

Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*

Study of antibacterial action of hydroalcoholic extract of propolis red on Enterococcus faecalis

Anderson Lessa SIQUEIRA^a, Camila Gomes DANTAS^a, Margarete Zanardo GOMES^a,
Francine Ferreira PADILHA^a, Ricardo Luiz Cavalcanti de ALBUQUERQUE JÚNIOR^a,
Juliana Cordeiro CARDOSO^{a*}

^aInstituto de Tecnologia e Pesquisa, UNIT – Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil

Resumo

Introdução: A própolis é uma substância resinosa e complexa; produzida pelas abelhas, destaca-se por suas propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante. Poucos trabalhos existem sobre a variedade de própolis vermelha, encontrada no Estado de Sergipe. **Objetivo:** Avaliar a ação antimicrobiana do extrato de própolis vermelha, coletada na região nordeste do Estado de Sergipe, contra cepas de *Enterococcus faecalis*. **Material e método:** As amostras de própolis vermelha foram coletadas em Brejo Grande-SE, Brasil, e identificadas segundo suas características sensoriais, a granulometria e requisitos físico-químicos. O teor de flavonoides no extrato seco foi determinado. Soluções de própolis vermelha (EEP) foram preparadas nas concentrações de 1%; 2,5%; 5% e 7,5%. A cepa bacteriana de referência utilizada foi *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212. A atividade antibacteriana foi verificada por meio de testes *in vitro* (teste de difusão em disco e determinação da concentração bactericida mínima – CBM) e *ex vivo* (utilizando dentes humanos extraídos). No teste *ex vivo*, os dentes contaminados foram divididos em três grupos com dez dentes cada. O grupo 1 foi tratado com própolis a 7,5% (concentração determinada no teste CBM); o grupo 2 foi tratado como controle positivo, com solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, e o grupo 3 foi utilizado como controle negativo, sendo tratado apenas com solução salina NaCl 0,9%. **Resultado:** O extrato de própolis promoveu halo de inibição comparado ao da solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, variando entre 12 e 16 mm. Não houve crescimento bacteriano após irrigação do conduto radicular com a solução de EEP a 7,5%. **Conclusão:** A própolis coletada apresentou médio teor de flavonoides (1,8%) e características físico-químicas coerentes com as exigidas pelo Ministério da Agricultura. Na concentração de 7,5% de própolis vermelha, foi observado um maior potencial antibacteriano quando comparado aos demais grupos.

Descritores: Própolis; bactérias; *Enterococcus faecalis*.

Abstract

Introduction: Propolis is a complex resinous substance produced by bees that has therapeutic properties, such as antimicrobial activity, anti-inflammatory, healing. Few studies exist on the red variety of propolis, found in the state of Sergipe. **Objective:** Evaluation of the antimicrobial action of the extract of propolis red collected in the northeastern state of Sergipe, against strains of *Enterococcus faecalis*. **Material and method:** The red propolis samples were collected in Brejo Grande/SE - Brazil and identified according to their sensory characteristics, granulometry and physical chemical requirements. The content of flavonoids in dried extract was determined. Solutions of red propolis (EEP) were prepared at concentrations of 1%; 2.5%; 5% and 7.5%. The bacterial strain used was *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212. The antibacterial activity was verified by *in vitro* tests (disk diffusion test and determination of minimum bactericidal concentration - CBM) and *ex vivo* (using human extracted teeth). The test, *ex vivo* contaminated teeth were divided into three groups with 10 teeth each. Group 1 was treated with propolis to 7.5% (concentration determined in CBM test), the Group 2 was treated as positive control with sodium hypochlorite solution 2.5% and Group 3 was used as a negative control and was treated only with sterile saline. **Result:** The extract of propolis promoted inhibition zone compared to results from solution of sodium hypochlorite to 2.5%, showing values between 12 and 16 mm. There was no bacterial growth after root conduct irrigation with EEP to 7.5%. **Conclusion:** Propolis collected showed medium content of flavonoids (1.8%) and physical chemical characteristics consistent to those required by the Brazilian Government. At 7.5% of propolis extract, we observed a higher antibacterial potential than others groups.

Descriptors: Propolis; bacteria; *Enterococcus faecalis*.

INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos no sistema de canais é a principal causa de infecções endodônticas e a sua viabilidade depende do potencial de oxidorredução, da disponibilidade de nutrientes e do sistema de defesa do hospedeiro¹. Em infecções persistentes, provenientes da necrose pulpar, o teor de oxigênio no canal é baixo, contribuindo para o predomínio de bactérias anaeróbias e facultativas².

A identificação dos microrganismos predominantes nas infecções possibilita a adoção de medidas destinadas à sua eliminação no interior do canal. Sabe-se que a instrumentação, isoladamente, não garante a completa remoção ou a inativação destes nos canais infectados, sendo importante a irrigação e a medicação, associando a limpeza mecânica com a utilização de agentes antibacterianos, para melhorar a efetividade do tratamento³. Inúmeras substâncias – como o QMix^{4,5}, os tensoativos⁶ e até mesmo os fitoterápicos⁷ – vêm sendo estudadas para serem utilizadas como soluções irrigadoras, pois estas auxiliam no preparo químico-mecânico, na limpeza e na desinfecção do sistema de canais radiculares.

Um dos principais microrganismos envolvidos neste processo infeccioso é o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Este anaeróbio facultativo é resistente ao tratamento endodôntico, principalmente no que diz respeito ao crescimento em pH alcalino, sendo capaz de sobreviver em pH na faixa de 2 a 10⁸ e em ambientes hipotônicos e hipertônicos, sob falta de nutrientes, além de apresentar mecanismos de aderência às células do hospedeiro.

A infecção se dá pela invasão do microrganismo nos túbulos dentinários, colonizando os canalículos e reinfetando o canal já obturado. Adicionalmente, o microrganismo possui a capacidade de se aderir às fibras colágenas desmineralizadas dos túbulos dentinários, dificultando sua eliminação⁹.

Para a supressão do microrganismo no sistema de canal radicular, o hipoclorito é a solução irrigadora mais utilizada no tratamento de dentes com polpa necrosada e infectada, por apresentar algumas propriedades, como atividade antibacteriana, solvente de matéria orgânica, desodorizante, clareador, lubrificante e detergente^{10,11}. Entretanto, há relatos de processos alérgicos decorrentes de sua utilização, bem como pode causar necrose tecidual em casos de extravasamento acidental, aliado ao fato de deixar sabor residual e odor desagradável. Devido a estes fatores, há a necessidade de se buscarem novas substâncias que atuem como soluções irrigadoras e com ação antimicrobiana. Outras substâncias são utilizadas como auxiliares no tratamento de infecções persistentes; porém, a literatura relata casos de resistência do *Enterococcus faecalis* para diversos antibióticos¹²⁻¹⁴, sendo, portanto, necessárias informações sobre fármacos alternativos.

Diversas substâncias têm sido pesquisadas na intenção de preencher os requisitos de uma solução antimicrobiana ideal^{15,16}. Neste sentido, a biodiversidade consiste numa forte aliada quando se procuram novas substâncias naturais com ação biológica. Pesquisas utilizando esta vertente têm obtido

excelentes resultados, que culminaram na descoberta de novos produtos medicinais^{17,18}.

A própolis vermelha, cuja origem botânica provém da *Dalbergia ecastophyllum*, é encontrada na Região Nordeste do Brasil¹⁹⁻²². Suas propriedades biológicas são atribuídas aos flavonoides e aos ácidos fenólicos^{19,20,22-24}, destacando-se as ações: anti-inflamatória²⁵, citotóxica^{23,24,26}, antiaterogênica²⁷, cicatrizante²⁸, regeneradora de tecido cartilaginoso e pulpar dental²⁹, antioxidante^{19,22,24,30} e antimicrobiana^{19,20,22,30,31}. Esta última ação foi observada contra *Candida albicans*²², *Staphylococcus aureus*^{19,22} e *Staphylococcus mutans*, apresentando resultados positivos, bem como atividade citotóxica.

Estudos recentes apontam que a sua composição química e sua ação biológica são dependentes da vegetação ao redor dos apiários, de onde é coletada pelas abelhas^{19,30}. Devido a estas características peculiares, há a necessidade de caracterização quanto às propriedades físico-químicas e à ação biológica da própolis vermelha coletada na região de Brejo Grande-SE, a fim de proporcionar subsídios para impulsionar o desenvolvimento de comunidades que trabalham neste setor. De acordo com Castro et al.³², em estudo da influência da sazonalidade na atividade antibacteriana da própolis das Regiões Sudeste e Nordeste, ao longo dos períodos de safra apícola estudados, a sazonalidade influenciou a atividade antibacteriana das própolis dos tipos 6 (Região Nordeste) e 12 (Região Sudeste), devido, provavelmente, à alteração na concentração de compostos bioativos oriundos das fontes vegetais destas própolis, demonstrando variação da atividade antibacteriana em função do período de coleta, da sazonalidade.

Neste contexto, o presente estudo objetivou caracterizar e avaliar a eficácia antibacteriana do extrato de própolis vermelha produzida na região norte do Estado de Sergipe sobre cepa de *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212, avaliando esta ação *in vitro*, através do método de halos de inibição e da determinação de concentração bactericida mínima (CBM), bem como em estudo *ex vivo*, avaliando a efetividade de descontaminação de canais radiculares de dentes extraídos.

MATERIAL E MÉTODO

As amostras de própolis vermelha para análise foram coletadas de colmeias de abelhas *Apis mellifera* L., instaladas no apiário Capivaras, em Brejo Grande-SE, Brasil (S 10°26'25''; W 36°26'12''), e armazenadas sob refrigeração. Durante todo o trabalho foi utilizada a mesma amostra para evitar variações ambientais.

O material foi identificado de acordo com a Instrução Normativa nº 3³³, segundo suas características sensoriais (cor, aroma, consistência e presença de materiais estranhos), sua granulometria e requisitos físico-químicos (perda por dessecação e teor de cinzas). Os requisitos físico-químicos foram determinados conforme metodologia descrita na A.O.A.C.³⁴. A perda por dessecação foi realizada submetendo-se a amostra a aquecimento em estufa a 105°C, até apresentar massa constante. A perda por dessecação foi expressa em porcentagem em

relação à massa inicial da amostra. A extração foi realizada por maceração sob agitação constante, durante 24 horas, em temperatura ambiente, utilizando-se 5 g de própolis vermelha em 500 mL de uma solução etanol a 70%. Após evaporação do solvente, obteve-se o extrato seco, sendo o material pesado e o rendimento calculado em relação à massa inicial utilizada e expresso em porcentagem.

O teor de flavonoides no extrato seco foi determinado segundo Adelman³⁷, tendo flavonas e flavonoides expressos como equivalente de quercetina.

Para preparação das diferentes concentrações das soluções de própolis, foi realizada a diluição seriada, obtendo-se tubos com concentrações de própolis entre 1.645 e 34.090 mg/mL. As soluções de própolis vermelha (EEP) utilizadas foram: 1%, 2,5%; 5% e 7,5%, que equivalem a 20, 50, 100 e 150 mg de EEP, respectivamente.

Estudo In Vitro

Para realização do estudo *in vitro*, foram utilizados o teste de halo de inibição e a determinação da concentração bactericida mínima (CBM).

Para a avaliação antimicrobiana, foi utilizado o meio de cultura Ágar Brain Heart Infusion (BHI-ágar)³⁵. Utilizou-se como controle positivo a solução de hipoclorito de sódio a 2,5% e, como controle negativo, a água destilada estéril. A cepa bacteriana de referência utilizada foi proveniente do Laboratório de Materiais de Referência da Fundação Oswaldo Cruz – INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) – *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212.

A cepa liofilizada foi reativada em caldo BHI, obtendo-se uma suspensão das bactérias. Este material foi incubado em anaerobiose, por 48 horas, a 37°C, e a cultura obtida foi semeada em placas contendo BHI ágar³⁶⁻³⁸.

Teste do Halo de Inibição

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis contra a cepa de *Enterococcus faecalis* foi realizada de acordo com métodos descritos anteriormente^{39,40}. Amostras de 30 µL de culturas ativas de *Enterococcus faecalis* foram incubadas por 24 horas, a 37°C, de crescimento; após este período, a turbidez foi ajustada ao tubo 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) por diluição em solução salina. Em seguida, 100 µL do inóculo foram semeados em Placas de Petri contendo BHI ágar³⁵ em duplicata, para posterior análise do halo de inibição. Discos de papel impregnados com 2 µL de solução de própolis com diferentes concentrações foram colocados de forma equidistante nas Placas de Petri contendo BHI ágar, previamente contaminadas com *E. faecalis*. Após 24 horas de incubação em anaerobiose, a 37°C, os resultados foram observados. A massa de própolis em cada disco variou de 20 a 150 mg. As soluções de própolis vermelha (EEP) testadas foram 1%, 2,5%; 5% e 7,5%, que equivalem a 20,

50, 100 e 150 mg de EEP, respectivamente. Discos contendo 50 µg de hipoclorito de sódio a 2,5% e água destilada também foram testados como controles positivo e negativo, respectivamente. A atividade inibitória do EPP foi determinada pela média dos valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco, expressos em milímetros. Este experimento foi realizado em quintuplicata.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da atividade bactericida mínima, foram distribuídos 5,0 mL do caldo BHI em tubos⁴¹ e 4 mL de solução de própolis a 7,5%. Foi realizada a diluição seriada, obtendo-se concentrações de própolis entre 1.645 e 34.090 mg/mL. Foi adicionado, em cada tubo, 1 mL de inóculo bacteriano proveniente de uma cultura de 24 horas, ajustado a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL)³⁶⁻³⁸. Após o período de incubação, 100 µL do inóculo foram transferidos para placas (duplicata) contendo BHI ágar, e estas, incubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas. Em seguida, foi observado o crescimento de colônias nas placas, sendo considerada Concentração Bactericida Mínima (CBM), a menor concentração do produto testado que resultou em menos de sete colônias⁴².

Estudo Ex Vivo

Para o estudo *ex vivo*, foram utilizados 31 dentes humanos unirradiculares, provenientes de banco de dentes. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes, Sergipe, sob registro nº 020707.

Os espécimes selecionados tiveram suas coroas seccionadas por meio de um motor de alta rotação e de broca cilíndrica diamantada número 2135, sob refrigeração. Com o auxílio de uma lima tipo K número 10 (Dentsply/Maillefer), cada canal foi explorado em toda a sua extensão, até que a lima fosse detectada no forame apical. A partir deste comprimento, o instrumento foi recuado um milímetro, a fim de determinar o comprimento de trabalho. Em seguida, foi iniciado o preparo biomecânico pela técnica Crown-Down, confeccionando-se o batente apical com lima tipo K número 50 (Dentsply/Maillefer). O terço cervical foi alargado com brocas Gates-Glidden dois e três (Dentsply/Maillefer). Para a irrigação, foram utilizados 2 mL de solução salina, sendo a irrigação final realizada com 2 mL de EDTA, seguida de 2 mL de água destilada. Após o preparo, as amostras foram impermeabilizadas pela aplicação de cianoacrilato (Super Bonder[®]) na região do forame apical, a fim de impedir a saída da suspensão microbiana; os espécimes foram, então, esterilizados em autoclave, por 20 minutos a 121°C⁴³.

Todos os dentes foram contaminados através da inoculação de 30 µL de cultura ativa de *Enterococcus faecalis*, ajustada ao tubo 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em solução fisiológica. Em seguida, os dentes foram incubados em anaerobiose por 48 horas. Os dentes contaminados foram divididos em três grupos, com dez dentes cada. O grupo 1 foi o grupo tratado com própolis a 7,5%; o grupo 2 foi tratado com solução de hipoclorito de sódio

*Adelman J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante [dissertação mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.

a 2,5%, e o grupo 3 foi utilizado como grupo controle, sendo tratado apenas com salina estéril.

Cada espécime foi inundado por 2 mL da solução testada por 5 minutos e, em seguida, colocou-se um cone de papel estéril número 50 (Cell Pack 2 Série Injecta/MetaBiomed) no conduto radicular de cada espécime, permanecendo este por 5 minutos. Após este período, os cones de papel foram submersos em solução salina (1 mL) e submetido à agitação vigorosa em vortex (Biomixer) por 5 minutos. O material resultante foi distribuído em cinco placas (dois cones por placa) contendo o BHI ágar, sendo então incubados por 72 horas, para verificação do crescimento bacteriano.

RESULTADO

Os resultados obtidos nas análises de caracterização sensorial da própolis vermelha estudada indicam que a amostra apresentou aroma balsâmico característico, cor vermelha intensa e consistência rígida à temperatura ambiente, sendo observada ausência de substâncias estranhas na amostra ou qualquer evidência de abelhas, madeira e vegetais. Quanto à caracterização físico-química, apresentou granulação heterogênea, com fragmentos grandes. Os resultados das análises de teor de cinzas, perda por dessecação, teor de flavonoides e rendimento da própolis do extrato hidroalcoólico podem ser observados na Tabela 1, na qual se verifica que os valores obtidos estão de acordo com os valores de referência da legislação vigente.

O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha foi avaliado quanto à ação antimicrobiana frente ao microrganismo *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212. Os resultados das médias dos halos de inibição estão apresentados na Tabela 2; estes variaram

entre 12 e 16 mm, em função da concentração de extrato seco de própolis vermelha, que variou de 20 a 150 mg por disco teste. A solução teste com 150 mg de própolis foi a que apresentou o maior halo de inibição (16 mm), sendo que as demais soluções de própolis tiveram o mesmo halo de inibição que a solução de hipoclorito de sódio utilizada como controle positivo (12 mm).

A concentração inibitória mínima (CIM) da solução de própolis a 7,5% para o crescimento de *E. faecalis* foi 18.000 mg/mL e a concentração bactericida mínima (CBM) foi 34.090 mg/mL.

A partir dos resultados obtidos com o teste de inibição, foi utilizada a solução hidroalcoólica de própolis a 7,5% na concentração de 34.090 mg/mL, para os ensaios *ex vivo*. Os resultados obtidos, neste ensaio, mostram que não houve crescimento de microrganismo quando se utilizou o extrato de própolis a 7,5% ou a solução de hipoclorito de sódio a 2,5% como solução irrigadora nos dentes infectados (Tabela 3).

Cada experimento foi conduzido com o material proveniente de duas espécimes dentárias.

DISCUSSÃO

O reconhecimento da etiologia microbiana das infecções endodônticas estimulou a busca de avanços farmacológicos e técnico-científicos, a fim de facilitar a identificação de novas condutas terapêuticas, melhorando as perspectivas, especialmente no que se refere ao controle microbiano no canal e nos tecidos periapicais. A seleção da cepa bacteriana desta pesquisa baseou-se na observação de que, na maioria das vezes, o fracasso no tratamento endodôntico está relacionado à presença de *E. faecalis*^{44,45}.

Tabela 1. Caracterização físico-química da própolis vermelha e do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha da região de Brejo Grande-SE

Parâmetro estudado	Média ± Desvio Padrão	Requisitos do Ministério*
Teor de cinzas	4,39 ± 0,67	Máximo de 5%
Perda por dessecação	6,47 ± 1,31	Máximo de 8%
Flavonoides totais	1,87 ± 0,26	Mínimo de 0,25%
Rendimento	43,5	Mínimo de 35%

*Valores de referência de acordo com a legislação vigente (Brasil, 2001)³³.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos halos de inibição (em mm) das soluções de própolis vermelha (EEP), hipoclorito de sódio e água destilada contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Solução testada	Massa aplicada (µg)	Média ± Desvio Padrão*
EEP 1%	20	12±1,92
EEP 2,5%	50	12±0,89
EEP 5%	100	12±0,89
EEP 7,5%	150	16±2,68
NaOCl 2,5%	50	12±1,67
Água destilada	-	0

*Valores médios ± desvio padrão.

Tabela 3. Avaliação do crescimento de *E. faecalis* em espécimes dentárias explantadas (n=10), após o tratamento com as soluções EEP, NaOCl ou salina

Soluções	D1 e D2	D3 e D4	D5 e D6	D7 e D8	D9 e D10
EEP 7,5%	-	-	-	-	-
NaOCl 2,5%	-	-	-	-	-
Salina	-	+	+	+	+

EEP = extrato etanólico de própolis vermelha; NaOCl = hipoclorito de sódio; (-) ausência de crescimento de *E. faecalis*; (+) crescimento de *E. faecalis*; D = espécime dentária explantada, contaminada com *E. faecalis* e posteriormente tratada.

Os resultados obtidos nas análises de cinzas e de perda por dessecação indicam conformidade com a legislação brasileira, sendo que o parâmetro de teor de flavonoides a enquadrar como própolis com teor médio de flavonoides³³. A perda por dessecação a 105°C demonstra o teor de umidade presente na amostra. Neste caso, amostras com alto teor de umidade podem ser menos estáveis e dificultar sua manutenção durante estocagem.

Após a evaporação do solvente, observou-se um rendimento de flavonoides de cerca 1,87% no processo de extração dos constituintes da própolis. O rendimento da extração apresentou-se maior do que o valor preconizado pela legislação. A evaporação do solvente, muitas vezes, se torna difícil devido à característica resinosa e higroscópica do material, podendo gerar uma massa maior e, conseqüentemente, alterar o valor do rendimento. Porém, foi evidenciada, durante o experimento, a alta solubilidade do produto no solvente utilizado, demonstrando que o rendimento esperado da extração é alto.

Os flavonoides foram extraídos utilizando-se uma solução hidroalcoólica a 70%, pois, em estudos prévios, verificou-se ser este o solvente com melhor potencial de extração. Os resultados desta extração classificam esta própolis como de médio teor de flavonoides, segundo a legislação brasileira¹⁵.

Entretanto, o teor de flavonoides e o rendimento podem ser influenciados não somente pela biodiversidade de onde esta própolis foi coletada, mas também pelo método de extração aplicado. Em estudo anterior³⁶, foi aplicada a extração a frio utilizando-se solução hidroalcoólica a 70%, por ser esta condição a que proporciona o melhor rendimento de flavonoides. Os flavonoides são os principais marcadores químicos encontrados na própolis e diversos autores já relatam sua relação com diversas atividades biológicas³².

As condições de extração também influenciam na ação biológica, sendo que alguns estudos apontam que a própolis verde apresenta potencial antimicrobiano contra *E. faecalis*, podendo ser utilizada como medicamento intracanal²⁹.

Para se avaliar o potencial dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha, primeiramente foi avaliada a ação antimicrobiana pela presença de halos de inibição. Conforme Fontana et al.⁴⁶, a metodologia de difusão em disco em meio sólido, apesar de limitada pela solubilidade dos compostos testados, permite a detecção de várias amostras simultaneamente, em uma mesma Placa de Petri. Pela simplicidade desta metodologia, a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis foi testada através do método de difusão em disco.

Pode-se verificar que a solução a 7,5% de própolis (150 mg) foi a concentração que apresentou maior halo de inibição (16 mm). O hipoclorito de sódio a 2,5%, bem como as demais concentrações testadas, apresentaram halos de inibição próximos a 12 mm.

Esta solução foi utilizada como controle positivo por ser o composto químico com melhor espectro de ação e baixo custo, aplicado como solução irrigadora no tratamento endodôntico.

Este resultado demonstra que a solução de própolis, mesmo em concentrações mais baixas, pode ter ação comparada à do hipoclorito de sódio, o qual, neste experimento, foi utilizado como controle positivo. No trabalho de Dotto et al.³⁷, os resultados mostraram halos de inibição variando de 0 a 13,5 mm, dependendo do tipo de medicamento utilizado contra cepa de *E. faecalis* - ATCC 29212, de forma semelhante ao estudado em nosso trabalho, demonstrando que a própolis vermelha apresenta um maior potencial inibidor do que as soluções testadas.

Em estudo anterior⁴⁷, a própolis vermelha apresentou concentração inibitória mínima de 50 mg/mL contra o *E. faecalis* - ATCC 29212, indicando atividade antibacteriana desta variedade de própolis.

No estudo de Ferreira⁴⁸, a concentração bactericida mínima da própolis verde, para anaeróbios, como *Clostridium perfringens* e *Actinomyces israelii*, e para *Prevotella intermedia*, foi de 25 mg/mL, 6,25 mg/mL e 6,25 mg/mL, respectivamente. Os resultados mostraram que a concentração de própolis vermelha é maior do que 18 mg/mL, porém, na concentração de 34,09 mg/mL, inibiu totalmente o crescimento da cepa de *E. faecalis*.

Aliado aos resultados da ação bactericida, foi realizada a avaliação destas substâncias através de estudos *ex vivo*. Menezes et al.⁴³ avaliaram a efetividade do hipoclorito de sódio e da clorexidina, bem como de medicamentos utilizados como curativo de demora contra cepas de *Cândida albicans* e *Enterococcus faecalis* em dentes extraídos. Esses autores concluíram que a pasta de hidróxido de cálcio associada ao paramono-cloro-fenol-canforado foi o medicamento de demora mais efetivo na eliminação dos dois microrganismos e que a solução de clorexidina a 2,0% foi mais efetiva do que a de hipoclorito de sódio a 2,5% contra o *Enterococcus faecalis*.

No presente estudo, pode-se observar que houve a inibição total do *E. faecalis* utilizando-se massa igual a 150 mg do produto;

**Ferreira FBA. Estudo in vitro do efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis e de outros medicamentos usados em endodontia sobre microrganismos anaeróbios [dissertação mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru da USP; 1999.

porém, provavelmente pela alta concentração do extrato, verifica-se a alteração cromática dos espécimes dentários estudados, o que pode ser considerado um grande inconveniente. Outros estudos devem ser feitos com concentrações menores, para verificar a sua efetividade sem provocar manchas nos dentes. Outros parâmetros, como toxicidade aos tecidos pulpares e estabilidade do produto, bem como a viabilidade econômica, devem ser avaliados.

CONCLUSÃO

A própolis vermelha, coletada na região de Brejo Grande-SE, apresenta características de identidade e qualidade compatíveis com os parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, e apresentou comprovada efetividade contra *E. faecalis*, podendo, com estudos mais aprofundados, se transformar em um valioso auxiliar no tratamento endodôntico.

REFERÊNCIAS

1. Tanriverdi F, Esener T, Erganiş O, Belli S. An in vitro test model for investigation of disinfection of dentinal tubules infected with *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J*. 1997; 8(2): 67-72. PMID:9590928.
2. Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2005 January; 31(1): 53-6. PMID:15614008.
3. Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol*. 1987 April; 3(2): 58-63. PMID:3472880.
4. Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, et al. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod*. 2011 January; 37(1): 80-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.10.004>. PMID:21146083.
5. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J*. 2012 April; 45(4): 363-71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01985.x>. PMID:23134158.
6. Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod*. 2012 July; 38(7): 948-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.007>. PMID:22703659.
7. Herrera DR, Tay LY, Rezende EC, Kozlowski VA Jr, Santos EB. In vitro antimicrobial activity of phytotherapeutic *Uncaria tomentosa* against endodontic pathogens. *J Oral Sci*. 2010 September; 52(3): 473-6. PMID:20881342.
8. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002 March; 35(3): 221-8. PMID:11985673.
9. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 August; 18(4): 234-9. PMID:12823799.
10. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod*. 2009 May; 35(5): 711-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.01.018>. PMID:19410089.
11. Siqueira EL, Nicoletti MA, Bombana AC, Santos M. Influência do pH sobre a estabilidade química da solução de hipoclorito de sódio a 0,5%. *RPG. Rev Pós-Grad*. 2002 July/September; 9(3): 207-11.
12. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 October; 15(5): 309-12. PMID:11154422.
13. Noda M, Komatsu H, Inoue S, Sano H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exudate of persistent apical periodontitis. *J Endod*. 2000 April; 26(4): 221-4. PMID:11199722.
14. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 April; 18(2): 100-3. PMID:12654099.
15. Albuquerque ACL, Pereira MSV, Silva DF, Pereira LF, Viana FAC, Higino JSV, et al. The anti-adherence effect of *Lippia sidoides* Cham. Extract against microorganisms of dental biofilm. *Rev Bras Plantas Med*. 2013; 15(1): 41-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000100005>.
16. Costa EMMB, Barbosa AS, Arruda TA, Oliveira PT, Dametto FR, Carvalho RA, et al. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *J Bras Patol Med Lab*. 2010; 46(3): 175-80. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442010000300004>. [online]
17. Butler MS, Newman DJ. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. *Prog Drug Res*. 2008; 65: 1, 3-44. PMID:18084912.
18. Schmitt EK, Moore CM, Krastel P, Petersen F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. *Curr Opin Chem Biol*. 2011 August; 15(4): 497-504. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.018>. PMID:21684800.
19. Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol*. 2007 September; 113(2): 278-83. PMID:17656055
20. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008 December; 5(4): 435-41. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem057>. PMID:18955226.
21. Sforzin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011 January; 133(2): 253-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>. PMID:20970490.

22. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006 June; 3(2): 249-54. PMID:16786055
23. Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg Med Chem*. 2008 January; 16(1): 181-9. PMID:17950610
24. Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*. 2013 February; 52: 137-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>. PMID:23174518.
25. Ledón N, Casacó A, González R, Merino N, González A, Tolón Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacologia Sinica*. 1997 May; 18(3): 274-6.
26. Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem*. 2008 May; 16(10): 5434-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2008.04.016>. PMID:18440233.
27. Daleprane JB, Freitas VS, Pacheco A, Rudnicki M, Faine LA, Dörr FA, et al. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J Nutr Biochem*. 2012 June; 23(6): 557-66.; published online July 20, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.02.012>. PMID:21764281.
28. de Almeida EB, Cordeiro Cardoso J, Karla de Lima A, de Oliveira NL, de Pontes-Filho NT, Oliveira Lima S, et al. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *J Ethnopharmacol*. 2013 May; 147(2): 419-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.031>. PMID:23542143.
29. Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 November; 104(5): 709-16. PMID:17964476.
30. Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar SM, Ikegaki M, et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim Nova*. 2009; 32(6): 1523-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600031>.
31. Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric*. 2011 October; 91(13): 2363-70. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4468>. PMID:21590778.
32. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL, Alencar SM, Ikegaki M, Duarte S, et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim Nova*. 2007; 30(7): 1512-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000700003>.
33. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA. Instrução Normativa Nº 3, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Brasília: Ministério da Agricultura; 2001. D.O.U. de 23/01/2001. Seção I, p. 18-23.
34. Cunniff P, editor. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997.
35. McBride SM, Fischetti VA, Leblanc DJ, Moellering RC Jr, Gilmore MS. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*. 2007; 2(7): e582. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000582>. PMID:17611618.
36. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J*. 1999 March; 32(2): 99-102. PMID:10371903.
37. Dotto SR, Travassos RMC, Ferreira R, Santos R, Wagner M. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. *Rev Odonto Ciênc*. 2006 July/September; 21(53): 266-9.
38. Parekh J, Chanda S. In vitro antibacterial activity of the crude methanol extract of *Woodfordia fruticosa* Kurz. Flower (Lythraceae). *Braz J Microbiol*. 2007; 38(2): 204-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200004>.
39. Kim J, Marshall MR, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *J Agric Food Chem*. 1995; 43(11): 2839-45. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00059a013>.
40. Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial activity of mint essential oils. *J Agric Food Chem*. 1995; 43(9): 2384-8. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00057a013>.
41. Fernandes Júnior A, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*. 2006 January/February; 36(1): 294-7.
42. Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual de microbiologia clínica. 4. ed. Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana; 1987.
43. Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*. 2004 May; 37(5): 311-9. PMID:15086752.
44. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006 February; 32(2): 93-8. PMID:16427453.
45. Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod*. 2006 August; 32(8): 722-6. PMID:16861069
46. Fontana JD, Adelman J, Passos M, Maraschin M, Lacerda CA, Lanças FM. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. *Methods in Biotechnology*. 2004; 16: 203-18. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-765-3:203>.
47. Araújo KCS, Marcucci MC. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. *Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica*. 2011; 3(1): 9-14.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

*AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Juliana Cordeiro Cardoso, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, UNIT – Universidade Tiradentes, Avenida Murilo Dantas, 300, Farolândia, 49032-490 Aracaju - SE, Brasil, e-mail: juliana@itp.org.br

Recebido: Novembro 13, 2013

Aprovado: Julho 16, 2014