VICTORINO, F.R., FRANCO, S.L., SVIDZINSKI, T. I. E., AVILACAMPOS, M. J., HIDALGO, M. M., BERSANIAMADO, C. A. Pharmacological evaluation of propolis solutions for endodontic use. **Pharm. Biol.**, v.45, n.9, p.721-727, 2007.

VICTORINO, F.R.; BRAMANTE, C.M.; WATANABE, E.; ITO, I.Y.; FRANCO, S.L.; HIDALGO, M.M. Antibacterial activity of propolis-based toothpastes for endodontic treatment. **Braz. J. Pharmac. Sci.**, v.45, n.4, p.795-800, 2009.

VICTORINO, F.R.; BRAMANTE, C.M.; ZAPATA, R.O.; CASAROTTO, A.R.; GARCIA, R.B.; MORAES, I.G.; HIDALGO, M.M. Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. **J. Appl. Oral Sci.**, v.18, n.6, p.621-624, 2010.

ANEXO A

Normas para publicação de artigos no JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

General Points on Composition

Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:

a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c”, below), or sentences with little to no transition within a paragraph.

b. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983)”. In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

c. Sentences are stronger when written in the active voice, i.e., the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation”, can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation”. Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

d. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

e. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, Endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method”, can be edited to “Formerly, Endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation”. The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

f. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions

are drawn from the results of this study, caution must be used”, can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study”.

g. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

General Points on the Organization of Original Research Manuscripts

- a. **Please Note:** *Starting in 2009, all abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc., and should not exceed more than 250 words in length.*
- b. **Title Page:** The title should describe the major conclusion of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard – it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org).
- c. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.
- d. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to provide sufficient detail. However, many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals.
- e. **Material and Methods:** The objective of the methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The three components to this section are the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the particular aspects used in the present study. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a commercial product, the manuscript should state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. Studies on humans should conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB approved the protocol and that informed consent was obtained. Studies involving animals should state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis, drop-outs from clinical trials, etc.
- f. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (i.e., neither methods nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study. Do not include all available data without justification, any repetitive findings will be rejected from publication. All Figs./Charts/Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings.

Figures: There are two general types of figures. The first type of figure includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (i.e., about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some

editing on your part given the small size of each panel, you will only be able to illustrate the most important feature of each photomicrograph. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., "A", "B", etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Chang, et al, (*JOE* 28:90, 2002), Hayashi, et al, (*JOE* 28:120, 2002) and by Davis, et al (*JOE* 28:464, 2002). At the Editor's discretion, color figures may be published at no cost to the authors. However, the Editor is limited by a yearly allowance and this offer does not include printing of reprints.

The second type of figure are graphs (i.e., line drawings) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

Tables: Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

- f. **Discussion:** The conclusion section should describe the major findings of the study. Both the strength and weaknesses of the observations should be discussed. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions? How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion.
- g. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be efficiently learned from reading past issues of the *JOE*. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

4. Page Limitations for Manuscripts in the Category of Basic Science/Endodontic Techniques

- a. **What is the limitation?** Original research reports in the category of basic science/endodontic techniques are limited to no more than 2,000 words (total for the abstract, introduction, methods, results and conclusions), and a total of three Figs./Charts/Tables. If a composite figure is used (as described above), then this will count as two of the three permitted Figs./Charts/Tables.
- b. **Does this apply to me?** Manuscripts submitted to the *JOE* can be broadly divided into several categories including review articles, clinical trials (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies), basic science/biology (animal or culture studies on biological research related to endodontics, or relevant pathology or physiology), and basic science/techniques (e.g., stress/strain/compression/strength/failure/composition studies on endodontic instruments or materials). Manuscripts submitted in this last category are the only category subject to these limitations. If you are not sure whether your manuscript falls within this category please contact the Editor by e-mail at jendodontics@uthscsa.edu.
- c. **Why page limitations?** Most surveyed stakeholders of the *JOE* desire timely publication of submitted manuscripts and an extension of papers to include review articles and other features. To accomplish these goals, we must reduce the average length of manuscripts since increasing the *JOE*'s number of published pages is prohibitively expensive. Although a difficult decision, restricting this one category of manuscripts accomplishes nearly all of these goals since ~40-50% of published papers are in this category.
- d. **How do I make my manuscript fit these limitations?** Adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor will reject manuscripts that exceed these limitations.

AvailableResources:

- . Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn& Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X
 - a. Day R..How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9
 - b. Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar)
 - c. Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.
 - d. Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

ANEXO B

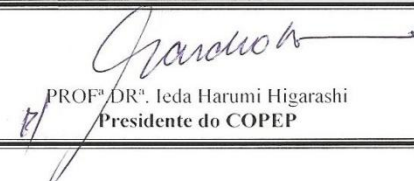

Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Registrado na CONEP em 10/02/1998

CAAE Nº. 0250.0.093.224-09

PARECER Nº. 488/2009

Pesquisador (a) Responsável: Mirian Marubayashi Hidalgo	
Centro/Departamento: CCS/Departamento de Odontologia	
Título do projeto: Avaliação das propriedades biológicas de formulas experimentais a base de própolis para uso endodontico - odontológico	
Considerações: Trata-se de projeto que pretende avaliar a biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, biodisponibilidade e propriedades físicas de formulações experimentais a base de própolis para possível utilização no tratamento endodontico - odontológico (pasta a base de própolis em substituição a atual pasta de hidróxido de cálcio). A maior parte dos testes será realizada em ratos como, por exemplo, o efeito irritativo e a toxicidade sistêmica aguda e crônica das preparações. Para os experimentos de avaliação da infiltração microbiana serão utilizados 60 dentes humanos unirradiculados com extração indicada e realizada na Clínica Odontológica da UEM. O projeto conta com a participação de diversos docentes do Centro de Ciências da Saúde e também de vários alunos. O projeto prevê gasto de R\$ 46.556,00 a ser coberto com os recursos obtidos junto a Fundação Araucária. O cronograma de execução prevê início para setembro de 2009 e término para agosto de 2011. O TCLE está redigido na forma de convite, com as garantias ao sujeito de pesquisa, preconizadas pela Res 196/96. As autorizações da Clínica Odontológica e demais laboratórios participantes foram anexadas ao protocolo. Parecer considerando o exposto somos de parecer favorável a aprovação do presente protocolo	
Situação: APROVADO	
CONEP: (X) para registro () para análise e parecer Data: 25/9/2009	
O pesquisador deverá apresentar Relatório Final para este Comitê em: outubro de 2011	
O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 182ª reunião do COPEP em 25/9/2009.	 PROFª DRª. Ieda Harumi Higarashi Presidente do COPEP

Em suas comunicações com esse Comitê cite o número de registro do seu CAAE.
 Bloco 10 sala 01 – Avenida Colombo, 5790 – CEP: 87020-900 – Maringá - PR
 Fone-Fax: (44) 3261-4444 – e-mail: copep@uem.br

APÊNDICE A

Densidade óptica e contagem das unidades formadoras de colônia dos espécimes tratados com própolis, Calen[®] e soro fisiológico, durante 7 e 15 dias.

	Tratamento de 7 dias						Tratamento de 15 dias					
	200µm		400µm		600µm		200µm		400µm		600µm	
	DO	UFC	DO	UFC	DO	UFC	DO	UFC	DO	UFC	DO	UFC
PRÓPOLIS	1,227	309	1,188	380	1,289	358	1,303	384	1,262	387	0,977	58
	1,336	335	1,269	411	BC NT	0 NT	1,283	325	1,085	650	0,789	58
	1,292	267	0,557	293	0,569	115	1,282	620	1,195	323	0,972	50
	1,280	368	BC 0,276*	0 293*	BC NT	0 NT	1,330	640	BC 1,167*	0 387*	0,871	156
	1,284	215	1,294	411	1,245	232	1,324	534	1,203	323	1,024	156
	1,285	280	BC NT	0 NT	1,169	285	1,357	325	1,016	500	1,125	229
<i>Média</i>	1,284	295,66	0,722	249,16	0,718	165	1,313	471,33	0,962	363,83	0,959	117,83
CALEN [®]	1,254	336	1,200	380	BC 1,236**	0 452**	1,300	221	1,209	428	0,966	152
	1,298	320	1,331	351	1,302	346	1,347	302	1,057	231	0,756	92
	1,261	311	1,149	171	1,156	204	1,267	594	1,050	231	0,951	32
	1,210	279	1,199	417	BC 0,198*	0 102*	1,280	234	0,993	421	0,908	42
	1,185	312	1,211	380	1,137	173	1,270	231	BC 1,195*	0 231*	0,656	69
	1,379	339	1,124	171	0,773	102	1,282	234	1,054	428	0,982	152
<i>Média</i>	1,264	316,16	1,202	311,66	0,729	137,5	1,291	302,66	0,898	289,83	0,869	89,83
SORO FISIOLÓGICO	1,390	264	1,153	329	1,207	339	1,268	206	1,055	434	1,030	329
	1,327	482	1,196	358	1,164	280	1,294	364	1,223	323	0,992	96
	1,268	239	1,178	166	1,070	131	1,282	206	1,268	323	1,137	65
	1,333	366	1,187	166	1,188	131	1,316	365	1,338	543	1,050	429
	1,364	244	1,143	358	1,005	286	1,365	482	1,106	413	1,006	329
	1,351	482	1,198	330	0,806	280	1,283	365	1,278	323	1,037	96
<i>Média</i>	1,338	346,16	1,175	284,50	1,073	241,16	1,301	331,33	1,211	393,16	1,042	224

Os valores correspondentes à dentina coletada na profundidade de 200µm representam o controle de contaminação, tendo sido obtidos antes do tratamento com as respectivas medicações, durante os períodos de 7 e 15 dias e, portanto, excluídos da posterior análise estatística. BC= espécimes que não apresentaram turvação em 24h de incubação. *Leitura no momento de turvação, com 48h de incubação. **Leitura no momento de turvação, com 72h de incubação. NT= espécimes que não apresentaram turvação em até 96h de incubação, sendo considerado o valor zero para o cálculo da média das UFC.

APÊNDICE B

Descrição da variável DO em relação à medicação, ao tempo de tratamento e à profundidade de dentina coletada

Medicação	Tempo (dias)	Profundidade (μm)	Média	Desvio Padrão	Variância	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle de contaminação		200	1,295	0,057	0,003	1,185	1,289	1,390
Própolis	7	400	0,723	0,612	0,375	0,014	0,873	1,294
		600	0,718	0,602	0,362	0,018	0,869	1,289
	15	400	0,962	0,474	0,225	0,011	1,140	1,262
		600	0,960	0,117	0,014	0,789	0,975	1,125
Calen [®]	7	400	1,202	0,072	0,005	1,124	1,200	1,331
		600	0,730	0,588	0,345	0,005	0,955	1,302
	15	400	0,898	0,434	0,188	0,025	1,052	1,209
		600	0,870	0,133	0,018	0,656	0,930	0,982
Soro	7	400	1,176	0,023	0,001	1,143	1,183	1,198
		600	1,073	0,152	0,023	0,806	1,117	1,207
	15	400	1,211	0,109	0,012	1,055	1,246	1,338
		600	1,042	0,051	0,003	0,992	1,034	1,137

Os valores do controle de contaminação, na profundidade de 200 μm , foram utilizados para assegurar a eficácia da infecção bacteriana por *E. faecalis*, sendo excluídos da análise estatística pelo Modelo Linear de Efeitos Mistos.

APÊNDICE C

Significância dos parâmetros do Modelo Linear de Efeitos Mistos.

Efeito	P-valor
Medicação (β_i)	0,0022 *
Tempo de tratamento (α_j)	0,5327
Profundidade da dentina coletada (γ_k)	0,1327
Medicação vs Tempo de tratamento (θ_{ij})	0,4331
Medicação vs Profundidade (δ_{ik})	0,6112
Tempo de tratamento vs Profundidade (λ_{jk})	0,4604
Medicação vs Tempo vs Profundidade (μ_{ijk})	0,2739

*Significante em nível de significância $\alpha=5\%$.

APÊNDICE D

Pós-teste de Contraste utilizado para comparar as covariáveis significativas, conforme a diferença evidenciada pelo Modelo Linear de Efeitos Mistos.

Efeito	Medicação	Média (DP)	Medicação	Média (DP)	P-valor
Medicação	Própolis	0.841(0.477)	Calen [®]	0.925(0.390)	0.5067
Medicação	Própolis	0.841(0.477)	Soro	1.126(0.116)	0.0074*
Medicação	Calen [®]	0.925(0.390)	Soro	1.126(0.116)	0.0133*

*Significante em nível de significância $\alpha=5\%$.

APÊNDICE E

Valores das repetições e médias dos brancos obtidos para cada medicação intracanal testada, nos respectivos tempos de tratamento.

		<i>Tratamento de 7 dias</i>			<i>Tratamento de 15 dias</i>		
		200µm	400µm	600µm	200µm	400µm	600µm
PRÓPOLIS	Rep. 1	0,020	0,020	0,016	0,020	0,012	0,090
	Rep. 2	0,010	0,008	0,020	0,010	0,010	0,084
	Média	0,015	0,014	0,018	0,015	0,011	0,087
CALEN®	Rep. 1	0,028	0,015	0,004	0,028	0,034	0,034
	Rep. 2	0,048	0,021	0,006	0,048	0,016	0,040
	Média	0,038	0,018	0,005	0,038	0,025	0,037
SORO	Rep. 1	0,020	0,016	0,026	0,020	0,015	0,095
	Rep. 2	0,000	0,022	0,024	0,000	0,011	0,091
	Média	0,010	0,019	0,025	0,010	0,013	0,093

APÊNDICE F

Momento de contaminação (turvação) dos espécimes tratados com própolis, Calen[®] ou soro fisiológico durante os períodos de 7 e 15 dias, após incubação a 37°C por até 96h

	Incubação (h)	Tratamento de 7 dias			Tratamento de 15 dias		
		200µm	400µm	600µm	200µm	400µm	600µm
PRÓPOLIS (n = 6)	24	6	4	4	6	5	6
	48		1			1	
	72						
	NT		1	2			
CALEN [®] (n = 6)	24	6	6	4	6	5	6
	48			1		1	
	72			1			
	NT						
SORO (n = 6)	24	6	6	6	6	6	6
	48						
	72						
	NT						

NT= espécimes que não turvaram em até 96h de incubação. A profundidade de 200µm representa o controle de contaminação, antes do tratamento com as medicações intracanal por 7 ou 15 dias.