Ação de própolis na superfície dentinária após condicionamento ácido

Própolis solutions application on dentinal surface after acid conditioners

RESUMO

OBJETIVO - O própolis é conhecido por suas propriedades biológicas possuindo atividade anti-inflamatória, antibacteriana, cicatrizante e anestésica. Na odontologia este produto natural tem despertado interesse devido a resultados satisfatórios obtidos em diversas especialidades. Esse estudo objetivou a avaliação ultraestrutural das alterações morfológicas provocadas pelo própolis sobre a superfície dentinária *in vitro*, após a remoção da camada de esfregaço com uma solução ácida. **MÉTODOS** - Foram utilizados cinco grupos (n=5) de coroas de dentes molares, seccionadas ao meio no sentido mesio-distal que tiveram sua dentina desgastada por instrumento cortante rotatório carbide nº 56 em aproximadamente 1 mm em ambas as faces internas ao corte, para formar uma camada de esfregaço. Um grupo foi controle sem tratamento, nos demais grupos foi aplicado ácido fosfórico a 37% por 30 segundos na superfície dentinária e, em três deles, posteriormente, foi aplicada solução etanólica de própolis a 10, 20 e 30% respectivamente por 30 segundos. Após a aplicação das soluções todos os espécimes foram lavados, secos, preparados e avaliados em microscopia eletrônica de varredura. **RESULTADOS E CONCLUSÕES** - Foi visualizada a camada de esfregaço na dentina do grupo controle. Em G2 (somente o ácido fosfórico a 37%) observou-se a desobstrução dos túbulos dentinários. Nos três grupos restantes foi evidenciada a permanência do extrato etanólico de própolis na superfície e sobre os túbulos dentinários, sugerindo uma permanência de própolis na superfície e sem penetração nos túbulos.

Descritores: Dentina; camada de lama dentinária; ácido fosfórico; própolis; microscopia eletrônica de varredura.

Cleusa Aparecida Campanini Geraldini*
Rosana Ferreira Silva**
Renata Pilli Jóias***
Sigmar de Mello Rode****

* Prof. Doutora do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilo Faciais do Curso de Odontologia da Universidade São Paulo.

** UNESP-SJC. Estudante do curso de mestrado do programa de Biopatologia Bucal da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), São José dos Campos, Brasil

*** Prof. Assistente do Curso de Odontologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil

**** Prof. Titular do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), São José dos Campos, Brasil

Submetido em: 7-6-2017

Aceito em: 26-7-2017

INTRODUÇÃO

O própolis é uma substância natural resinosa, produzida por abelhas através da mistura das secreções de suas glândulas hipofaringeanas com o produto digerido de resinas recolhidas a partir de folhas, flores e árvores, que é utilizado como um selante e esterilizador em colmeias.¹⁻² Apesar do uso do própolis ser muito antigo e popular, e seu consumo bastante difundido em alguns países, os estudos científicos brasileiros objetivando comprovar suas propriedades biológicas e atividades terapêuticas são relativamente recentes.³⁻⁴

Na odontologia, durante o preparo cavitário, quando um dente é submetido ao uso de instrumentos cortantes rotatórios e manuais, forma-se sobre a dentina uma camada denominada de esfregaço dentinário, responsável pela ancoragem de bactérias sob as restaurações.⁵

É preconizado o uso de soluções ácidas sobre a superfície dentinária, com o objetivo de remover totalmente a camada de esfregaço, abrindo a entrada dos túbulos dentinários e conseguindo, dessa forma maior adesão das restaurações.⁵

Alguns autores consideram a total remoção dessa camada um risco à integridade do órgão pulpar, preconizando somente modificação superficial da mesma por meio do uso de substâncias não ácidas.^{5,6}

O estudo da adesão à dentina gerou controvérsia a respeito da remoção ou não da camada de esfregaço dentinário, da sua relação com o resultado final das restaurações e da possível ocorrência de sensibilidade pós-operatória.

Observando a propriedade antibacteriana do própolis e tendo em vista inúmeros relatos sobre sua aplicação clínica, na área médica e odontológica, iniciamos estudos experimentais, *in vitro*, da sua aplicação na superfície dentinária, após a remoção do esfregaço dentinário com uma substância ácida⁷.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se 25 dentes molares íntegros, do banco de dentes do Curso de Odontologia, da Universidade Ibirapuera, mantidos em cloreto de sódio a 0,9%. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Ibirapuera (086/2002).

As coroas foram separadas das raízes, e seccionadas ao meio no sentido mésio-distal, com disco de carborundum em peça de mão. A seguir, com instrumento cortante rotatório diamantado nº 1094 (KG Sorensen, Brasil) foi removido todo o esmalte da porção vestibular e lingual dos fragmentos da coroa. Nestas faces, com instrumento rotatório de aço carbide cilíndrico liso nº 56, (KG Sorensen, Brasil), foi cortado aproximadamente 1mm de dentina em alta rotação, com refrigeração ar/água por 30 segundos, produzindo assim uma camada de esfregaço dentinário, sendo utilizada uma broca para cada dente, de acordo com o preconizado por Araújo et al.(1998).⁸

O própolis foi obtido de colmeias localizadas na região de Bauru, Estado de São Paulo. Após a limpeza, por meio de catação manual, preparou-se o extrato etanólico de própolis (EEP) com graduação do álcool etílico neutro a 70º G.L.; pesagem de 1L de álcool etílico neutro a 70º G.L. (860g); pesagem do própolis a 10% (92 g), a 20% (215 g), e

a 30% (360 g); os produtos foram deixados em maceração com agitação, até a obtenção da máxima concentração de resina (10, 20 e 30%), que ocorre em aproximadamente 24h, quando então se filtrou a solução.

Os espécimes foram divididos aleatoriamente em cinco grupos para aplicação das soluções por 30 segundos: grupo 1(G1): controle sem tratamento, porém com o mesmo desgaste de 1mm em ambas as superfícies, grupo 2(G2) Ácido Fosfórico a 37%, grupo 3(G3) Ácido Fosfórico a 37% e EEP 10%, grupo 4(G4) Ácido Fosfórico a 37% e EEP 20%, grupo 5(G5) Ácido Fosfórico a 37% e EEP 30%. Após cada tratamento, os dentes foram lavados com spray ar/água por 20 segundos, secos suavemente com jatos de ar livre de impurezas, durante 20 segundos, e armazenados em recipiente estéril.

Para o tratamento superficial dos grupos G2 a G5, aplicou-se uma solução de ácido fosfórico a 37% em forma de gel da Alfa Etch (DFL Indústria e Comércio LTDA, Brasil), por 30 segundos, em seguida nas superfícies dentinárias dos grupos de três a cinco se fez uso de bolinha de algodão estéril para aplicação das soluções com própolis nas respectivas concentrações e tempos descritos anteriormente (EEP e 30 segundo respectivamente).

Após cada tratamento, os dentes foram lavados com spray ar/água por 20 segundos, secos suavemente com jatos de ar livre de impurezas, durante 20 segundos, e armazenados em recipiente estéril.

Três dentes de cada grupo, após o tratamento, tiveram a sua superfície fraturada, para visualização em corte longitudinal. A fratura foi obtida apoiando-se e pressionando um instrumento manual, em forma de cunha em um pequeno sulco realizado com broca, na face oposta a que se vai observar.⁸Os espécimes foram avaliados nas superfícies vestibular e lingual e em cortes longitudinais da dentina.

Para avaliação da dentina em microscopia eletrônica de varredura (M.E.V.), os corpos de prova foram fixados com cola Super Bonder (Loctite Brasil Ltda, Ind. Bras.) sobre um suporte metálico cilíndrico de alumínio (*stub*). Em seguida, foram armazenados em uma câmara de vácuo para receberem metalização a ouro com uma camada de aproximadamente 25 a 30 nanômetros por um aparelho Balzer SCD 50 Sputter Coater, com a finalidade de evitar o acúmulo de carga elétrica durante a observação ao M.E.V. Após a metalização os corpos de prova foram observados no Microscópio Eletrônico de Varredura (modelo Jeol J.S.M. 6.100, Japão), situado no Centro Técnico Aeroespacial - CTA em São José dos Campos, Divisão de Materiais Raros (AMR), com aumentos originais entre mil a dez mil vezes. Eletromicrografias foram obtidas para análise morfológica comparativa dos espécimes.

RESULTADOS

Foram feitas observações comparativas para os diversos espécimes, em M.E.V. na superfície e em cortes longitudinais da dentina (Quadro 1). Na figura 1 está caracterizada superfície do G1.

Quadro 1 – Características (MEV) da superfície dos dentes dos cinco grupos.

	Caracterização da superfície	Corte longitudinal
G1	Superfície irregular, com ondulações praticamente paralelas demonstrando o efeito da ação da broca, sugerindo fortemente uma camada de esfregaço dentinário, recobrimdo de maneira não uniforme toda a superfície e obliterando os túbulos dentinários	A dentina apresentou-se composta por túbulos dispostos de maneira organizada em toda a sua extensão, envoltos por uma porção peritubular mais mineralizada e imersos em massa intertubular menos mineralizada. Verificou-se a obstrução da entrada, com leve penetração, nos túbulos dentinários por uma substância sugerindo uma camada de esfregaço e caracterizando os tampões tubulares
G2	Na superfície mais regular sem a presença dea camada de esfregaço dentinário e expondo a dentina intertubular e a abertura dos túbulos dentinários	A dentina apresentou-se composta por túbulos dispostos de maneira organizada em toda a sua extensão, envoltos por uma porção peritubular mais mineralizada e imersos em uma massa intertubular menos mineralizada. Ausência de esfregaço expondo os túbulos dentinários, abrindo e alargando a entrada em forma se funil, com evidente desmineralização
G3	Na superfície observou-se uma camada de partículas irregulares sugestivas de solução de própolis cobrindo parcialmente a dentina, e conservando a abertura de vários túbulos dentinários	A dentina apresentou-se composta por túbulos dispostos de maneira organizada em toda a sua extensão, envoltos por uma porção peritubular mais mineralizada com abertura e alargamento dos túbulos dentinários e imersos em uma massa intertubular menos mineralizada. Observou-se uma camada irregular sobre a superfície dentinária, paraentemente sem penetração nos túbulos dentinários, embora estivesse ocluindo alguns deles
G4	Superfície coberta por partículas com formas esferoidais, de vários tamanhos, sugerindo serem partículas de própolis que ficaram sobre a dentina cobrindo quase que totalmente os túbulos dentinários	A dentina era composta por túbulos dispostos de maneira organizada em toda a sua extensão, envoltos por uma porção peritubular mais mineralizada com abertura e alargamento dos túbulos dentinários imersos em uma massa intertubular menos mineralizada. Verificou-se uma camada aparentemente maior que o grupo anterior sobre a dentina sem penetração nos túbulos dentinários embora estivessem ocluindo alguns deles

FIGURA 1 – G1: superfície irregular, com ondulações praticamente paralelas demonstrando o efeito da ação da broca, sugerindo fortemente uma camada de esfregaço dentinário, recobrindo de maneira não uniforme toda a superfície e obliterando os túbulos dentinários.

FIGURA 2 – G1: obstrução da entrada, com leve penetração, nos túbulos dentinários por uma substância irregular que recobria toda superfície dentinária sugerindo uma camada de esfregaço e caracterizando os tampões tubulares.

FIGURA 3 – G2: no corte longitudinal a dentina apresentou-se composta por túbulos dispostos de maneira organizada em toda a sua extensão, envoltos por uma porção peritubular mais mineralizada e imersos em uma massa intertubular menos mineralizada.

FIGURAS 4 – G2: Ausência total da camada de esfregaço expondo os túbulos dentinários, abrindo e alargando a entrada em forma de funil, com evidente desmineralização.

FIGURAS 5 – G2: Ausência total da camada de esfregaço expondo os túbulos dentinários, abrindo e alargando a entrada em forma de funil, com evidente desmineralização.

FIGURA 6 – G3: Camada de partículas irregulares sugestivas de solução de própolis cobrindo parcialmente a dentina e conservando a abertura de vários túbulos dentinários

FIGURA 7 – G3: Camada irregular sobre a superfície dentinária, aparentemente sem penetração nos túbulos, embora estivesse ocluindo alguns deles.

FIGURA 8 – G4: Superfície coberta por partículas com formas esferoidais, de vários tamanhos, sugerindo serem partículas de própolis que ficaram sobre a dentina cobrindo quase que totalmente os túbulos dentinários

FIGURA 9 – G4: Camada aparentemente maior do que G2 sobre a dentina sem penetração nos túbulos dentinários embora estivessem ocluindo alguns deles.

FIGURA 10 – G5: Presença de formas esferoidais como em G4, porém maiores e em maior quantidade, recobrendo quase toda a dentina e conservando a abertura de poucos túbulos.

FIGURA 11 – G5: No corte longitudinal observou-se que a dentina apresentou-se composta por túbulos dispostos de maneira organizada em toda a sua extensão, envoltos por uma porção peritubular mais mineralizada com abertura e alargamento dos túbulos dentinários e imersos em uma massa intertubular menos mineralizada. Observou-se características semelhantes às de G4 apenas com a camada um pouco maior e mais irregular

DISCUSSÃO

O própolis vem se destacando devido as suas inúmeras propriedades terapêuticas, e com isso incentivado pesquisadores a analisarem sua composição química e a possível relação com suas atividades biológicas. Os principais componentes da própolis com propriedades biológicas são compostos fenólicos, principalmente os flavonóides que são compostos naturais derivados da flavona, encontrados nas diversas partes das plantas como brotos, botões florais, folhas e resinas das árvores.^{1-4,9,10} O própolis possui propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, antiprotozoárias, citotóxicas; cicatrizante de tecido ósseo e cartilaginoso; anestésico local; regenerador da polpa dental entre outros.^{1,3,11}

Direcionamos nossos estudos para o tratamento da superfície dentinária com um produto natural, seguindo uma tendência mundial de encontrar produtos alternativos no tratamento da saúde bucal. O estudo foi orientados com uso do própolis sobre a superfície dentinária, pois as avaliações mostraram que é possível formar uma barreira com esta substância, no combate aos microorganismos da cavidade bucal, confirmando que o própolis apresenta o poder de inibir a aderência dos microorganismos na superfície dentinária.¹²

O *S. mutans* é considerado o principal microorganismo cariogênico do homem e esta espécie é encontrada em mais de 80% dos indivíduos. Experimentos com própolis verificaram atividade antibacteriana sobre amostras de *S. mutans*, mostrando com estes resultados que existe um campo bastante promissor dos estudos no combate a cárie, o que nos motivou a pesquisar este produto.^{11,12}

Nossa pesquisa utilizou soluções de própolis após o uso de uma solução ácida na superfície dentinária, para remover toda a camada de esfregaço, e verificar uma possível penetração nos túbulos dentinários. Em estudo anterior¹³ o própolis foi utilizado sobre a camada de esfregaço promovendo limpeza e não abertura dos túbulos dentinários. Avaliamos também a ação do própolis na superfície dentinária e em corte longitudinal após ter sido utilizada uma solução ácida.

Com relação às substâncias utilizadas em nosso experimento, podemos verificar que todas promoveram algum tipo de alteração na morfologia da superfície dentinária, concordando com os resultados da literatura.^{13,14}

Observamos em M.E.V. as alterações ocorridas na superfície dentinária do grupo um, controle, onde a dentina foi desgastada com instrumento rotatório e nenhum tratamento foi aplicado; uma camada irregular sobre a superfície obstruindo a entrada dos túbulos dentinários, chamada de esfregaço dentinário. Nossos resultados conferem com os autores que em seus estudos observaram uma camada sobre a dentina, composta de substâncias orgânicas e inorgânicas.^{6,8,13}

A camada de esfregaço que permanece na superfície dentinária pode interferir na adaptação do material restaurador favorecendo a infiltração marginal e a microinfiltração com presença de bactérias causando danos à polpa. Com relação ao esfregaço dentinário em nossos estudos do grupo um em corte longitudinal observamos que a dentina apresentou-se composta por túbulos dispostos de maneira organizada em toda sua extensão, envoltos por uma porção peritubular mais mineralizada e imersos em uma massa intertubular menos mineralizada. Observou-se a obstrução da entrada, com leve penetração nos túbulos dentinários por uma substância irregular que recobria toda superfície dentinária sugerindo uma camada de esfregaço.^{5,6}

Em nossos experimentos nos grupos do dois ao quinto optamos por substância desmineralizante para melhor remoção da camada de esfregaço. No grupo dois, utilizamos ácido fosfórico a 37%, e em corte longitudinal observamos os túbulos livres da camada de esfregaço, com alargamento e abertura dos mesmos em forma de funil. Em outros estudos a abertura dos túbulos foi observada mediante diversas concentrações de soluções ácidas, entre elas o ácido fosfórico a 37% que também usamos, apesar de termos utilizado a solução ácida com tempos menores que o descrito.^{5,8,15,16,17}

Em nosso trabalho apesar do fabricante recomendar sessenta segundos, utilizamos a solução ácida por 30 segundos devido aos seus resultados satisfatórios obtidos de experimentos anteriores e, pela necessidade da abertura dos túbulos dentinários.⁸

No grupo três, após a utilização do ácido fosfórico a 37%, foi feita a aplicação do EEP a 10%. Observamos o depósito de partículas sobre a superfície dentinária, mantendo parte dos túbulos obliterados e parte exposto, onde foi possível verificar através do corte longitudinal uma camada irregular de própolis sobre a superfície dentinária, aparentemente sem penetrar no interior dos túbulos. Clinicamente seria bastante satisfatório saber que a superfície poderia ter proteção contra atividade microbiana pelas propriedades da própolis, e praticamente não alterando a permeabilidade.^{6,11,12,16}

No grupo quatro do nosso estudo, utilizamos EEP a 20%, e observamos que a própolis cobriram parte da superfície dentinária e obliteraram alguns túbulos. As partículas são, geralmente, maiores que as aberturas tubulares, porém não verificamos penetração nem

mesmo das menores. Este própolis depositado sobre a superfície dentinária possivelmente diminuiria a permeabilidade e atuaria como barreira mecânica e biológica à penetração de microrganismos. Na sua composição o própolis tem de 50 a 55% de resinas naturais, provavelmente os túbulos estariam selados com esta resina.⁹ Pesquisas para verificação da aderência da própolis na superfície dentinária seriam necessárias. Tem-se também a necessidade de estudos futuros para afirmar se a camada de própolis depositada sobre a superfície dentinária poderia ou não interferir na adaptação de materiais restauradores.

No grupo cinco, utilizamos EEP a 30%, em corte longitudinal e não foi observada a entrada da substância no interior dos túbulos, na superfície os resultados foram semelhantes aos do grupo quatro só que as partículas da própolis eram de tamanhos maiores e em maior densidade, obstruindo quase todas as entradas dos túbulos dentinários.

A aplicação de extrato etanólico de própolis a 5% em cavidades de cães reduz a reação inflamatória.¹⁸ Com base nestes dados acreditamos que a própolis agindo sobre os micro-organismos da cavidade dentinária, onde existe uma correlação direta entre a dentina e a polpa, poderá levar clinicamente, a uma resposta pulpar favorável.

A utilização de soluções de própolis na cavidade dentinária deveria ser feita com parcimônia, pois o própolis possui componente fenólico,³ que podem ser agressivos, apesar de contrariarem outros experimentos¹⁸, onde observaram que o própolis reduzia a reação inflamatória da polpa e induzia a formação de fibras colágenas. Buscamos o estudo da dentina com um produto natural, por já saber de suas propriedades farmacológicas favoráveis. Avaliações anteriores¹³ mostraram que o própolis exerceu um poder de limpeza sobre a camada de esfregaço dentinário, mantendo os túbulos obliterados e possivelmente exercendo ação bactericida e antibacteriana na superfície dentinária.

Conforme verificamos em nosso experimento, parece haver uma camada irregular sobre a superfície dentinária com a aplicação de própolis, aumentando com as concentrações utilizadas. Outras pesquisas seriam necessárias para observar porque não houve penetração do própolis no interior dos túbulos dentinários.

Unindo estudos sobre o própolis, considerando sua atividade bactericida e bacteriostática sobre os micro-organismos bucais e a presença em sua composição de agente ativo na proteção contra a cárie, nos resta continuar realizando pesquisas para elucidar melhor as propriedades da própolis na superfície dentinária e sua ação contra cárie em humanos.^{11-13,19,20}

CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais deste trabalho pode-se concluir que o ácido fosfórico a 37% removeu a camada de esfregaço dentinário, expondo e alargando, em forma de funil, a abertura dos túbulos dentinários; o extrato etanólico de própolis (EEP) não penetrou nos túbulos dentinários nas concentrações estudadas; o extrato etanólico de própolis 10% apresentou uma camada irregular sobre a superfície dentinária mantendo a abertura de vários túbulos; o extrato etanólico de própolis 20% formou uma camada na superfície dentinária mais espessa que o do grupo de 10%, disposta em forma de partículas esferoidais de tamanho variado, mantendo alguns túbulos abertos; o extrato etanólico de própolis 30% manteve as características do EEP 20%, com uma camada mais espessa e partículas de tamanhos maiores, em maior densidade e com pouca abertura dos túbulos.

REFERÊNCIAS

1. Kumar VLS. Propolis in dentistry and oral cancer management. *N Am J Med Sci*. 2014 Jun; 6(6): 250-9.
2. Wagh VD. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci*. 2013; 2013:308249. doi:10.1155/2013/308249. Epub 2013 Dec 9.
3. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995; 26: 83-99.
4. Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2001; 74:105-112.
5. Gwinnett AJ. Smear layer: morphological considerations. *Oper. Dent.*, 1984; 9 (3): 3-12.
6. Pashley DH. Smear layer: physiological considerations. *Oper Dent*. 1984; 9(3): 13-29 xx.
7. Mohan PV, Uloopi KS, Vinay C, Rao RC. In vivo comparison of cavity disinfection efficacy with APF gel, Propolis, Diode Laser, and 2% chlorhexidine in primary teeth. *Contemp Clin Dent*. 2016, Jan-Mar; 7(1): 45-50
8. Araújo MAJ, Rode SM, Villela LC, Gonçalves RD. Avaliação qualitativa do efeito de agentes de limpeza na camada de lama dentinária: estudo ultra-estrutural em microscopia eletrônica de varredura. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1998; 12 (2): 99-104
9. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*. 2014;19(12),19610-19632; doi:10.3390/molecules191219610
10. Bankova VS, Hristov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch*. 1995; 50c: 167-72
11. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Re*. 1991; 25(5):347-351
12. Gebara ECE; Zardetto CGC; Mayer MPA. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre o *S.mutans* e *S.sobrinus*. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1996; 10 (4): 251-256
13. Geraldini CAC; Salgado EGC; Rode SM. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária: avaliação ultra-estrutural em M.E.V.. *Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos*. 2000; 3(2): 37-42.
14. Dekon AFC, Nagen Filho H, Souza SHS. A inter-relação lama dentinária (smear layer) com agentes de limpeza, condicionadores e primers. *Rev Fac Odontol*. 1994; 2(3): 68-76
15. Pashley DH. The effects of acid etching on the pulpodentin complex. *Oper Dent*. 1992;17:229-242
16. Pashley DH, Pashley EL. Dentin permeability and restorative dentistry: a status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent*. 1991;4:5-9
17. Pashley DH, Horner JA, Brewer PD. Interactions of conditioners on the dentin surface. *Oper Dent*. 1992; suppl. 5:137-50
18. Scheller S, Gazda G, Pietsz G, Gabrys J, Szumlas J, Eckert L, Shani J. The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. *Pharmacol Res Commun*. 1988; 20(4) 323-8
19. Bandeira MFCL, Lima GR, Lopes PP, et al. Dentin Cleaning Ability of an Amazon Bioactive: Evaluation by Scanning Electron Microscopy. *The Open Dentistry Journal*. 2016;10:182-187. doi:10.2174/1874210601610010182.
20. Prabhakar AR, Karuna YM, Yavaal C, Deepak BM. Cavity disinfection in minimally invasive dentistry - comparative evaluation of Aloe vera and propolis: A randomized clinical trial. *Contemp Clin Dent*. 2015 Mar; 6(Suppl 1): 24-31. doi: 10.4103/0976-237X.152933.