

ANDRÉA CARLA FRANCHINI MELANI

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera*
SOBRE *Enterococcus faecalis*: ESTUDO *in vitro* e *ex vivo***

CAMPO GRANDE
2009

ANDRÉA CARLA FRANCHINI MELANI

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera*
sobre *Enterococcus faecalis*: ESTUDO *in vitro* e *ex vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Zárate

CAMPO GRANDE
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDRÉA CARLA FRANCHINI MELANI

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* SOBRE
Enterococcus faecalis: ESTUDO *in vitro* e *ex vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____ .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

AGRADECIMENTOS

- A **Jesus**, meu Pai, Amigo e Conselheiro que sempre se dispõe à conversar comigo e faz-me sentir tão fortemente a Tua Presença.

- À **Minha Maria Santíssima**, que me cobre com o seu Manto Sagrado, acalenta e protege, sem o qual seria impossível superar todas as adversidades.

- Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**.

- Ao **Prof. Ms. Odair Pimental Martins**, do Laboratório de Microbiologia da UFMS, pelas horas dispensadas em meu auxílio, pela paciência e por lembrar-me que a Ciência é uma caixa de surpresas, favoráveis ou não, mas havendo empenho e dedicação, o trabalho será reconhecido.

- Ao **Prof. Ms. Joaquim Corsino** do Departamento de Química da UFMS, pela valiosa colaboração no processamento da própolis.

- Aos técnicos dos laboratórios de Engenharia, Microbiologia e Química da UFMS.

- Ao **Prof. Dr. Danilo Guerisoli**, pelo empréstimo de material para a realização da parte experimental desse estudo.

- Aos meus amigos da pós-graduação **Alessandro de Carli**, **Fabiano Regalado** e **Achilles Parma Neto** pela amizade e força recebidas.

- Ao Prof. **Edilson Zafalon**, obrigada pelo companheirismo e também pelo socorro em informática.

- Ao amigo **Rogério Becegato** pelo apoio incondicional em todos esses anos de convivência e por me suportar nos dias de mau humor.

- À **Professora Dr^a. Catarina Prado**, obrigada por todos esses anos de convívio e aprendizado sobre a doação do amor incondicional.

- A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta na execução desse trabalho.

- À amiga do coração **Valéria Rodrigues de Lacerda** pela acolhida carinhosa e pela verdadeira amizade que se fez entre nós. Minha vida ficou mais alegre depois que te conheci. Você vai fazer falta no meu dia-a-dia.

- À amiga **Ana Paula Pinto de Souza**, em cujo coração pude depositar as minhas alegrias e tristezas e de quem só ouvi palavras de apoio e compreensão. Amiga, que progresso espiritual partilhar da tua companhia nessa atual jornada.

- Ao querido **Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana**, exemplo de pessoa humana e dedicada em servir ao próximo. Sem a tua intervenção, talvez esse momento não estivesse acontecendo hoje de maneira tão especial. Deixo registrada a minha

grande admiração e externo a minha felicidade pela tua participação nesse momento tão importante.

- À amiga e irmã **Cibele Bonfim de Rezende Zárte**, sem a qual esse momento não seria possível. Você foi o meu porto seguro, onde pela primeira vez vi-me tão longe de todos os meus familiares para começar um novo desafio em minha vida aos 30 anos de idade. Lembro do nosso primeiro encontro, a dúvida em tua face sobre o motivo da minha chegada a Campo Grande e a dúvida maior quanto à minha permanência. Entretanto, recebi a tua acolhida discreta e protetora. Aos poucos, senti na tua simplicidade uma pessoa absolutamente inteligente, sensata e admirável. Não tenho como descrever o prazer de assistir a uma aula tua e aprender junto com os alunos. Você reflete coerência e ética. Sou grata a você por proporcionar a mim o privilégio da tua amizade, por acreditar que eu posso chegar mais longe e me apoiar e ajudar nessa caminhada, pela preocupação com o meu bem-estar e até pelas broncas que recebo de vez em quando. Não existem palavras suficientes para expressar todo o amor que sinto por você e pela sua família. Na minha inquietude, estou à busca de novos desafios. Mas, amiga querida: a distância entre nós não existe já que você estará sempre no meu coração, aonde quer que eu esteja.

- Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Zárte** pela coerência e paciência ao longo dessa trajetória. Obrigada pela mão firme na condução da sua aluna, pois isso foi importante para o meu amadurecimento também. Credito a você uma grande parte do meu progresso profissional, pois observo como se dedica com amor à profissão que abraçou e tento fazer disso o meu espelho. Ao amigo **Paulo**, o agradecimento maior, pelo afeto, pela acolhida, pelo convívio carinhoso e sincero. Desculpe, se em alguns momentos não pude corresponder às suas expectativas, mas saiba que ainda estou me esforçando para isso, querido amigo! Conte sempre comigo, em qualquer circunstância. Um abraço carinhoso e fraterno.

Quando me amei de verdade, parei de desejar que a minha vida fosse diferente e comecei a ver que tudo o que acontece contribui para o meu crescimento.

Hoje chamo isso de... Amadurecimento.

Quando me amei de verdade, comecei a perceber como é ofensivo tentar forçar alguma situação ou alguém apenas para realizar aquilo que desejo, mesmo sabendo que não é o momento ou a pessoa não está preparada, inclusive eu mesmo.

Hoje sei que o nome disso é... Respeito.

Quando me amei de verdade, desisti de querer sempre ter razão e, com isso, errei muitas menos vezes.

Hoje descobri a... Humildade.

Quando me amei de verdade, percebi que minha mente pode me atormentar e me decepcionar. Mas quando a coloco a serviço do meu coração, ela se torna uma grande e valiosa aliada.

Tudo isso é... Saber viver!

(Charles Spencer Chaplin)

RESUMO

Melani ACF. Atividade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* sobre *Enterococcus faecalis*: estudo *in vitro* e *ex vivo*. Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O tratamento endodôntico pode não produzir a cura dos tecidos periapicais, levando a periodontite apical persistente causada principalmente pela bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*. O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, uma solução hidroalcoólica de própolis verde de *Apis mellifera* quanto sua ação antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), e compará-la com uma solução de hidróxido de cálcio. A atividade antimicrobiana foi verificada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), obtida pelo método da microdiluição. A comparação entre solução hidroalcoólica de própolis e hidróxido de cálcio foi realizada pela avaliação da capacidade das soluções em inibir o crescimento da bactéria em condutos radiculares de pré-molares extraídos por indicações diversas. Os resultados revelaram ação antimicrobiana da solução de própolis com CIM de 4,23mg/mL (0,04%). Na fase *ex vivo*, a própolis a 0,16% foi significativamente superior ($p < 0,01$) ao hidróxido de cálcio a 10%, na inibição do *Enterococcus faecalis*. Concluiu-se que a própolis de *Apis mellifera* apresenta capacidade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, sendo sua ação superior ao hidróxido de cálcio.

Palavras-chave: própole; bactérias Gram-positivas; controle de infecções dentárias.

ABSTRACT

Melani ACF. Antibacterial effectiveness of propolis from *Apis mellifera* against *Enterococcus faecalis*: *in vitro* and *ex vivo* study. Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Endodontics treatment procedures do not invariably produces satisfactory healing of the periapical tissues leading to the apical persistent periodontitis caused by aetiological agentes of endodontic origin, particularly *Enterococcus faecalis*. The aim of this work was to evaluate, *in vitro*, the effectiveness of hidroalcoholic extracts of green propolis from *Apis mellifera* against *E. faecalis* (ATCC 29212) in comparison to calcium hydroxide. Antimicrobial activity was determined by MIC (minimal inhibitory concentration) through the microdilution method. The criteria of comparison was determined by the ability of the solutions in inhibit the bacterial growing of single extracted pre-molars root canals. The MIC obtained was 4.23mg/mL (0.04%). *Ex vivo* phasis, showed significative results from hidroalcoholic solution of propolis 0.16% ($p < 0.001$) than calcium hydroxide 10% against *E. faecalis*. It can be concluded that the propolis' solution showed antimicrobial effectiveness against *E. faecalis* revealing better activity than calcium hydroxide.

Key-words: propolis; Gram-positive bacteria; infection control dental.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Replicador de Steer. A seção transversal de 3mm, assinalada pelo círculo corresponde á área que carrega 10^4 bactérias a serem semeadas..... 41
- Figura 2 - Microplacas de poliestireno com poços em U e placas de ágar sangue com crescimento bacteriano..... 41
- Figura 3 - Raízes dentárias após preparo. Em A – após a colocação do inóculo bacteriano (10^6 bactérias). Em B, sendo colocadas as soluções testadas.....42
- Figura 4 - Espécimes após colocação do inóculo e das soluções, vedados com Coltosol®43
- Figura 5 - Verificação da ausência/presença de turvação nos diferentes grupos.....43
- Figura 6 - Inibição de *Enterococcus faecalis* nos condutos radiculares tratados pelas diferentes soluções. *Diferença significativa em relação ao hidróxido de cálcio e própolis a 0,16% (teste z, $p<0,05$).....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATCC	American type culture collection
BHI	Brain heart infusion
BHY	Brain heart infusion yeast
BSA	Albumin bovin serum
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLFR	Cromatografia líquida de fase reversa
DMSO	Dimetil-sulfóxido
EEP	Extrato etanólico de própolis
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EP	Extrato de própolis sem etanol
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
g	Grama
GTF	Glicosiltransferase
GS/MS	Espectrometria de massa gasosa
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
JH	Jacob & Hobbs 1974
SP	São Paulo
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitros
MH	Mueller-Hinton
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH.	Hidróxido de sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NTCC	National type culture collection

nm	Nanômetro
PA	Pró-análise
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potencial hidrogênionico
PMCC	Paramonoclorofenol canforado
PRP	Paramonoclorofenol canforado, rinosoro, polietileno glicol400
TSB	Tryptone soy broth
TSBY	Trypticase soy broth yeast
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
USA	United States of America

LISTA DE SÍMBOLOS

% Percentagem

°C Graus Celsius

DEDICATÓRIA

Acredito que trazemos dentro de nós compromissos que necessitamos cumprir na escalada de nossa evolução espiritual. Estando aqui no planeta Terra, podemos usar o nosso Livre Arbítrio para cumpri-los ou não. No ano de 1999, vislumbrei que chegara o momento de fazer cumprir alguns desses compromissos e hoje entendo que a minha mudança para Campo Grande tinha um motivo maior. Durante a minha estada, tive momentos felizes, de emoção, de comoção, de raiva, de frustração, de incerteza, mas no final dessa jornada, apesar das inevitáveis cicatrizes, sinto-me fortalecida e serena. Agora, a minha bússola pessoal me direciona para outros horizontes.

Dedico este trabalho aos meus pais, Marilza e Carlos, que não mediram esforços na minha formação pessoal e profissional, e fizeram tudo para que eu concretizasse todos os meus sonhos externados.

Pai, obrigada por não pedir a mim grandes explicações e apoiar as minhas decisões, mesmo que você me julgue insensata em alguns momentos.

Mãe, obrigada pelo seu amor incondicional. Você tem a capacidade maravilhosa de saber o que vai pelo meu coração.

Meninas, vocês são a inspiração para eu continuar essa caminhada, retirando todos os obstáculos que possam aparecer no meu caminho!

Amo e sempre amarei vocês!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Própolis: considerações históricas e conceituais	17
2.1.1 Composição química.....	17
2.1.2 Atividade antimicrobiana.....	20
2.1.3 Estudos na Odontologia.....	21
2.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	28
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAL E MÉTODO	36
4.1 Aspectos éticos.....	36
4.2 Obtenção do extrato puro da própolis.....	36
4.3 Processamento dos espécimes dentários.....	36
4.4 Cultura microbiana.....	37
4.5 Testes de atividade antimicrobiana.....	37
4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima.....	38
4.5.2 Teste de atividade antimicrobiana ex vivo.....	38
4.6 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução da Endodontia, várias substâncias têm sido empregadas como soluções irrigadoras ou medicação intra-canal, com o propósito de coibir o metabolismo bacteriano no interior dos canais radiculares, uma vez que as condições adequadas de antissepsia possibilitam o sucesso do tratamento na ordem de 95% (REIT, 1987; SUNDQVIST *et al.*, 1998). Isso significa que a infecção persistente torna-se um obstáculo à terapia endodôntica.

As investigações sobre a persistência da infecção nos tecidos apicais mostram que poucos microrganismos são capazes de sobreviver nessas regiões. Nesse aspecto, a bactéria *Enterococcus faecalis* merece especial atenção, pois é apontada por ser responsável por cerca de um terço das lesões periapicais (MOLANDER *et al.*, 1998). Sua habilidade em resistir à terapêutica endodôntica instiga os pesquisadores na busca por um medicamento capaz de eliminar sua viabilidade.

Essa questão somente vem a enfatizar sobre os requisitos da medicação intra-canal, que dentre suas propriedades, deve ser capaz de combater os microrganismos localizados no interior dos canais radiculares, além de neutralizar os produtos tóxicos residuais do preparo biomecânico. Assim sendo, face ao caráter polimicrobiano das infecções endodônticas, essa medicação deve possuir amplo espectro (LEONARDO, 1999), visto que a infecção persistente nos sistemas de canais radiculares é causa de insucesso da terapia endodôntica.

Uma das substâncias mais indicadas para esse fim é o hidróxido de cálcio, bactericida devido ao seu elevado pH. Porém, o *Enterococcus faecalis*, segundo Love (2001) e Evans *et al.* (2002), é resistente também a essa medicação. Essa resistência deve-se a produção de enzimas histolíticas como a colagenase, hialuronidase e fibrolisina, que têm como substratos específicos, componentes teciduais do hospedeiro, além da ativação do mecanismo da bomba de prótons.

A busca por uma medicação capaz de debelar uma infecção, ainda que local, não é exclusividade da Endodontia, obviamente. Paralelos a essa conjuntura, os estudos sobre substâncias naturais com propriedades antimicrobianas têm se intensificado nas duas últimas décadas. Dentre essas, a própolis, substância produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, tem mostrado resultados interessantes quanto às suas propriedades farmacológicas, anestésica,

antiinflamatória e antibacteriana (SILVA *et al.*, 2004), inclusive contra o *Enterococcus faecalis*, conforme investigaram Oncag *et al.*, em 2006.

Na Odontologia, os estudos sobre a própolis iniciaram no início da década de 90, com o trabalho de Ikeno e Myazawa (1991). Desde então, a ação antimicrobiana dessa substância tem sido avaliada contra patógenos causadores da cárie dentária, doença periodontal e infecções fúngicas, além das propriedades terapêuticas já mencionadas. Entretanto, são escassos os estudos na Endodontia, especialmente nas situações de infecções refratárias. Assim sendo, este estudo *in vitro* tem o propósito de avaliar a ação da própolis de *Apis mellifera* sobre o *Enterococcus faecalis*, importante agente dessas infecções. Nesse sentido, contribui essa investigação com o aprimoramento do uso terapêutico de substâncias naturais e com o enfrentamento dessa grave situação clínica no tratamento endodôntico.

Baseado em estudos anteriores que mostram o largo espectro microbiano, levanta-se a hipótese de que a própolis apresente ação eficaz contra o *Enterococcus faecalis* em concentrações viáveis aos tecidos periapicais, possibilitando, *a posteriori*, que estudos *in vivo* indiquem seu uso em âmbito clínico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Própolis: considerações históricas e conceituais

A própolis é uma substância de composição complexa, formada por material gomoso e balsâmico, coletada pelas abelhas dos brotos, exsudatos de árvores e outras partes do tecido vegetal modificado na colméia por adição de secreções salivares (MARCUCCI, 1996).

Aristóteles recomendava o uso da própolis para o tratamento de abscessos e feridas; os soldados romanos utilizavam-na para aplicação em ferimentos de guerra; um compósito proveniente de própolis e vaselina também foi utilizado durante a 2ª Guerra Mundial. Na década de 50 e 60, nos países do bloco soviético, Bulgária, Polônia e Czechoslovakia, a própolis começou a ganhar a admiração no tratamento de problemas de saúde, como otites, amidalites e asma brônquica. A popularidade dessa substância nos países do oeste europeu, América do Norte e do Sul, só ocorreu por volta dos anos 80 (MATSUNO, 1997).

As propriedades biológicas e químicas da própolis são conhecidas, porém, a sua utilização terapêutica ainda é incipiente. A explicação reside na variabilidade de sua composição química em função de sua origem geográfica, visto que em diferentes ecossistemas - principalmente em regiões tropicais - as abelhas recorrem a distintas espécies vegetais como fontes de matérias-primas empregadas em sua elaboração (BANKOVA *et al.*, 2000).

Pereira *et al.* (2002), numa retrospectiva sobre os 100 anos de pesquisas da própolis e suas perspectivas futuras, informaram que em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre a própolis que evidenciava as suas propriedades químicas e composição. Esse estudo está indexado no *Chemical Abstracts* através da referência nº192 e que em pouco mais de 90 anos, o número de trabalhos publicados ultrapassou a marca de 450. No Brasil, a primeira patente da própolis surgiu em 1995 para o uso em tratamento odontológico na prevenção de cáries e gengivites, sob o nº BR 9503177.

2.1.1 Composição química

Pelo menos 200 componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origens diversas, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis, di-hidroflavonóis, etc.), terpenos, b-esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (GREENAWAY *et al.*, 1991; MARCUCCI *et al.*, 1996).

Um dos primeiros estudos utilizando espectrometria de massa gasosa (GS/MS) analisou quatro amostras de própolis provenientes de diferentes regiões do Brasil obtidas através da extração em etanol a 70%. Os resultados revelaram a presença em grande quantidade dos seguintes componentes: terpenóides, ácido cumarínico e sesquiterpenos (BANKOVA *et al.*, 1995).

Koo e Park (1996) encontraram flavonóides com concentrações variáveis em diferentes amostras de própolis brasileira. Não obstante tenham atribuído as propriedades farmacológicas da própolis à presença desse composto, os autores salientaram que a análise quantitativa do teor do composto não foi suficiente para determinar a qualidade dos extratos analisados.

Park *et al.* (1997) analisaram a própolis coletada de colméia de *Apis mellifera*, proveniente de sete estados brasileiros: Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Através da cromatografia líquida de fase reversa (CLFR), encontraram altas concentrações de flavonóides, embora houvesse diferença desse valor dependendo do estado de origem. A concentração total de flavonóides da própolis de Mato Grosso do Sul foi de aproximadamente 12,5mg/g de própolis e os derivados de flavonóides mais encontrados foram a quercitina, apigenina, sacuranetina e crisina. Segundo os autores, a ecologia vegetal do meio ambiente influenciou na determinação dos componentes da própolis e devido a essa diversidade, é necessário o estudo prévio dos componentes da mesma para possibilitar sua aplicação terapêutica.

Park *et al.* (2002) afirmaram que o melhor indicador da origem botânica da própolis é a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal. A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, aliada à fenologia hospedeira, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica.

As análises de Kumazawa *et al.* (2003), através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), constataram a presença de polifenóis e flavonóides em

extrato etanólico de própolis (EEP) oriundas da Argentina, Austrália, Brasil, Bulgária, Chile, China, Hungria, Nova Zelândia, África do Sul, Tailândia, Ucrânia, Uruguai, Estados Unidos e Uzbesquistão. Os resultados revelaram que os menores valores de polifenóis e flavonóides foram encontrados nas amostras da Tailândia (31,2mg/g) e que os valores de polifenóis da própolis brasileira (120mg/g) foram menores em relação à búlgara (220mg/g) e chinesa (299mg/g). A justificativa para os valores dos diferentes teores desses componentes foi a proveniência da região da coleta, por conta da diversidade de sua flora ecológica. Cabe ressaltar que apenas na própolis brasileira foi encontrado o artepelin-C (43,9mg/g).

A proposição de Kosalec *et al.* (2005) foi avaliar a quantidade de flavonóides em dez marcas comerciais de soluções etanólicas de própolis provenientes da Croácia, cujas concentrações variaram entre 7 a 25%, segundo informação dos fabricantes. Através de dois métodos colorimétricos, verificaram a presença de flavonas, flavonóis e flavanonas nas seguintes proporções: 0,14 a 0,41%, 0,43 a 18,78% e 6,45 a 10,0%, respectivamente. Devido à variação encontrada, os autores afirmaram que a qualidade comercial dessas requereria maior verificação e que esses valores poderiam ser resultado das amostras provenientes de regiões diferentes do país.

Também foram identificados terpenóides, compostos fenólicos, substâncias serosas e quinino nos estudos de Salatino *et al.* (2005). Dos compostos fenólicos, chamou a atenção dos autores a presença do artepelin C - composto que tem atividade antitumoral - bem como a presença da dehydrocostus lactona C, um derivado terpenóide de ação antimicobacteriana e tripanocida. Devido à presença de tantos elementos nessa amostra, os autores afirmaram que a composição da própolis é muito complexa, e que é necessário estabelecer padrões para a própolis de diferentes regiões, embora seja uma substância relevante para a utilização terapêutica devido ao grande arsenal de elementos farmacológicos de que dispõe. As abelhas no Brasil costumam coletar material de toda a vizinhança da colméia, como alecrim, eucalipto, pinus, cana-de-açúcar e laranjeiras, porém, seria prematuro concluir que uma certa espécie de planta prevaleça sobre a outra na composição da própolis.

Trusheva *et al.* (2006), através da ressonância nuclear magnética e espectrometria de massa, identificaram na própolis vermelha do estado de Alagoas (Brasil), 16 componentes tais como fenóis simples, triterpenóides, isoflavonóides,

benzoquinonas e epóxido de naftoquinona, esse último isolado pela primeira vez de um composto natural. Os dados da própolis vermelha brasileira foram publicados pela primeira vez nesse trabalho, uma vez que essa variedade comumente é encontrada na região de Cuba e da Venezuela, e a própolis mais comumente encontrada no Brasil é a do tipo verde. Nesse estudo, a própolis vermelha demonstrou atividade contra *Candida albicans* em decorrência da presença de isoflavonóides e a mistura de benzofenonas demonstrou atividade contra *Staphylococcus aureus*, confirmando as suas propriedades antimicótica e antibacteriana.

2.1.2 Atividade antimicrobiana

Cowan, em 1999, numa revisão sistemática, enumerou os principais elementos antimicrobianos encontrados na natureza e a sua ação contra diferentes microrganismos. Verificou que os fenóis e polifenóis são eficazes contra vírus, bactérias e fungos; quinonas comportam-se como intermediadoras da síntese de melanina; as flavonas, flavononas e flavonóis são ativos contra microrganismos por sua capacidade de agir na parede celular dos mesmos dissolvendo a parte lipofílica. O autor ainda relatou que os t-terpenóides e terpenos estão sendo utilizados no combate à malária e que o t-terpenóide betulínico mostrou-se eficaz na inibição do HIV, embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado. Os alcalóides mostraram-se excelentes microbicidas contra *Giardia sp* e *Entamoeba sp*, além de desenvolverem potencial antidiarreico, importante no tratamento de infecções intestinais associadas à AIDS.

Stepanovic *et al.* (2003) realizaram um estudo com objetivo de investigar as propriedades do extrato etanólico de 13 amostras de própolis provenientes de diferentes regiões da Sérvia, sobre 39 microrganismos, através dos métodos de difusão e diluição em ágar e determinar a atividade sinérgica entre antimicrobianos e própolis. Os resultados indicaram que os extratos etanólicos de própolis apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e leveduras, enquanto que as bactérias Gram-negativas foram menos suscetíveis. Dentre os Gram-positivos, o *E. faecalis* foi o mais resistente, e dentre os Gram-negativos e fungos, *Salmonella ssp* e *Candida albicans* demonstraram menor susceptibilidade, respectivamente. No que concerne ao efeito de sinergismos entre os antibióticos e

própolis, essa combinação revelou ser eficaz em potencializar a inibição de crescimento de alguns microrganismos, especialmente as leveduras.

Uma amostra de própolis da cidade de Tuiuti (SP) foi submetida à extração com álcool etanólico resultando em extrato a 10%, os quais foram submetidos à HPLC para determinação de seus componentes com atividade bactericida contra cepas das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, suspensas em solução salina a aproximadamente 10^8 UFC/mL. O método da diluição seriada em tubos obteve os resultados mais consistentes, com mínima concentração bactericida variando de 2,5 a 20mg/mL para as espécies testadas (SAWAYA *et al.*, 2004).

Nove preparações de extrato de própolis com concentração entre 11 e 30% comercializadas em farmácias na cidade de São Paulo (SP) foram avaliadas por Auricchio *et al.* (2006) quanto à sua atividade contra bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*, através do método da difusão em ágar, avaliando-se cada produto na condição não diluída, na diluição indicada pelo fabricante e em dose dez vezes superior à dose recomendada. Os resultados mostraram que quando testados puros, oito dos nove produtos analisados apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans*, enquanto que apenas um desses produtos apresentou atividade frente a *Enterococcus faecalis*. Na forma diluída indicada pelo fabricante, apenas 4 preparações apresentaram atividade inibitória somente para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e quando utilizados em dez vezes a concentração recomendada pelo fabricante, nenhum produto demonstrou atividade inibitória, evidenciando que os mesmos são utilizados em condições ineficazes para a ação antimicrobiana aludida na rotulagem. Assim, os autores inferiram que não existe padronização das preparações à base de produtos naturais; o que pode interferir na eficácia antimicrobiana originalmente verificada para a matéria-prima vegetal ativa e comprometer a eficácia do produto final.

2.1.3 Estudos na Odontologia

Devido ao seu amplo espectro, estudos têm sido desenvolvidos sobre a possível utilização da própolis em diferentes subáreas da Odontologia, como a Cariologia, Cirurgia, Periodontia, Patologia Oral, Dentística e Endodontia.

Uma solução de própolis 50% diluída em propilenoglicol e álcool (Propolan[®], Herbapol Wroclaw, Poland) foi analisada quanto à sua eficácia no tratamento de gengivite crônica e úlceras bucais recorrentes. No estudo, 40 pacientes foram divididos em 2 grupos: um com indivíduos portadores de gengivite leve à moderada (grupo A), e outro com portadores de úlceras bucais de evolução de 24 a 48 horas. Após 30 dias de tratamento verificou-se significativa melhora e importante redução dos sintomas. As análises revelaram ação eficaz do Propolan[®] sobre bactérias Gram-positivas da placa supra gengival, além de ação curativa (cicatrizante) sobre as úlceras bucais (MARTINEZ SILVEIRA *et al.*, 1988).

Com o objetivo de comparar a ação de uma solução de própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% e do fluoreto de sódio 0,05% na redução do estreptococos do grupo mutans em pacientes cárie-ativos que realizaram bochechos durante 15 dias, Zárata-Pereira (1999) observou que a associação própolis-fluoreto mostrou-se efetiva na redução dessas bactérias em cerca de 66,93% dos pacientes, fato não observado nos pacientes que bochecharam apenas com o fluoreto de sódio 0,05%. Além disso, a ação antimicrobiana da própolis em situação de alto desafio cariogênico proporcionou redução significativa da perda de minerais do esmalte dentário e redução do acúmulo de biofilme, verificado através da microdureza do tecido, conforme demonstrado pelo mesmo autor em 2003.

Koo *et al.* (2000) investigaram e compararam a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de própolis a 10% e *Arnica montana* a 10% contra 15 microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* NTCC 3736, *Candida albicans* F72, *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556, *Streptococcus mutans* OMZ175, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus cricetus* HS-6, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, *Actinomyces naeslundii* W1053, *Actinomyces viscosus* OMZ105, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella denticola*, sendo os três últimos isolados clinicamente. A atividade antimicrobiana foi determinada através do método de difusão em ágar. Os resultados revelaram que o EEP produziu zonas de inibição de crescimento contra todos os microrganismos testados, enquanto que o extrato de *Arnica Montana* demonstrou inibir o crescimento de *P. gingivalis* e *A. naeslundii*

W1053 e ATCC 12104, cujos valores da zona de inibição de crescimento não foram estatisticamente diferentes do controle realizado com álcool etílico a 80%.

A atividade *in vitro* do extrato etanólico de própolis sobre a superfície dentinária de 15 dentes molares divididos em 5 grupos, foram averiguadas por Geraldini *et al.* (2000). Para o estudo, no grupo controle (Grupo 1) foi utilizado apenas spray ar/água. Nos outros grupos, as superfícies foram tratadas com etanol puro 70% (Grupo 2) e concentrações etanólicas de própolis a 10, 20 e 30% (Grupos 3, 4 e 5, respectivamente). Os espécimes, após receberem preparo adequado, foram avaliados em microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumentos que variavam de quinhentas a quatro mil vezes, onde observou-se que no Grupo 3 houve discreta deposição da solução sobre a camada de esfregaço dentinário mantendo os túbulos obstruídos; no grupo 4 foi observada a presença de partículas com formas esferoidais sobre a camada de esfregaço, de maneira mais evidente, e também não foram observados os túbulos dentinários abertos. No grupo 5, pode-se observar uma camada de partículas maiores incorporando toda a camada irregular do esfregaço e mantendo os túbulos obstruídos. Assim, os autores sugeriram que a própolis poderia ter ação de limpeza sobre a superfície dentinária.

O EEP a 3,0% proveniente do estado do Rio Grande do Sul utilizado como colutório foi avaliado quanto à sua capacidade de interferir na formação da placa bacteriana bem como na formação de polissacarídeos insolúveis. O estudo conduzido por Koo *et al.* (2002) utilizou também uma solução do tipo placebo e seis voluntários foram submetidos às soluções para bochechos. Os resultados obtidos revelaram que o grupo que fez uso do colutório à base de própolis apresentou menor índice de placa e a menor concentração de polissacarídeos insolúveis presentes na placa dental em comparação com o grupo placebo.

A tolerância dos fibroblastos do ligamento periodontal e polpa dental à própolis foi examinada por Al-Shaher *et al.* (2004) e comparada ao hidróxido de cálcio. O experimento consistiu em submeter células da polpa dental e do ligamento periodontal obtidas de 30 terceiros molares recém-erupcionados e extraídos, às soluções etanólicas de própolis nas concentrações respectivas de 0; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32mg/mL e de hidróxido de cálcio (CA(OH)₂) nas diluições respectivas de 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 e 2,4 mg/mL. Os resultados mostraram que as soluções de própolis testadas não apresentaram citotoxicidade para os fibroblastos do ligamento periodontal, tampouco para as células da polpa dental. Entretanto, o hidróxido de

cálcio, na concentração igual a 0,8mg/mL e maior que isso, foi capaz de matar os fibroblastos do ligamento periodontal e similarmente, mais de 90% dessas células da polpa dental na concentração 0,5mg/mL. Os autores sugeriram que a própolis possa ser utilizada como medicação intra-canal devido à sua baixa toxicidade.

A suposta ação anti-cariogênica da apigenina e o *tt*-farnesol -componentes da própolis – quando em desafio no biofilme de *S. mutans*, bem como a sua ação quando associados ao fluoreto, foi testada por Koo *et al.* (2005). O estudo foi realizado numa amostra de 64 ratos infectados por *S. mutans*, que foram divididos em oito grupos: Grupo 1- *tt*-farnesol; Grupo 2 - apigenina, Grupo 3 - fluoreto; Grupo 4 - *tt*-farnesol e fluoreto ; Grupo 5 - apigenina e fluoreto; Grupo 6 - apigenina, *tt*-farnesol e fluoreto; Grupo 7 - 25% etanol contendo 1,25% de dimetil-sulfóxido (DMSO) - controle negativo; Grupo 8 - clorexidina e fluoreto (controle positivo). Os resultados mostraram que todos os agentes testados, exceto os do grupo 3, foram capazes de diminuir o acúmulo do biofilme de *S. mutans* quando comparados ao veículo controle ($p < 0,05$) e que a combinação apigenina e fluoreto (Grupo 5) e apigenina, *tt*-farnesol e fluoreto (Grupo 6), foram os que resultaram em tratamentos mais efetivos.

Em 2006, Oncag *et al.* compararam a atividade antibacteriana da própolis, hidróxido de cálcio, gel de clorexidina e Vitapex[®](Neo Dental International, USA) em canais infectados com *E. faecalis*. Esse experimento *in vitro* utilizou 180 dentes unirradiculares hígidos extraídos, os quais foram preparados de acordo com o protocolo de tratamento endodôntico e cujos forames apicais foram selados com resina epóxica. Após a autoclavagem, os dentes receberam um inóculo de 10 μ L da cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) cultivada em BHI (Brain Heart Infusion) e ajustada na escala 0,5 de McFarland. Após esse período, a amostra foi dividida em seis grupos, os quais receberam aproximadamente 0,1mL das substâncias a seguir: Grupo 1- pó de hidróxido de cálcio misturado com glicerina; Grupo 2 - gel de clorexidina 1%; Grupo 3 - Vitapex[®] com iodofórmio e óleo de silicone; Grupo 4 - extrato etanólico de própolis a 10%; Grupo 5 - etanol 96% e Grupo 6 - controle negativo apenas com a cultura de *E. faecalis*. Um sétimo grupo foi utilizado com 20 dentes que não foram contaminados e tampouco receberam medicação. Todos os espécimes foram selados com bolinha de algodão estéril e cimento selador temporário – Cavit[®](3M Espe, USA) e incubados em condições de anaerobiose a 37°C, nos tempos experimentais de 48 horas e 10 dias. Decorridas 48 horas, 15

espécimes dos grupos 1 ao 4, 10 espécimes dos grupos 5 e 6, e 10 espécimes do grupo 7 tiveram o selamento coronal removido sob condições assépticas, quando receberam 5mL de água destilada esterilizada para remover a medicação intracanal. Imediatamente, um cone de papel esterilizado de diâmetro 50 foi levado aos canais por 60 segundos e transferido para tubos de vidro que continham os meios de cultura para observação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC). Decorridos 10 dias, o restante da amostra também passou pelo mesmo processo. Os resultados revelaram que todos os medicamentos foram efetivos contra o *E. faecalis* no período de 48 horas, com diferença significativa entre os grupos 1 a 4 em relação aos grupos 5 e 6 ($p < 0,05$), não sendo evidenciada diferença significativa entre os medicamentos à base de hidróxido de cálcio, Vitapex[®] e própolis ($p > 0,05$). Para o período experimental de dez dias, todos os medicamentos dos grupos 1 ao 4 foram efetivos contra *E. faecalis*, com diferença significativa entre os grupos 1 ao 4 em relação aos grupos 5 e 6 ($p < 0,05$). A própolis mostrou ser a substância mais efetiva após dez dias, porém, não foi encontrada diferença entre essa substância e o gel de clorexidina ($p > 0,05$), embora as duas substâncias tenham sido mais efetivas que o hidróxido de cálcio e o Vitapex[®] ($p < 0,05$). Os autores concluíram que a própolis pode ser uma alternativa de medicação intracanal, salientando a necessidade de maiores estudos nesse quesito.

De-Carli (2007) comparou a ação de um gel de própolis 5% (gel A) e esse mesmo gel associado ao fluoreto de sódio 0,05% (gel B) sobre as contagens dos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, inativação de manchas brancas e redução do acúmulo do biofilme dental em 97 pacientes de alto risco à cárie, que foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais. Os resultados revelaram uma redução significativa ($p < 0,0001$) nos níveis de *S. mutans*, com melhor desempenho do gel A comparado ao gel B. A mesma situação foi observada em relação à inativação de lesões incipientes de cárie (manchas brancas). O acúmulo do biofilme foi reduzido significativamente ($p < 0,00001$) após a aplicação dos géis em ambos os grupos, porém, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

Costa *et al.* (2008) avaliaram a ação antimicrobiana de substâncias utilizadas em Endodontia contra o *E. faecalis* através da técnica de difusão em ágar pela técnica do poço. Foram testados os grupos: Grupo 1 - extrato de própolis verde 12% (Propomax[®], APIS FLORA, Brasil); Grupo 2 - Pasta de Guedes-Pinto (Iodofórmio+PMCC+Rifocort[®]; Medley, Brasil); Grupo 3 - extrato de própolis verde

12% (Propomax[®]) + Rifocort[®] + Iodofórmio; Grupo 4 - Rifocort[®] + extrato de própolis verde 12% (Propomax[®]); Grupo 5 - Ca(OH)₂ PA + extrato de própolis verde 12% (Propomax[®]); Grupo 6 - Ca(OH)₂ PA + soro fisiológico; Grupo 7 - Iodofórmio + extrato de própolis verde 12% (Propomax[®]); Grupo 8 - Iodofórmio + soro fisiológico; Grupo 9 - Rifocort[®]; Grupo 10 - paramonoclorofenol canforado e Grupo 11 - soro fisiológico (controle negativo). Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre as substâncias avaliadas (p<0,05), sendo que as pastas dos Grupos 4, 2 e 3 foram mais eficazes contra a bactéria, com maiores halos de inibição. Considerando as substâncias isoladamente, o Rifocort[®] foi a que produziu o maior halo de inibição e os Grupos 6 e 8 não apresentaram efetividade antimicrobiana contra o microrganismo.

Em estudo *in vitro*, Parma-Neto (2008) avaliou a atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos de própolis de *Apis mellifera* sobre biofilme e cepas periodontopatogênicas, utilizando três tipos de própolis oriundos do Estado de Mato Grosso do Sul: própolis verde, vermelha e resinosa. A CLAE foi o método utilizado para as análises químicas; os ensaios microbiológicos foram realizados através do método da diluição seriada dos extratos hidroalcoólicos de própolis para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* e determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra biofilmes. Os dados obtidos revelaram que a própolis verde apresentou maiores teores de flavonóides e derivados de ácido caféico; com o processo de extração à maceração por 30 dias, obteve-se o melhor resultado da ação antibacteriana contra microrganismos aeróbicos. A CIM contra *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* foi de 1,6 µg/mL e 3276,8 µg/mL, respectivamente. A CBM contra biofilme foi de 4,0 µg/mL. Concluiu-se que entre as própolis oriundas do Estado de Mato Grosso do Sul, a do tipo verde apresenta capacidade antibacteriana contra periodontopatógenos e biofilme dental, sendo a mais indicada para as investigações em Odontologia.

Awawdeh *et al.* (2008) conduziram um estudo laboratorial para investigar a atividade antibacteriana da própolis e do hidróxido de cálcio quando utilizados como medicação de demora em modelos de dentina infectados com *E. faecalis*. Foram utilizados 50 dentes unirradiculares extraídos por indicação ortodôntica que foram seccionados de modo a obter-se tubos radiculares de dentina no comprimento de 7 mm, os quais foram processados para a inoculação das células bacterianas. Cinco

espécimes foram selecionados aleatoriamente e mantidos como controle negativo. Os quarenta e cinco espécimes restantes foram colocados em tubos contendo caldo de soja inoculado com *E. faecalis* e incubados por 21 dias a 37° C. Decorrido esse tempo, dois espécimes foram escolhidos aleatoriamente (um estéril e outro infectado) e examinados no microscópio eletrônico de varredura. Então, os 40 espécimes restantes foram divididos em dois grupos de 20 dentes cada, os quais foram preparados para receber a solução de própolis 30% (n=20, Grupo I) e pasta de hidróxido de cálcio (Ultracal XS[®], Ultradent). O grupo de controle positivo consistiu de 4 espécimes que receberam solução salina como medicamento. O grupo controle negativo com 4 espécimes foi inoculado com caldo de cultura estéril. Os espécimes foram selados com cimento temporário Cavit[®] e reincubados a 37°C por 24 e 48 horas. Para os tempos previstos, em 10 espécimes do grupo 1 e grupo 2, respectivamente, foram coletadas amostras microbiológicas com cones de papel as quais foram transportados para um tubo de ensaio contendo 1mL de meio de cultura. Foi realizada diluição 1:10 e alíquotas de 0,1mL colocadas em placas de ágar incubadas a 37°C por 24 horas para observação de crescimento microbiológico. Os resultados mostraram que para os espécimes tratados com própolis a 30%, não houve crescimento do microrganismo testado nos tempos experimentais, enquanto que o hidróxido de cálcio mostrou-se ineficaz nos tempos avaliados.

Rezende *et al.* (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de duas pastas experimentais contendo própolis associada ao hidróxido de cálcio, com culturas polimicrobianas coletadas de 16 molares decíduos com polpa necrosada e fistulados, extraídos de crianças entre 4 e 6 anos de idade. Os produtos utilizados foram duas amostras de própolis brasileiras: o extrato etanólico de própolis (EEP) a 11% da Apis Flora[®] e o extrato de própolis sem etanol (EP) Propomax[®]; Ca(OH)₂ PA (Biodinâmica[®], Brasil) e propilenoglicol (Alexfarma[®], Brasil). Foram preparadas duas pastas na consistência de creme dental, sendo: Pasta 1- EEP + Ca(OH)₂ PA; e Pasta 2 - EP + Ca(OH)₂ PA. O experimento foi realizado em duplicata através da técnica de difusão em ágar. Ambas as pastas apresentaram zonas de inibição maiores contra microrganismos coletados dos canais radiculares que o hidróxido de cálcio associado ao propilenoglicol (p=0,021 e 0,003, respectivamente). A pasta 2 apresentou zonas de inibição um pouco maiores que a pasta 1 (p=0,053). Os autores

concluíram que a associação entre própolis e hidróxido de cálcio foi efetiva no controle das infecções dentárias *in vitro*.

2.2 *Enterococcus faecalis*

Tronstad *et al.* (1990) procuraram o motivo do insucesso do tratamento endodôntico convencional em dez pacientes portadores de lesão periapical submetidos à cirurgia parendodôntica. Durante o procedimento cirúrgico, removeu-se aproximadamente 2 a 3mm do ápice radicular envolvido pela lesão periapical e essas amostras foram processadas e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os autores verificaram que o cimento dessas raízes estava coberto por uma camada lisa e amorfa contínua ao ápice radicular, adjacente ao forame apical. Em maior ampliação, foi encontrada nessa camada uma variedade de formas bacterianas confirmando a existência de uma placa bacteriana na região, com predominância de cocos e bacilos, o que poderia explicar, segundo os autores, a possível causa do insucesso.

Apesar de existirem mais de 350 espécies de bactérias na cavidade bucal humana, somente um número limitado dessas, em torno de uma a doze espécies, conseguem se estabelecer na polpa e desenvolver uma infecção no canal radicular, pois os mecanismos seletivos do ambiente pulpar e as interações bacterianas sinérgicas e antagonistas criam condições para o desenvolvimento de alguns microrganismos e ao mesmo tempo, suprimem o crescimento de outros. Essas foram as conclusões de Sundqvist (1992), ao realizar uma revisão da literatura relacionada nos últimos dez anos, à época do estudo .

A fim de avaliar o resultado do retratamento endodôntico conservador e realizar a análise microbiológica de casos considerados insatisfatórios, 54 dentes de pacientes assintomáticos, com evidência radiográfica de lesão periapical cuja endodontia havia sido realizada há 5 anos e que mostravam-se radiograficamente bem obturados, foram selecionados para o retratamento endodôntico. Após a desobturação dos canais, amostras bacteriológicas foram colhidas com pontas de papel estéreis antes do preparo químico-mecânico e colocadas em tubos de ensaio com meio de cultura à base de tioglicolato e ágar. Os canais foram selados com bolinhas de algodão estéreis e cimento à base de óxido de zinco e eugenol. Decorridos sete dias, os pacientes retornaram para nova coleta imediatamente à

remoção do selamento temporário, e posteriormente ao preparo químico-mecânico, os canais foram medicados com pasta à base de hidróxido de cálcio. No retorno de quinze dias de uso da medicação intra-canal, nova coleta foi realizada e os canais obturados e restaurados. A análise das amostras revelou que 24 dos canais estavam contaminados por microrganismos no momento da desobturação dos canais radiculares. Em 20 casos, houve crescimento bacteriano dos exemplares colhidos na primeira e segunda sessões de tratamento, sendo que em 19 dentes havia uma única espécie; em 4 casos haviam duas espécies presentes; em um caso havia uma infecção polimicrobiana por 4 espécies e em dos 9 casos em que o *E. faecalis* foi isolado, esse era o único microrganismo presente no canal radicular. Cinquenta pacientes (93%) do total da amostra foram preservados anualmente por cinco anos, sendo 37 considerados curados completamente, com taxa de sucesso de, aproximadamente, 74%. Os autores também observaram que a taxa de sucesso nos dentes em que o *E. faecalis* se fez presente foi relativamente menor (66%) que a média dos outros casos, o que os levou a concluir que esse microrganismo seria um importante agente causador do insucesso endodôntico (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

O *E. faecalis* foi a bactéria mais encontrada no estudo de Molander *et al.* (1998), no qual os autores avaliaram 100 dentes tratados endodonticamente há aproximadamente quatro anos e com periodontite apical constatada. Em 85% da amostra (68 dentes), verificou-se a presença de uma microbiota intracanal, com 117 cepas isoladas, havendo uma predominância de anaeróbios facultativos Gram-positivos (69%), sendo o *E. faecalis* a espécie encontrada com maior frequência na proporção de 47,05% (32 dentes).

Espécies do gênero *Enterococcus* têm significativa importância na microbiologia endodôntica, pois possuem resistência inerente a agentes antimicrobianos e outros fatores de patogenicidade, os quais se não controlados, podem ser favorecidos pela alteração nas condições ecológicas dos canais e estabelecer um processo infeccioso de difícil tratamento (ESTRELA, 2004).

O *E. faecalis* é um coco Gram-positivo, encontrado rotineiramente na microbiota intestinal, podendo ser encontrado também na mucosa oral e vaginal. A citolisina e a substância agregativa, postulados como fatores de virulência, são os produtos de maior evidência desse microrganismo. A citolisina e a substância agregativa são codificadas pelo plasmídeo conjugativo pAD1, que parece ser exclusivo do *E. faecalis*, o qual também secreta ferormônios que atraem dois

enterococcus que se unem e trocam plasmídeos, responsáveis por conferir resistência ao microrganismo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Um possível mecanismo que pudesse identificar como o *E. faecalis* sobrevive e cresce dentro dos túbulos dentinários e consegue reinfetar um canal radicular obturado, foi o motivo do estudo realizado por Love em 2001. A metodologia consistiu em cultivar células de *Streptococcus gordonii* DL1, *Streptococcus mutans* NG8 e *E. faecalis* JH2-2 em placas de ágar-TSBY (Trypticase Soy Broth Yeast), ajustadas em densidade óptica 1 (aproximadamente $1,2 \times 10^9$ células mL⁻¹), contendo 10 a 90% de soro humano e incubadas a 37°C, por 56 dias. Decorrido esse período, as culturas foram inoculadas em raízes unirradiculares de dentes hígidos, extraídos por motivos diversos e preparados previamente. Os resultados revelaram que as 3 espécies de bactérias permaneceram viáveis dentro do período experimental. O autor verificou que o *E. faecalis* possui habilidade para invadir os túbulos dentinários e de manter-se viável nesses locais, aderindo-se ao colágeno na presença de soro humano, mecanismo pelo qual as células dessa espécie bacteriana atuam como um patógeno nos casos de insucesso endodôntico.

A resposta do *E. faecalis* em presença de substâncias antimicrobianas como o hipoclorito de sódio e o Ca(OH)₂, e os mecanismos que envolvem a sobrevivência desse microrganismo em condições de pH elevado, foi investigada por Evans *et al.* (2002). Para a realização do experimento foi utilizada a cepa de *E. faecalis* JH2-2. Os resultados confirmaram que essa bactéria é resistente ao Ca(OH)₂ em pH igual ou menor que 11,1. Os autores verificaram que houve uma adaptação ao pH alcalino e a síntese de proteínas induzidas por stress não são preponderantes na sobrevivência das células. Por outro lado, o funcionamento da bomba de prótons, que é capaz de acidificar o citoplasma mostrou-se crítico à sobrevivência desses microrganismos em meios de elevado pH. O hipoclorito de sódio foi efetivo na eliminação do *E. faecalis*.

Pinheiro *et al.* (2003) procuraram identificar as principais bactérias dos canais radiculares de 60 dentes tratados endodonticamente em pacientes que apresentavam evidência radiográfica de periodontite apical. Os casos foram selecionados a partir de análise dos dentes tratados endodonticamente há mais de 4 anos, exceto aqueles que apresentaram sintomas persistentes ou desconforto à percussão (6 casos), os quais foram retratados num período mínimo de 2 anos. Em 51 dos casos, foi encontrada microbiota intracanal, dos quais 108 cepas bacterianas

pertencentes a 37 espécies diferentes. Grande parte dos canais tiveram um (46,7%) ou 2 (13,3%) tipos de cepas isoladas; apenas 25% dos casos demonstraram infecções polimicrobianas, havendo uma predominância de anaeróbios facultativos (57,4%) em relação a anaeróbios obrigatórios (42,6%) e de Gram-positivos (83,3%) do total da amostra. O *E. faecalis* foi a espécie bacteriana mais comumente encontrada, compreendendo 52,6% dos casos.

Gomes *et al.*, em 2003, prepararam 180 incisivos centrais superiores bovinos, que depois de cortados nos 5mm apicais e nos dois terços coronais, resultaram em tubos de dentina que foram infectados por 7 dias com cultura de *E. faecalis* (ATCC 29212). A amostra foi dividida em quatro grupos de 45 espécimes cada e tratados, respectivamente, com clorexidina gel a 2%, pasta de Ca(OH)₂ veiculada em polietilenoglicol 400, clorexidina gel a 2% associada à pasta de Ca(OH)₂ veiculada em polietilenoglicol 400, e suspensão de BHI como controle. Posteriormente, foram incubados a 37°C por 2, 7, 15 e 30 dias. Os autores verificaram que a clorexidina foi capaz de inibir o crescimento do *E. faecalis* nos períodos experimentais de 1, 2, 7 e 15 dias; a pasta de Ca(OH)₂ não foi capaz de demonstrar atividade antibacteriana, ao contrário da associação dos dois medicamentos que demonstrou 100% de atividade antibacteriana.

Estrela (2004) descreveu que a resistência do *E. faecalis* está relacionada à produção de enzimas histolíticas como a colagenase, hialuronidase e fibrinolisinase. A colagenase atua na digestão do colágeno, principal componente do tecido conjuntivo. A hialuronidase hidrolisa o ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo componente da matriz extracelular em nível de tecido epitelial e conjuntivo, sendo considerada um fator microbiano de difusão. A fibrinolisinase transforma o plasminogênio do plasma em plasmina, enzima proteolítica capaz de digerir a fibrina que, normalmente delimita e reação inflamatória.

A determinação da presença de enterococos, bactérias entéricas e leveduras em canais radiculares e o teste de sensibilidade antimicrobiana foram os objetivos da pesquisa de Ferrari *et al.* (2005). Uma amostra de 25 dentes de pacientes com diagnóstico de periodontite apical assintomática e que não havia feito uso de terapia antibiótica nos 3 meses anteriores ao início do estudo foi escolhida para o experimento. A metodologia consistiu na coleta de material antes e depois da instrumentação dos canais radiculares abertos, sob condições assépticas e deixados sem medicação intra-canal durante sete dias, e a subsequente medicação dos

mesmos com uma solução de PRP[®](Fórmula & Ação, Brasil) por um período de sete dias. Os resultados obtidos revelaram que 92% da amostra na primeira coleta apresentavam microrganismos, sendo que 22% dos casos apresentaram enterococos, bactérias entéricas e alguns tipos de leveduras. Após o preparo biomecânico, quando outra coleta foi realizada, essas espécies não foram detectadas, embora outros tipos de microrganismos tenham sido encontrados em 20% da amostra. Decorridos sete dias em que os dentes ficaram sem medicação intra-canal, 100% dos canais apresentavam microrganismos com a presença das espécies estudadas em 52% dos condutos. Após esse período, quando utilizou-se o PRP nos canais radiculares, apenas os microrganismos do tipo enterococos foram detectados e identificada a presença de *E. faecalis* e *Enterococcus faecium* em 36% dos canais. Quanto aos testes de sensibilidade antimicrobiana, todas as espécies de enterococos mostraram susceptibilidade à ampicilina, porém, essa susceptibilidade foi variável em relação à rifampicina e ao ciprofloxacino.

Kayaoglu *et al.* (2005) avaliaram, *in vitro*, a aderência do *E. faecalis* ao colágeno tipo I e à albumina de soro bovino (BSA) quando colocado em meio seletivo em que o pH variou de 7,1 a 9,5. Para tanto, utilizaram uma cultura de *E. faecalis* (A197A) que foi inserida em meio TSB, pH 7,1, que recebeu NaOH para obtenção de outras soluções com pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 e 9,5, respectivamente. A cultura de *E. faecalis* repicada foi inserida nas soluções anteriormente obtidas e incubadas por 24 horas, a 37°C. O teste de aderência foi realizado utilizando BSA e colágeno tipo I que foram dispersos sobre 96 placas e armazenados a 4°C por 12 horas. A cultura foi, então, semeada, incubada a 37°C por 2 horas, e posteriormente, fixada para contagem das colônias em MEV. Os dados obtidos revelaram que a aderência do *E. faecalis* ao BSA foi diminuindo com o aumento do pH dessa substância de 7,1 para 9,5, e em relação à aderência do *E. faecalis* ao colágeno tipo I, houve um aumento progressivo quando o pH variou de 7,1 para 8,5. A partir desse, até o pH 9,5, houve uma diminuição da adesão que não foi estatisticamente significativa quando comparada ao pH 7,1. A diferença entre o número de bactérias aderidas ao BSA e ao colágeno tipo I também foi analisada para cada grupo separadamente, e exceto para o grupo de pH 7,1, o número de bactérias aderidas ao colágeno foi significativamente superior do que ao BSA. Assim, os autores concluíram que a elevação no pH no meio de crescimento levou a diminuição da

aderência ao BSA e aumentou a aderência ao colágeno, principalmente no pico de pH 8,5.

Geijersstam *et al.* (2006) analisaram a susceptibilidade antimicrobiana do *E. faecalis* a diferentes agentes antimicrobianos e realizaram a análise molecular genética das cepas colhidas. Para tanto, foram isolados *E. faecalis* de 59 dentes de canais obturados que apresentavam periodontite apical. Foram testadas as concentrações inibitórias mínimas de ampicilina, penicilina, cefotaxima, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, rifampicina, estreptomicina, teicoplanina, tetraciclina, vancomicina, clindamicina, quinupristin-dalfopristina e linezol, de acordo com os valores recomendados pela Sociedade Inglesa de Quimioterapia Antimicrobiana. Também foi testada a resistência do *Isa* gene determinado pelo método *polymerase chain reaction* (PCR), o qual é responsável por conferir resistência do *E. faecalis* às lincosamidas. Os autores verificaram que o *E. faecalis* apresentou resistência aos antibióticos testados e que o gene *Isa* desse microrganismo foi responsável por promover a resistência à clindamicina. Concluíram que embora tenha havido diferenças nos níveis de resistência do *E. faecalis*, o perfil de susceptibilidade desse microrganismo às terapias padrão, no caso de exacerbação de periodontite periapical, pode evoluir para uma infecção sistêmica ou uma endocardite bacteriana em indivíduos debilitados.

Com o objetivo de determinar a eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras como a água ozonizada; ozônio gasoso; hipoclorito de sódio a 2,5% e a clorexidina a 2% em canais infectados por *E. faecalis*, Estrela *et al.* (2007) utilizaram trinta incisivos superiores que foram preparados e inoculados com a cultura dessa bactéria, por 60 dias. Os espécimes foram submetidos ao desafio com as soluções que foram dispersadas nos canais num fluxo controlado de 50mL/min⁻¹ por vinte minutos, momento em que foram colhidas as amostras e levadas para incubação a 37°C, por quarenta e oito horas. A turvação do meio foi utilizada como critério de análise do efeito antimicrobiano das soluções. Os resultados obtidos revelaram que nenhuma das soluções foi suficiente para inativar essa bactéria no tempo proposto.

Nair (2006), através de uma revisão da literatura, mencionou que na década de 90 uma série de investigações mostrou que a presença de microrganismos poderia ser um dos fatores etiológicos da periodontite apical persistente, e que dentre o número reduzido de espécies encontradas nos canais radiculares, o *E. faecalis* desperta grande interesse da comunidade acadêmica, sendo considerado

um microrganismo de potencial patogenicidade, pois é encontrado em aproximadamente 77% dos casos, além de ser resistente a maioria das medicações intra-canal e tolerar ambientes com pH elevado e longos períodos de falta de nutrientes, devido aos mecanismos internos de adaptação a condições extremas de sobrevivência.

Chivatxaranukul *et al.* (2008) investigaram a invasão e possível predileção do *E. faecalis* pelas paredes dos túbulos dentinários, que foi mensurada *ex vivo*. O estudo foi realizado em 16 dentes recém-extraídos, sendo que 8 dentes receberam preparo químico-mecânico e 8 dentes não e submetidos à infecção por cepas de *E. faecalis* (JH2-2). Após a inoculação pelas bactérias, os espécimes foram incubados por oito semanas e após esse período submetidos ao processamento para exame em MEV, com magnificação de 400 vezes. O critério de valores considerados para invasão foi 0, 1, 2 e 3, quando 0, 1-20, 20-50, >50 túbulos eram infectados. Os autores verificaram que houve invasão dos túbulos dentinários, sendo significativa a invasão nos espécimes que não receberam preparo químico-mecânico ($p < 0,0001$). As bactérias também mostraram-se capazes de aderir aos túbulos dentinários nas regiões coronária e apical dos dentes.

Zender e Guggenheim (2009), através de revisão sistemática da literatura, destacaram a dificuldade em se eliminar as bactérias do gênero enterococos do interior dos canais radiculares necróticos ou inapropriadamente obturados, sendo a espécie *E. faecalis* capaz de sobreviver sozinha, adaptando-se a condições extremas de estresse nutricional por meio de alterações no seu metabolismo interno, bem como a sua resistência ao preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio e água oxigenada. Os autores relataram ainda que embora o *E. faecalis* não seja uma espécie presente nos processos de cárie dentária, são bactérias encontradas nas infecções primárias do sistema de canais radiculares que podem penetrar, via pequenas fendas presentes nos dentes ou através de microespaços presentes, em restaurações coronárias inadequadas levando à ocorrência da periodontite apical. O *E. faecalis* também demonstrou pouca capacidade de aderência aos tecidos bucais - tecidos moles e superfícies dentárias – assim como insucesso ao competir em crescimento com a microbiota oral normalmente presente na cavidade bucal, o que fez os autores verificarem que essa espécie bacteriana tem origem dos alimentos ingeridos pelos indivíduos, visto que são encontrados em suplementos veterinários, na fabricação de probióticos e em outros produtos de consumo *in natura*.

3 OBJETIVOS

Diante da ação antimicrobiana da própolis e as constatações sobre a resistência do *E. faecalis* nas infecções refratárias de origem endodôntica, o presente trabalho se propôs a:

- a) avaliar, *in vitro*, a capacidade antimicrobiana da própolis de *Apis mellifera* sobre o *E. faecalis* (ATCC 29212);
- b) comparar a própolis ao hidróxido de cálcio quanto à atividade antimicrobiana sobre esse microrganismo, em canais radiculares.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS, sob protocolo nº 992 (Anexo A). Previamente à doação dos dentes foram obtidos os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido dos doadores (Apêndice A).

4.2 Obtenção do extrato puro da própolis (EPP)

Foi obtida 892 g de própolis bruta, tipo verde, oriunda de Ivinhema (MS) junto ao Apiário Vovô Pedro em Campo Grande (MS), originada da espécie botânica *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo). A amostra de própolis, até a preparação dos extratos, foi armazenada em sacos plásticos hermeticamente fechados sob temperatura de 4°C. Após trituração manual foi acrescentado etanol PA (CHEMCO, Brasil). Em seguida, a solução foi levada ao ultra-som (THORNTON, MODELO T14, USA) para uma extração efetiva dos constituintes da própolis. Procedeu-se a filtração em papel absorvente e acrescentou-se etanol de forma a cobrir o precipitado e novamente levado ao ultra-som. Esse processo foi repetido 5 vezes e o precipitado, obtido foi levado ao rotaevaporador (FISATOM, USA) para remoção do etanol, obtendo-se o extrato etanólico bruto da própolis (EEBP), com massa de 405g. A este foi acrescentado hexano para separação da parte apolar da polar, porção que contém os constituintes moleculares de classe antimicrobiana – flavonóides e terpenos. O EEBP foi dividido em fração hexânica e fração etanólica, chamada essa última de extrato etanólico de própolis (EEP). Foi preparada uma solução com água destilada e álcool cereais PA (70:30), acrescentando 50 g de própolis em 1000 mL dessa solução, obtendo-se assim, a solução hidroalcoólica de própolis 5 % (solução-mãe).

4.3 Processamento dos espécimes dentários

Foram utilizados 50 dentes pré-molares inferiores unirradiculares extraídos recentemente por motivos diversos. As superfícies radiculares foram limpas delicadamente com curetas periodontais, tomando-se cuidado para manter intacto o

cimento. Os dentes foram imersos em hipoclorito de sódio a 5% durante 30 minutos e permaneceram em NaCl a 0,9% em temperatura ambiente até o momento de uso (LOVE; 2007). Para o experimento, as coroas foram seccionadas em aparelho para corte de dentes com disco de diamante (ISOMET, USA). Foi padronizado o comprimento médio das raízes em 16mm. O acesso cervical foi realizado com brocas esféricas diamantadas (KG Sorensen, Brasil) em alta rotação e o terço cervical e médio dos canais foi preparado com brocas de Gates-Glidden[®] (Denstply Maillefer, Switzerland) números 2, 3 e 4 . O preparo químico cirúrgico foi realizado a 1mm aquém do forame apical utilizando-se limas tipo K (Denstply Maillefer, Switzerland) de diâmetro 15 até 50, pela técnica crown-down, irrigando-se os canais com 3mL de NaOCl a 1% a cada troca de limas (ONCAG *et al.*, 2006). Concluído o preparo químico-cirúrgico, inundou-se os canais com EDTA 17% (ácido dietilenoaminotetracético), o qual foi agitado no interior dos mesmos durante 3 minutos, com auxílio de uma lima tipo K[®] de diâmetro 45. A irrigação final foi realizada com 10mL de NaCl 0,9%, e para secagem utilizou-se cones de papel absorvente[®] (Meta Biomedical, USA) estéreis de diâmetro 50. O forame apical de cada raiz foi selado com resina composta[®] (Z-100, 3M ESPE, USA), bem como duas camadas de esmalte incolor[®] (Colorama, Brasil) foram utilizadas sobre o cimento para evitar a contaminação externa durante os procedimentos posteriores. Em seguida, as raízes foram colocadas em placas de Petri com umidade relativa de 100% até o momento de esterilização das mesmas em autoclave a 121°C por 15 minutos (ONCAG *et al.*, 2006; ESTRELA *et al.*, 2007).

4.4 Cultura microbiana

Foi utilizada a cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) crescida em caldo Müller-Hinton[®] (MH) (Oxoid, England) para a obtenção do inóculo. A cultura foi mantida em fase ativa de crescimento durante 4 horas a 37°C. Em seguida, a concentração foi ajustada em 10⁸ células/mL (NCCLS, norma M7-A06, 2003). Tomando-se aproximadamente 10µL desta solução, obteve-se um inóculo com uma concentração de aproximadamente 10⁶ células.

4.5 Testes de atividade antimicrobiana

4.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima

A solução mãe de própolis a 5% teve que ser ajustada para o início das titulações de atividade antimicrobiana. Um volume inicial de 100mL dessa solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº1 para retirar partículas insolúveis, e então dessecada em placa de Petri a 50°C, por 24 horas, até que seu peso ficasse constante. Ao produto final, 3.376,8mg de resina desidratada, foi acrescentado uma solução hidroalcoólica de álcool de cereais a 30%, obtendo-se uma solução final de 33,7mg/mL.

Com o objetivo de se determinar a concentração inibitória mínima dessa solução sobre o *E. faecalis*, foi utilizada a técnica da microdiluição. A solução foi diluída serialmente em solução hidroalcoólica de álcool de cereais a 30% em microplacas de poliestireno (KERTELL®, França) com 96 poços, fundo em U.

Um inóculo de 10^4 bactérias por poço de *E. faecalis* preparado em caldo MH®, foi depositado em toda a série de diluições. Após 24 horas de incubação a 37° C em câmara úmida, todos os poços foram repicados com o auxílio de um replicador de Steer (Figura1) em uma placa de ágar sangue (Oxoid®, England) e incubado novamente por uma noite a 37° C. O *end point* da titulação foi a maior diluição de extrato hidroalcoólico de própolis que inibiu 99,9% do crescimento do inóculo padrão, verificado através da cultura de cada diluição em ágar sangue(Figura 2).

4.5.2 Teste de atividade antimicrobiana *ex vivo*

Partindo-se da concentração inicial de 33,7mg/mL, para cada diluição acrescentou-se à concentração anterior 1µL de diluente, e assim, sucessivamente nos 96 poços. Face ao volume médio dos canais radiculares a serem testados e as características morfológicas da dentina, aumentou-se a concentração de bactérias no desafio para os testes *ex vivo* em 10^6 bactérias por canal radicular. A concentração teste de própolis também foi aumentada para 2 a 4 vezes a concentração inibitória mínima obtida previamente.

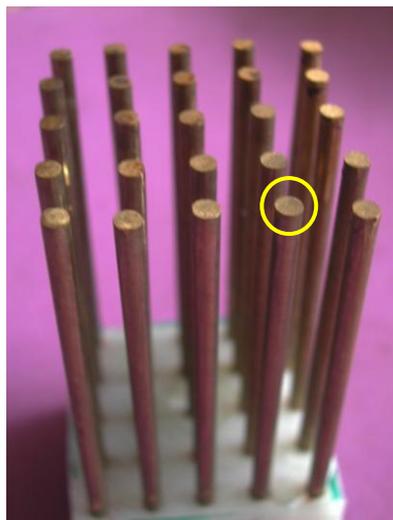


Figura 1 - Replicador de Steer. A seção transversal de 3mm, assinalada pelo círculo corresponde à área que carrega 10^4 bactérias a serem semeadas.

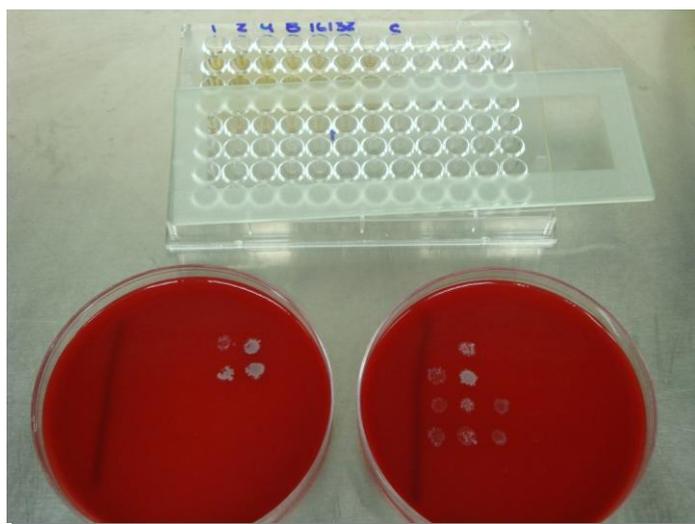


Figura 2 – Microplacas de poliestireno com poços em U e placas de ágar sangue com crescimento bacteriano

Os 50 dentes previamente esterilizados foram fixados com auxílio de cêra utilidade nº 7 no fundo dos poços de uma microplaca de poliestireno (KERTELL®, França). Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar. Quarenta e cinco dentes foram divididos em 3 grupos de 15 dentes cada. Todos receberam um inóculo inicial de $10\mu\text{L}$ de uma cultura de *E. faecalis* contendo 10^6 células por canal. Os 5 dentes restantes foram utilizados como controle, sendo dois controles negativos e três controles positivos. A microplaca, após o preparo, foi

colocada em um recipiente estéril, em umidade 100%, incubada a 37 °C por 24 horas.

Decorrido esse tempo, todos os canais foram instilados com 20µL das soluções, conforme descrito abaixo (Figura 3):

- | | |
|---|--------|
| Grupo 1: solução de própolis 0,16% | (n=15) |
| Grupo 2: solução de própolis 0,08% | (n=15) |
| Grupo 3: Ca(OH) ₂ PA + água destilada 10% ¹ | (n=15) |

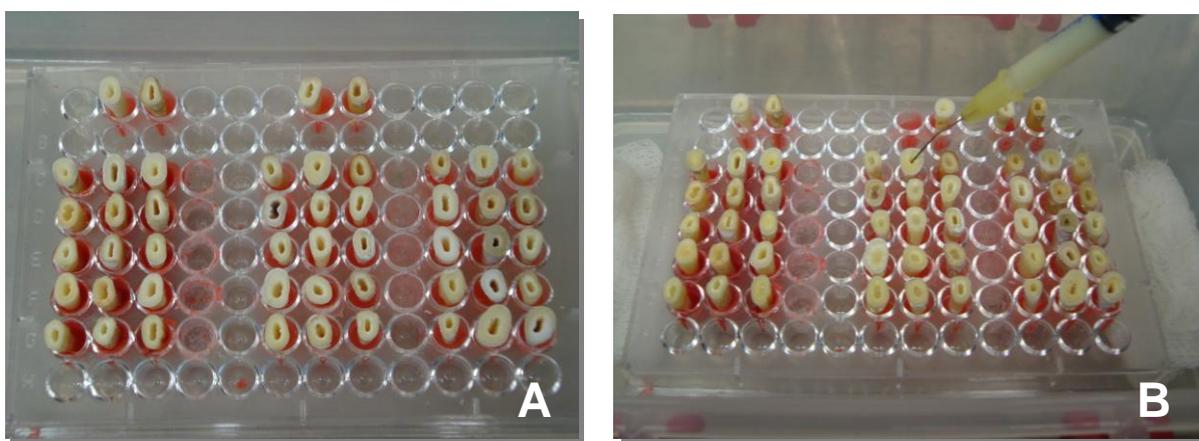


Figura 3 – Raízes dentárias após preparo. Em A – após a colocação do inóculo bacteriano (10^6 bactérias). Em B, sendo colocadas as soluções testadas.

Devido a porosidade dos canais, esses inóculos eram rapidamente absorvidos pela dentina. Após a adsorção dos antimicrobianos, as aberturas de acesso de cada raiz foram seladas com bolinhas de algodão e Coltoso[®] (Vigodent, Brasil) e mantidas em estufa a 37°C e umidade relativa de 100%, durante 48 horas (Figura 4).

Após a incubação, o Coltoso[®] e a bolinha de algodão estéril de cada dente foram removidos com sonda exploradora e pinça clínica. Em cada dente, foram instilados aproximadamente 10µL de meio MH[®] para obter-se uma solução de continuidade.

Com auxílio de uma pinça clínica, foram introduzidos cones de papel absorventes estéreis (Meta Biomedical[®], USA), de número 50, no interior dos canais radiculares e mantidos durante 60 segundos. Os cones de papel de cada canal foram então retirados e incubados a 37°C por 48 horas em meio MH[®], para avaliação de crescimento bacteriano.

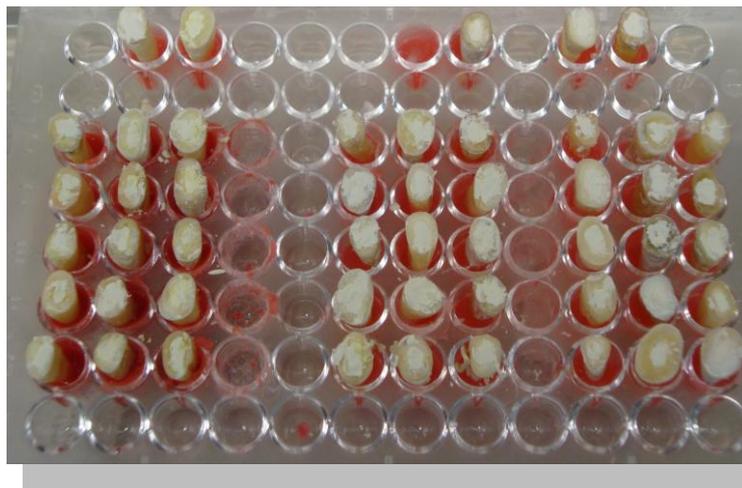


Figura 4 – Espécimes após colocação do inóculo e das soluções, vedados com Coltosol[®].

O critério definido para essa avaliação foi a ausência de turvação nos tubos testes com os cones de papel após a incubação. A ausência de turvação foi considerada como dente estéril ou resultado negativo e qualquer turvação da cultura foi julgada como sinal de conduto contaminado ou positivo (Figura 5).

¹ 1g do pó de hidróxido de cálcio PA acrescido de 10mL de água destilada estéril, conforme recomendação do fabricante (SSWhite[®], Brasil).

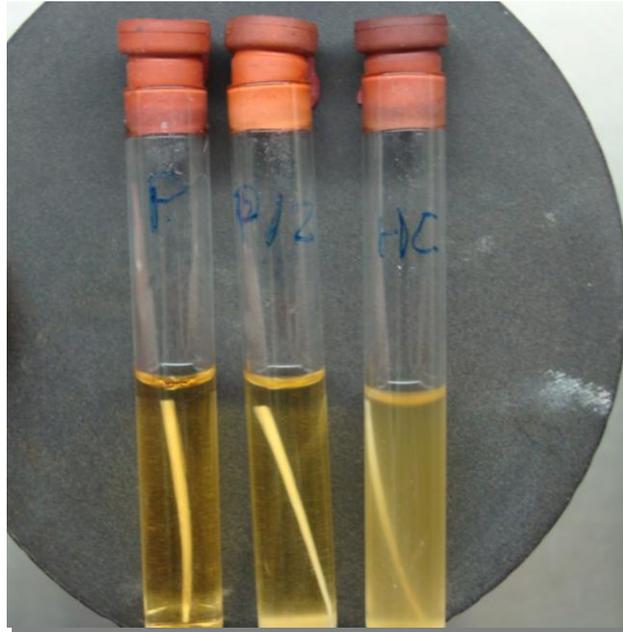


Figura 5 – Verificação da ausência/presença de turvação nos diferentes grupos

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* SigmaStat, versão 2.0. Foi aplicado o teste do qui-quadrado para a avaliação dos grupos em relação ao crescimento bacteriano. A comparação entre os grupos em relação às proporções de resultados negativos da cultura foi realizada por meio do teste z. Foi estabelecido o intervalo de confiança de 95%, com $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Concentração inibitória mínima

O extrato etanólico de própolis apresentou atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*. A CIM observada foi de 4,23mg/mL ou 0,04%.

5.2 Estudo *ex vivo*

Os resultados referentes às freqüências relativa e absoluta dos canais radiculares tratados com as diferentes soluções, em relação à inibição do crescimento de *Enterococcus faecalis*, são apresentados na Tabela 1 e ilustrados na Figura 6. Para essa avaliação foram utilizadas soluções hidroalcoólicas de própolis em concentrações duas e quatro vezes maior que a CIM, ou seja, 8,46mg/mL e 16,85mg/mL, respectivamente.

Tabela 1 - Freqüência de canais radiculares contaminados por *E. faecalis* após o tratamento com soluções hidroalcoólica de própolis e hidróxido de cálcio

Soluções	Crescimento Positivo	Crescimento Negativo
Hidróxido de cálcio 10%	86,7% (n=13)	13,3% (n=2)
Própolis 0,08% (8,46mg/mL)	80,0% (n=12)	20,0% (n=3)
Própolis 0,16% (16,85mg/mL)	26,7% (n=4)	73,3% (n=11)

A análise estatística revelou diferença significativa (teste qui-quadrado, $p < 0,001$) entre os resultados relativos ao crescimento bacteriano para as diferentes soluções. A redução bacteriana no grupo da própolis 0,16% foi significativamente maior quando comparada aos grupos em que foram utilizadas as solução de hidróxido de cálcio (teste z, $p = 0,003$) e própolis 0,08% (teste z, $p = 0,010$). Na comparação entre os grupos das soluções de hidróxido de cálcio 10% e própolis 0,08%, não foi constatada diferença significativa quanto à capacidade de inibição do crescimento de *E. faecalis* (teste z, $p = 0,998$).

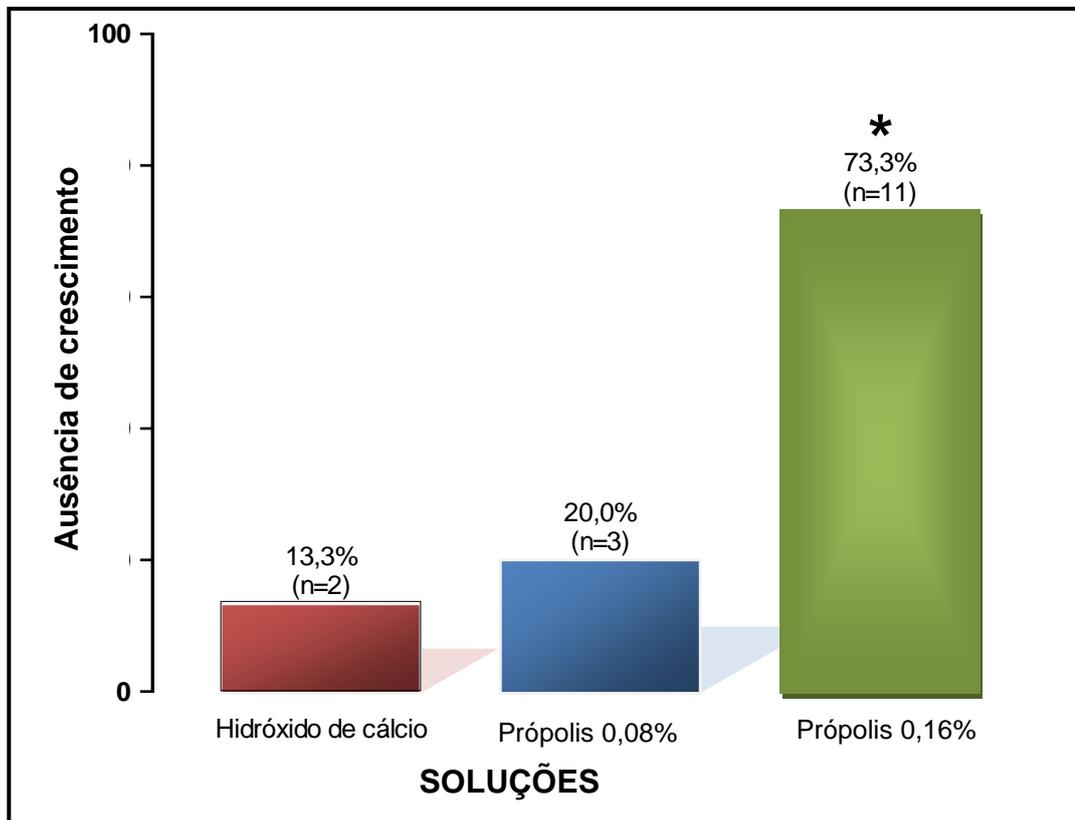


Figura 6 – Inibição de *Enterococcus faecalis* nos condutos radiculares tratados pelas diferentes soluções. *Diferença significativa em relação ao hidróxido de cálcio e própolis a 0,16% (teste z, $p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento das pesquisas microbiológicas possibilitou o conhecimento de várias espécies de microrganismos que puderam ser categorizados em virtude de suas particularidades, ocasionando um progresso nas investigações científicas em relação aos medicamentos para o combate dos mesmos. Porém, o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos acarretou na seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos. Medidas para minimizar ou resolver esse problema precisam ser tomadas, como o uso racional de medicamentos, o desenvolvimento de pesquisas para compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e à busca por novas drogas, sejam de origem sintéticas ou naturais.

As drogas de origem natural são utilizadas há muito tempo na prevenção e tratamento de doenças. Na Odontologia, os estudos sobre fármacos de origem natural ainda encontram-se em estágios iniciais, mas se observa nos últimos anos, a intensificação dessas investigações, haja vista o aumento do número de publicações em relação ao tema.

Dentre as drogas de origem natural, destaca-se a própolis de *Apis mellifera*, substância de onde foram selecionados vários compostos de valor agregado que apresentam propriedades desejáveis para um fármaco: antimicrobiana, antifúngica e cicatrizante (MATSUNO, 1997; PEREIRA, 2002).

Os processos químico-físicos de extração da própolis possibilitaram a identificação de mais de 200 compostos presentes em amostras de diversas regiões destacando-se ácidos graxos e fenólicos, flavonóides, alcalóides, naftaleno, etc. (GREENAWAY *et al.*, 1991; BANKOVA *et al.*, 1995, SALATINO *et al.*, 2005). A literatura é consensual em dizer que a composição da própolis é dependente de sua origem vegetal, portanto de sua origem geográfica, bem como à sua fenologia hospedeira (MARCUCCI *et al.*, 1996; BANKOVA *et al.*, 1995; KOO e PARK, 1996; PARK *et al.*, 1997). Assim, a variação na quantidade de compostos encontrados em própolis de diferentes regiões poderia acarretar em variados graus de atividade terapêutica da substância (PARK *et al.*, 2002, KUMAZAWA *et al.*, 2003, SALATINO *et al.*, 2005) e a padronização dessas amostras torna-se essencial para a sua efetiva utilização (STEPANOVIC *et al.*, 2003; KOSALEC *et al.*, 2005).

A atividade antimicrobiana da própolis está relacionada à presença de fenóis e polifenóis, substâncias aromáticas das quais derivam as flavonas, flavonóides e flavonóis que têm ação sobre a parede celular das bactérias (COWAN, 1999; KOO *et al.*, 2000 ; BANKOVA *et al.*, 2000). Em nosso estudo foi utilizada a própolis verde nativa de Mato Grosso do Sul. Não foi realizada análise cromatográfica, uma vez que foi utilizada a mesma própolis avaliada no trabalho de Parma-Neto (2008), a qual apresentou níveis significativos de flavonóides, substâncias indicadas como responsáveis pela ação antimicrobiana.

As avaliações da própolis na Odontologia envolveram microrganismos que estão relacionados à cárie dentária, às doenças gengivais e à manutenção de doenças endodônticas (ZÁRATE-PEREIRA, 1999; ZÁRATE-PEREIRA, 2003; KOO *et al.*, 2000, DE-CARLI, 2007; REZENDE *et al.*, 2008). Os resultados em relação à essa substância são expressivos, porém, a metodologia e a concentração da substância foi variável de um trabalho para o outro, sendo assertiva entre os autores que o processo de extração e o conhecimento dos seus componentes devam ser estudados para comprovar a sua eficácia terapêutica.

Uma preocupação presente no estudo de uma substância refere-se à possível citotoxicidade e alteração morfológica do tecido dentário. Em relação a esse aspecto, a literatura é incisiva quanto à ausência de sinais e sintomas indesejáveis pelo uso da própolis, inclusive em tecido conjuntivo. Os estudos de Geraldini *et al.* (2000) e Al-Shaher *et al.* (2004) demonstraram, respectivamente, a alteração da estrutura dentinária à medida que as concentrações de EEP aumentaram e a baixa toxicidade da própolis sobre as células da polpa e do ligamento periodontal, conceitos que também contribuíram para a construção de nosso estudo. A proposta foi em trabalhar com concentrações reduzidas do EEP verde, que atingissem o objetivo proposto de eliminar o microrganismo testado, levando-se em consideração a possibilidade da continuidade do presente trabalho *in vivo*, visto que sobre a dentina, a polpa e o ligamento periodontal, qualquer substância que não seja dotada da propriedade de biocompatibilidade e baixa toxicidade não pode ser usada sobre esses tecidos.

Assim, tendo em vista os estudos sobre a própolis em diversas áreas da ciência odontológica e a escassez de investigações na Endodontia, aliada à comprovada ação antibacteriana dessa substância e a resistência do *E. faecalis* nas infecções refratárias de origem endodôntica, fomos impulsionados a testar a

hipótese que apresentamos em nosso estudo. Nessas infecções, sobressaem-se os microrganismos dessa espécie, pois desenvolveram mecanismos de defesa capazes de resistir ao arsenal de fármacos comumente utilizados com sucesso na Endodontia sobre outras espécies de microrganismos (REIT, 1987; LEONARDO, 1999; TRONSTAD *et al.*, 1990; SUNDQVIST, 1992; PINHEIRO *et al.*, 2003; ESTRELA, 2004).

Paralelamente a esses estudos, outras pesquisas foram realizadas com o objetivo de verificar a ação de substâncias antimicrobianas utilizadas em Endodontia, sejam agentes de irrigação ou medicação intra-canal, sobre o *E. faecalis*. (KOO *et al.*, 2000; EVANS *et al.*, 2002; FERRARI *et al.*, 2005; ESTRELA *et al.*, 2007; ONCAG *et al.*, 2006; GEIJERSSTAM *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2008; AWAWDEH *et al.*, 2008); não obstante a metodologia utilizada em cada um deles tenha sido diferente. O *Enterococcus faecalis* foi capaz de resistir aos compostos antimicrobianos como o hipoclorito de sódio, solução de clorexidina 2%, água ozonizada, a solução de hidróxido de cálcio e à própolis, quando submetido ao desafio em diferentes tempos e concentrações. Em alguns estudos, a própolis utilizada isoladamente (GOMES *et al.*, 2003; AURICCHIO *et al.*, 2006; ONCAG *et al.*, 2006; AWAWDEH *et al.*, 2008) ou em associação a outros fármacos (COSTA *et al.*, 2008) surtiu resultado esperado com a inibição do crescimento dessas células. Cabe lembrar que a origem da própolis e sua concentração foram variáveis nos estudos realizados.

Nosso estudo é o primeiro a avaliar a ação da própolis sul-mato-grossense contra essas bactérias. Nessa modalidade de investigação, o primeiro passo para se verificar a ação antibacteriana é a determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM. O método escolhido para a determinação da CIM foi o da microdiluição, pois é o mais empregado para esse tipo de estudo (AL-SHAHER, 2004; SAWAYA *et al.*, 2004; ESTRELA, 2004; PARMA-NETO, 2008; AWAWDEH *et al.*, 2008).

Sendo a própolis uma substância gomosa, ela requer diluição numa solução onde os seus componentes possam encontrar-se livres para promoverem a sua ação antibacteriana, antitumoral ou antioxidante. Assim, a literatura recomenda a diluição em etanol, como demonstraram estudos realizados anteriormente por Koo *et al.* (2000), Stepanovic *et al.* (2003), Sawaya *et al.* (2004) e Kosalec *et al.* (2005). Outros diluentes têm sido utilizados, como o DMSO (KOO *et al.*, 2005) e o álcool de cereais (PARMA-NETO, 2008). A fim de manter a fidelidade de Parma-Neto em

2008, uma vez que utilizamos a mesma própolis, à partir da solução-mãe obtida no Laboratório de Química da UFMS, realizamos as diluições seguintes com álcool de cereais, no Laboratório de Microbiologia da mesma instituição.

A diluição em álcool é necessária para liberação da sua parte apolar, pois na parte polar encontram-se os fenóis e polifenóis, onde estão incluídos os flavonóides. Dependendo da quantidade de diluição, os EEP podem apresentar concentrações variadas (MARCUCCI, 1996; MARCUCCI *et al.*, 1996, GREENAWAY *et al.*, 1991). A diluição das soluções visa obter a menor quantidade possível de álcool, de forma a não lesar e manter a saúde do tecido onde essa substância será aplicada *in vivo*. Foi um dos objetivos desse estudo obter valores mínimos de diluição da própolis que pudessem ser eficazes no papel antimicrobiano contra o *E. faecalis* (ATCC 29212). Os resultados revelaram o valor da CIM de 0,04%.

Uma vez verificada a ação antimicrobiana *in vitro*, continuamos a investigação com o teste *ex vivo*. Os dentes extraídos foram submetidos ao preparo dos canais radiculares para remoção dos restos de tecido pulpar e promover a sua limpeza e modelagem, simulando todas as etapas protocolares de um tratamento endodôntico (ONCAG *et al.*, 2006; ESTRELA *et al.*, 2007; LOVE, 2007). Após os preparos dos espécimes, a cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) foi repicada conforme as normas para testes de sensibilidade antimicrobiana (NCCLS, 2003 norma M7-A06). Nos estudos *in vitro* e *ex vivo* com *E. faecalis*, têm sido utilizadas células bacterianas catalogadas ou coletadas diretamente dos canais radiculares e colocadas para crescer em meio seletivo (MOLANDER *et al.*, 1998; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; LOVE, 2001; EVANS *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2003; ESTRELA, 2004; FERRARI *et al.*, 2005; CHIVATXANRANUKUL *et al.*, 2008). No que se refere ao estudo de antimicrobianos em Odontologia, observou-se nos trabalhos referidos que a concentração de células bacterianas é variável, sendo ajustadas na escala MacFarland (LOVE, 2001; EVANS *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2003; KAYAOGLU *et al.*, 2005). Os espécimes utilizados foram dentes pré-molares unirradiculares, padronizados num comprimento de 16mm e instrumentados até a lima de diâmetro 50, o que permitiu o preenchimento do conduto com um volume de 10 μ L que continha a concentração de 10⁶ células bacterianas.

A fim de se ter parâmetros relacionados, optamos em comparar a possível ação *ex vivo* da própolis com uma das substâncias indicadas no tratamento de

infecções refratárias, o hidróxido de cálcio, conforme relataram Evans *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003; Oncag *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008; Awawdeh *et al.*, 2008.

Na fase *ex vivo*, foram utilizadas concentrações duas e quatro vezes maiores que a CIM, visto que no processo de obtenção desta, a quantidade de células bacterianas (10^4) por poço foi cem vezes menor e essa concentração foi ajustada em virtude da anatomia dos canais radiculares testados. A concentração na fase *ex vivo* foi aumentada devido as características estruturais da dentina e a possibilidade de não ocorrer contato direto entre as bactérias e a solução. Estudo de soluções em experimentos *in vivo* e *ex vivo*, em concentrações superiores à CIM, é procedimento metodológico respaldado pela literatura em trabalhos semelhantes (ZÁRATE-PEREIRA, 1999; ZÁRATE-PEREIRA, 2003, DE-CARLI, 2007).

Os estudos realizados com fármacos *in vitro*, quer sejam com soluções para irrigação dos canais radiculares, quer sejam como medicação intra-canal, utilizam de metodologia – halo de inibição, ausência/presença de turvação com tempos experimentais variáveis de minutos até dias, conforme descreveram Stepanovic *et al.*, 2003; Al-Shaher *et al.*, 2004 ; Auricchio *et al.*, 2006; Oncag *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008, Awawdeh *et al.*, 2008. Por esse motivo o presente estudo, limitou-se a escolher o tempo experimental de 48 horas. Cabe salientar que estudos recentes avaliaram o Ca(OH)_2 também no tempo experimental de 48 horas (GOMES *et al.*, 2003; ONCAG *et al.*, 2006; ESTRELA *et al.*, 2007); além disso a própolis é eficaz como antimicrobiano nas primeiras 24 a 48 horas de sua utilização (ZÁRATE-PEREIRA, 1999; ZÁRATE-PEREIRA, 2003; DE-CARLI, 2007).

As soluções de própolis a 0,08% e Ca(OH)_2 10% não foram capazes de inviabilizar o crescimento de *E. faecalis* no interior dos condutos radiculares. Porém, na concentração de 0,16%, a solução de própolis inibiu significativamente o crescimento bacteriano, quando comparada à concentração de 0,08% ($p=0,010$) e Ca(OH)_2 10% ($p=0,003$) . Nessa concentração, que apresenta quatro vezes o valor da CIM, houve ausência de crescimento em 73,3% dos condutos radiculares, redução superior às soluções de própolis 0,08% e Ca(OH)_2 10%, que inibiram o crescimento em 20,0% e ,13,3% dos condutos radiculares, respectivamente. Os resultados obtidos são satisfatórios quando comparados aos apresentados por Oncag *et al*, em 2006, que conseguiu inibir o crescimento do *E. faecalis* com EEP a 10%, utilizando a mesma técnica de diluição.

Embora seja uma medicação de demora utilizada com sucesso no controle microbiano em Endodontia, o hidróxido de cálcio 10% não foi capaz de promover a inibição do crescimento das células bacterianas, quando comparado às duas soluções hidroalcoólicas de própolis. Atribuímos a inibição do crescimento das células pela própolis de *Apis mellifera* nas concentrações descritas, à presença de fenóis e polifenóis, pois a origem dessa matéria-prima é a mesma daquela utilizada nos trabalhos de De-Carli (2007) e Parma-Neto (2008), sendo elencado por esse último autor, através da CLAE, a presença desses compostos relacionados à atividade antimicrobiana.

Interessante notar que na concentração de 0,08%, duas vezes superior à CIM, a inibição do crescimento bacteriano não foi significativo. Entretanto, devemos considerar que no experimento *in vitro*, há contato direto da bactéria com a própolis. No interior dos condutos radiculares, a estrutura dentinária pode interferir nesse contato, além dos componentes da dentina, como cálcio, fosfato, colágeno, que de certa forma, podem ter interferido na ação da própolis sobre as bactérias, nessa concentração.

O mecanismo de resistência e susceptibilidade do *E. faecalis* ainda é instrumento de investigação, embora alguns conceitos estejam estabelecidos. Nosso trabalho contribui, nesse sentido, com a possibilidade de uso de mais uma substância no tratamento das infecções refratárias de origem endodôntica, com envolvimento dessa bactéria. A vantagem do emprego da própolis integra o fato de se tratar de uma substância natural, com efetiva comprovação antibacteriana e biocompatível. Colabora também esse experimento em instigar futuros estudos *in vivo* que possam possibilitar a efetivação do uso da própolis de *Apis mellifera* no âmbito clínico, neste caso, no tratamento das infecções refratárias de origem endodôntica.

7 CONCLUSÕES

De acordo com as análises dos resultados deste estudo experimental, pode-se concluir:

- a) A própolis de *Apis mellifera*, do tipo verde, oriunda do estado de Mato Grosso do Sul, apresenta ação antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, em ambiente *in vitro*;
- b) Na concentração quatro vezes superior à concentração inibitória mínima, a própolis foi significativamente superior ao hidróxido de cálcio quanto à capacidade de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis* no interior de condutos radiculares.

REFERÊNCIAS¹

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(5):359-61.

Auricchio MT, Bugno A, Almodóvar AAB, Pereira TC. Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(3):209-12.

Awawdeh L, AL-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Aust Endod J*. 2008; 34(1):1-7.

Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. *Z Naturforsch C*. 1995; 50:167-72.

Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000;31: 3-15.

Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2008; 41(10):873-82.

¹ Conforme *International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style)* – Grupo de Vancouver .

Costa EMMB, Esmeraldo MRA, Carvalho MGF, Daniel RLDP, Pastro MF, Silva Júnior FL. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e de substâncias utilizadas em Endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2008; 8(1):21-5.

Cowan MM. Plant product as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12(4): 564-82.

De Carli AD. Capacidade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* associada ao fluoreto de sódio no controle do biofilme dental. [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2007.

Estrela C. Ciência Endodôntica. São Paulo: Artes Médicas, 2004.

Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. Int Endod J. 2007; 40(2):85-93.

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

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. Int Endod J. 2005; 38 (6):372-80.

Geijersstam AHR, Ellington MW, Woodford N, Haapasalo M. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. Oral Microbiol Immunol. 2006; 21:164-8.

Geraldini CAC, Salgado EGC, Rode SM. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária- avaliação ultra-estrutural. Rev Fac Odontol São José dos Campos. 2000; 3(2): 37-42.

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 dentine *in vitro*. Int Endod J. 2003; 36(4): 267-75.

Greenaway W, May J, Scaysbrook T, Whatley FR . Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. Z Naturforsch C. 1991; 46(1-2):111-21.

Ikeno K, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res. 1991; 25(5):347-51.

Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. Int Endod J. 2005; 38(6):389-96.

Koo H, Park YK. Investigaç o do teor de flavon ides nas pr opolis comerciais. Rev Bras Apicultura. 1996; 6(6):6-7.

Koo H, Cury JA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Ikegaki M, Park YK. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. Caries Res. 2002; 36(6):445-8.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PI, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000; 45:141-8.

Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and *tt*-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. J Dent Res. 2005; 84(11):1016-20.

Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, Vladimir-Knezevic S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta Pharmacol 2005; 55:423-30.

Kumazawa S; Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chem. 2003; 8:329-39.

Leonardo MR. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de pastas utilizadas em Endodontia. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1999; 53(5):367-70.

Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001; 34(5):399-405.

Love RM. Hemin nutritional stress inhibits bacterial invasion of radicular dentine by two endodontic anaerobes. Int Endod J 2007; 40(1):94-9.

Marcucci MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Quím Nova. 1996; 19(5):529-35.

Marcucci MC, De Camargo FA, Lopes CMA. Identification of aminoacids in brazilian propolis. Z Naturforsch C. 1996; 51(1-2):11-4.

Martinez-Silveira G, Godoy AG, Torriente RO, Ortiz MCP, Cuellar MAF. Estudio preliminar sobre los efectos del propolan en el tratamiento de la gengivite crônica y de ulceras bucales. Rev Cubana Estomatol. 1988; 25(3):36-44.

Matsuno T. O efeito terapêutico da própolis. Trad. Y. Odo. São Paulo: Nair Tazue Itice, 1997.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J.1998; 31(1):1-7.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 16th informational supplement. NCCLS 2003 document M7-A06, 23(2).

Oncag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. Gen Dent. 2006; 54(5):319-22.

Park YK, Alencar SM, Scamparini ARP, Aguiar CL. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. Cienc Rural Santa Maria. 2002; 32(6):997-1003.

Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL. Comparison of the flavonoid contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. Arq Biol Tecno.1 1997; 40(1): 97-106.

Parma Neto A. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos hidroalcóolicos de própolis de *Apis Mellifera* sobre biofilme e cepas periodontopatogênicas. [Dissertação]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008.

Pereira AS, Seixas FRM, Aquino Neto FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e perspectivas futuras. *Quím Nova*. 2002; 25(2):321-6.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root –filled with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003; 36(1):1-11.

Reit C. Decision strategies in endodontics: on the design of a recall program. *Endod Dent Traumatol*. 1987; 3(5):233-9.

Rezende GPSR, Costa LRRS, Pimenta FC, Baroni DA. In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis and calcium hydroxide: a preliminary study. *Braz Dent J*. 2008; 19(4):301-5.

Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of brazilian propolis. *eCam*. 2005; 2(1):33-8.

Sawaya ACHF, Souza KS, Marcucci MC, Cunha IBS, Shimizu MT. Analysis of the composition of brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. *Braz J Microbiol*. 2004; 35(1-2):104-9.

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

Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic-Vlahovic M. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res.* 2003; 158 (4):353-7.

Sundqvist G. Ecology of root canal flora. *Journal Endod.* 1992; 18(9):427-30.

Sundqvist G, Figdor D, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and out-come conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 5(1):86-93.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia.* 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Int Endod J* 1990; 23(1):73-7.

Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *eCam.* 2006; 3(2):249-54.

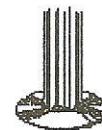
Zárate-Pereira P. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%, fluoreto de sódio 0,2% e própolis acrescida de fluoreto de sódio 0,05% sobre níveis salivares de estreptococcus do grupo mutans em pacientes cárie-ativos. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1999.

Zárate-Pereira P. Estudo *in situ* da própolis de *Apis Mellifera* no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2003.

Zender M, Guggenheem B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. Int Endod Journal 2009, 42(4):277-87.



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS /CEP/ UFMS



CI Nº 031/2007
Data: 31/07/2007

Do(a): Comitê de Ética em Pesquisa/CEP/UFMS

Para: Andréia Carla Franchini Melani

Ref.: Projeto nº 992/2007 intitulado: "*Utilização da própolis de Apis mellifera em diversas concentrações sobre Enterococcus faecalis: estudo in vitro*"

Prezada Pesquisadora,

Estamos encaminhando a V.Exa. documentos que fazem parte do Protocolo de Pesquisa supra citados sob sua responsabilidade foi Aprovado, com a seguinte recomendação:

- 1) Anexar cronograma e orçamento;
- 2) Informar o telefone do Comitê de Ética/CEP (067) 3345-7187 no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido/TCLE.

Atenciosamente,

~~Prof. Odair Pimentel Martins~~
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 992 da Pesquisadora Andréia Carla Franchini Melani intitulado “Utilização da própolis de Apis mellifera em diversas concentrações sobre Enterococcus faecalis: estudo in vitro”, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 31 de julho de 2007, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Odair Pimentel Martins

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 31 de julho de 2007.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Campo Grande, 12 de fevereiro de 2007.

Prezado(a) Senhor(a):

Você está sendo convidado(a) à participar de uma pesquisa que será realizada pela mestrande Andréa Carla Franchini Melani, cirurgiã-dentista, aluna do Curso de Pós-graduação do Programa de Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste; Área de concentração: Tecnologia e Saúde; Linha de Pesquisa: biomateriais – estudo de biocompatibilidade e aplicações cujo título é a **Utilização da Propolis de *Apis mellifera* em diversas concentrações sobre *Enterococcus faecalis*: estudo *in vitro* (projeto 922/2007).**

Objetivo: o objetivo desta pesquisa é propor, a partir deste ensaio laboratorial, estudos indicativos do uso da própolis como medicação intra-canal de demora no tratamento das infecções refratárias de origem endodôntica.

Justificativa: através deste estudo, ampliar-se-ão as avaliações antibacterianas da própolis de *Apis mellifera*, visto não haver na literatura, avaliações específicas contra *E. faecalis*, principal microrganismo identificado nas infecções refratárias de origem endodôntica e com a confirmação dessa hipótese, abre-se a possibilidade da utilização da própolis como uma medicação intra-canal, capaz de inviabilizar o crescimento de um microrganismo responsável pela manutenção de infecção nos canais radiculares.

Para a realização do presente estudo será necessária a utilização de dentes naturais extraídos, os quais após o término do estudo serão descartados através de processo de incineração. O dente é um órgão do corpo humano e, como tal, está submetido à Lei de Transplantes Brasileira 9 lei 9434 de 04/02/1997), a qual prevê pena de 3 a 8 anos de reclusão e multa para quem remover, post-mortem, órgãos, tecidos e partes do corpo humano de pessoas não identificadas. O Código Penal também prevê pena de 1 a 3 anos de reclusão para aqueles que violarem sepultura (Arttigo 210) e o Conselho Nacional de Saúde exige os termos de consentimento livre e esclarecido dos sujeitos como forma de “respeito à dignidade humana”, bem como a exigência de que qualquer material humano utilizado em pesquisa seja doado e tenha a sua procedência devidamente identificada (resolução 196 de 10/10/1996).

Assim, este documento tem por objetivo, solicitar à V. Sa a doação de possíveis dentes (pré-molares inferiores) que sejam indicados para extração, conforme planejamento do seu Ortodontista, salientando-se que o nome do doador será mantido sob sigilo, e que não haverá nenhum bônus ou ônus para o doador.

Vale enfatizar que todos aqueles que concordarem em participar desse trabalho, assinarão autorização (em anexo) e que, a sua participação é decorrente de sua livre decisão após receber todas as informações que julgar necessárias. Caso não queira participar, o seu tratamento não sofrerá nenhum prejuízo.

Para informações adicionais, o senhor(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável pelo fone (67) 33261497 ou email (andreamelani@uol.com.br) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul(CEP/UFMS – 67 – 33457187). Esperando contar com seu apoio, desde já agradecemos.

Andréa Carla Franchini Melani
CRO/MS 3044

Autorização:

Após ter sido informado sobre a pesquisa intitulada: **Utilização da Propolis de *Apis mellifera* em diversas concentrações sobre *Enterococcus faecalis*: estudo in vitro (projeto 922/2007)**, autorizo a doação dos dentes indicados para extração, para que sejam utilizados pela pesquisadora para fins desta pesquisa.

Nome por extenso do doador

assinatura
RG :

Nome por extenso do responsável,
caso o doador seja menor de idade

assinatura
RG:

Data: _____