

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOÍAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MÔNICA MISAÉ ENDO

**Efeito Antibacteriano de Extrato de Própolis Vermelha e Verde em
Canais Radiculares Infectados por *Enterococcus faecalis***

Goiânia
2015

MÔNICA MISAÉ ENDO

**Efeito Antibacteriano de Extrato de Própolis Vermelha e Verde em
Canais Radiculares Infectados por *Enterococcus faecalis***

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

Linha de Pesquisa: Perspectiva em Odontologia Clínica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Goiânia

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Endo, Mônica Misaé

Efeito antibacteriano de extrato de própolis vermelha e verde em
canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis* [manuscrito] /
Mônica Misaé Endo. - 2015.

79 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
de Odontologia (FO) , Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de tabelas.

1. IRRIGANTES. 2. hipoclorito de sódio. 3. própolis. 4. *Enterococcus
faecalis*. 5. endodontia. I. Estrela, Carlos , orient. II. Título.

Mônica Misaé Endo

Efeito antibacteriano de extrato de própolis vermelha e verde em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis*.

Dissertação defendida e aprovada em 20/03/2015, pela Banca Examinadora constituída por:



Prof. Dr. Carlos Estrela
Presidente da Banca



Prof. Dr. Daniel de Almeida Decúrcio
Membro da Banca



Prof. Dr. Orlando Aguirre Guedes
Membro da Banca

Dedicatória

Dedico essa conquista como gratidão às pessoas mais importantes da minha vida. Aos meus amados pais, Tadao e Midori, exemplos de pais e pessoas, com corações generosos, fizeram da arte de educar seus filhos uma missão de vida. Ao meu marido Bruno companheiro, confidente, minha alma gêmea. Aos meus filhos Diego e Bruna pelo amor e o simples fato de vocês estarem presente em minha vida. Amo vocês até onde a alma alcança. É muito gratificante fazer parte dessa família.

Agradecimentos

*Primeiramente à **Deus**, fonte inesgotável de amor e pelo dom da vida. Sempre guia meu caminho com esperança, saúde e luz para que eu supere todas as dificuldades encontradas pelo caminho. Pelo seu infinito amor e pela misericórdia, tornou possível a concretização deste sonho com pessoas que se fizeram anjos em minha vida. Obrigada, Senhor pelo aconchego da sua presença e por mais esta **vitória!***

Salve Rainha

Salve Rainha,

Mãe de Misericórdia,

vida e doçura esperança nossa salve!

A vós bradamos degredados filho de Eva.

A vós suspiramos gemendo e chorando neste

vale de lágrimas.

Eia pois advogada nossa

esses vossos olhos misericordiosos a nós volvei,

e depois deste desterro mostrai Jesus bendito fruto em vosso ventre,

ó clemente,

ó piedosa

ó doce e Santa Virgem Maria.

Rogai por nós Santa mãe de Deus.

Para que sejamos sempre livre do pecado,

protegido de todos os perigos

e dignos da promessa de Cristo.

*Aos meus pais, **Tadao e Midori** por me ensinarem a viver com dignidade e simplicidade. Iluminam meu caminho com afeto, dedicação, paciência, oração e muito amor. Abdicou das próprias vontades para ver seus filhos felizes, meu porto seguro e alicerce em todos os momentos de minha vida. Para que possamos alcançar nossos objetivos, além da presença constante de Deus, precisamos estar apoiados em pais como vocês, felizmente posso dizer que mais uma vez pude contar com vocês. **Amo muito vocês!***

*Ao meu marido, **Bruno**, companheiro, amigo, confiante que me compreende, respeita e apoia. O seu amor e o simples fato da sua presença em minha vida e imprescindível. Obrigada por fazer parte da minha vida e caminhar ao meu lado. **Amo você!***

*Aos meus filhos, **Diego e Bruna** pelas orações e compreensão e amor. Vocês foram a motivação para o início, o andamento e o término na construção desse ideal, por amá-los incondicionalmente. Só posso dizer muito obrigado e desculpe as ausências, mesmo quando estava presente. A vocês dedico não apenas este trabalho, mais a minha vida. **Amo muito vocês!***

*À minha irmã **Lilian** pela cumplicidade, amizade e respeito. Obrigada por compartilhar essa alegria. **Amo você!***

*À minha sogra **Adeir**, pelos momentos de convivência, exemplo de perseverança e firmeza. Obrigada por tudo o que você sempre fez e faz por mim e por embelezar esse momento mágico e especial na minha vida. **Amo você!***

*À minhas **primas e cunhada** que torceram pelo meu sucesso com orações, paciência e palavras de carinho em todos os momentos especiais que vivenciamos. Vocês são fundamentais na minha vida. Obrigada pela amizade sincera. O que seria de mim sem vocês. **Amo vocês!***

Família é dom divino da união de pessoas que se amam!!

*Em especial, ao **Prof. Dr. Carlos Estrela**, meu orientador.*

Obrigada pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, confiança, compreensão as minhas dificuldades e aflições, incentivo, paciência, dedicação, generosidade, carinho, disponibilidade, amizade, exemplo de tolerância, competência e humanismo em todos os momentos que busquei seu auxílio. Meu respeito, admiração e reconhecimento pela sua participação direta e intensa nesse trabalho, grande passo da minha vida científica.

*Sou-lhe grata por participar da realização desse sonho e tenho orgulho de tê-lo como **Mestre**. Meu **eterno Mestre**. Meu eterno agradecimento.*

Obrigada pelo privilégio do seu convívio.

*À **Profa. Dra. Ana Helena Gonçalves de Alencar**, pela sensibilidade na transmissão do conhecimento, pela efetiva orientação durante o mestrado, incansável busca pela perfeição, ajuda e apoio nos momentos difíceis, pela sua amizade, respeito, carinho, doçura, que foram indispensáveis para minha formação. **Muito obrigada!***

Obrigada pelo privilégio do seu convívio.

Mestre, é aquele que caminha despertando sabedoria, estende a mão, não ensina fórmulas, regras, mas o questiona e desperta para a realidade.

Mestre é o professor que estimula, enriquece com sua presença, seu saber.

Mestre é aquele que tem a certeza de que tudo terá valido a pena se o aluno sentir-se feliz pelo que aprendeu.

*À Prof^a. Dr^a. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela, pela atenção dedicada à leitura deste trabalho, pelas sugestões propostas para o enriquecimento do mesmo e pela contribuição significativa na correção do trabalho. E pela valiosa contribuição, amabilidade e atenção dispensada durante o período experimental no laboratório de microbiologia. Meus sentimentos de amizade e respeito científico. **Muito obrigada!***

*Ao Prof. Dr. Daniel Almeida Decúrcio, pela solicitude dispensada a mim sempre que precisei, pelo carinho, pela sua disponibilidade e pela importante contribuição na minha formação. **Muito obrigada!***

*Ao Prof. Dr. João Batista de Souza, pela amizade demonstrada desde o primeiro dia, pelo exemplo de dinamismo, humanidade e pela contribuição de forma importantíssima para a melhoria do trabalho. **Muito obrigada!***

*Ao Prof. Dr. Júlio Almeida, pela amizade sincera, respeito, carinho, presteza, doação, cumplicidade, simpatia, liderança e disponibilidade sempre que solicitada. Obrigada pelo seu precioso auxílio, apoio na elaboração deste trabalho, constante estímulo na busca de uma evolução científica e pessoal e pelo privilégio de seu convívio diariamente Sem você eu não teria chegado ao final desta etapa. Que Deus abençoe você e sua família. **Muito obrigada!***

*Ao Prof. Dr. Satiro Watanabe, pela sua amizade e convívio diário. Tenho especial carinho e admiração pelo senhor. Obrigada por ter influenciado nesta grande conquista. Serei eternamente grata! **Muito obrigada.***

Ao Dr. Orlando Aguirre Guedes, pela simpatia, humildade e amizade demonstrada desde o primeiro dia, ainda como aluna especial. Agradeço-te profundamente os conselhos, carinho e ajuda dispensada a mim na elaboração do meu pré-projeto. Continue sendo essa pessoa e esse profissional incrível. Muito obrigada!

*Impossível exprimir com palavras a gratidão que tenho por vocês,
Pelo apoio recebido,
Muito obrigada!*

Aos **colegas de mestrado**, pelo carinho, amizade e companheirismo nesses dois últimos anos, que tornaram a convivência uma experiência prazerosa e inesquecível. **Muito obrigada!**

Ao colega **Iussif Mamede** pela amizade e experiência profissional compartilhada com desprendimento. **Muito obrigada!**

Aos colegas **Denise e Juliano**, pela inestimável ajuda durante o desenvolvimento experimental desse trabalho. O auxílio de vocês foi de fundamental importância. **Muito obrigada!**

Às minhas amigas **Alessandra e Sara** pela sabedoria de exercer a verdadeira oração da amizade, que sempre marcaram nossa convivência.

Alessandra Rossi, obrigada por me acolher em sua família com carinho, pelo apoio, atenção, orações, generosidade, companheirismo que se fizeram presentes em todos os momentos especiais que vivenciamos. E pela ajuda no desenvolvimento experimental.

Você minha amiga de fé
minha irmã camarada.
O seu coração é uma casa
de portas abertas, amiga
você é a mais certa das
horas incertas.
Não preciso nem dizer,
tudo isso que eu lhe digo,
mas é muito bom saber,
que você é minha amiga.

Amigo de Fé (Roberto Carlos)

“Nada na vida é por acaso”
Que Deus esteja sempre com você.

Sara Renovato, exemplo de Pós-graduanda obrigada pelo apoio, por disponibilizar do seu tempo, amabilidade, simpatia e contribuição importante na elaboração deste trabalho.

Vocês se tornaram muito importantes em minha vida. Agradeço a disponibilidade em me ajudar sempre quando precisei de vocês. Adoro vocês, meninas. Contem sempre comigo. Obrigada por serem tão especiais!

*À minha amiga **Mônica Grazielle**, há muitos anos que, embora fisicamente distante, sempre demonstrou apoio e pela disposição em sempre me ajudar. **Muito obrigada!***

*À minha amiga **Germana**, pela sua amizade, pelo conhecimento compartilhado, incentivo, apoio, experiência em todos os momentos que vivenciamos. Você é uma excelente pessoa e profissional. **Adoro você e obrigada por ser tão especial.***

*À minha amiga **Marisa**, pela convivência diária, carinho, zelo, amabilidade, competência e por me acompanhar em todos os momentos tristes e alegres. Sempre presente quando mais precisei, mesmo você estando atravessando um momento nada fácil em sua vida. Por quem tenho um carinho especial. Se aqui estou é graças a você. **Obrigada por ser tão especial!***

Aos meus colegas de trabalho professores da Unievangélica, pelo carinho, amizade, água benta, orações e incentivo em todos os momentos. Muito obrigada a todos vocês que se alegram com minhas vitórias. Graças a Deus tenho vocês!

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFG na pessoa da coordenadora Prof^{ra}. Dr^a. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa e todos os professores do programa e convidados, pelos ensinamentos e por esta oportunidade de crescimento profissional.

À secretária da pós-graduação Gláucia, pela orientação, amizade e sua ajuda para solucionar as dúvidas. Muito obrigada!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!!!!

Epigrafe

*Há duas formas para viver a sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.*

(Albert Einstein)

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito antibacteriano dos extratos alcoólicos de própolis vermelha a 30%, própolis verde a 40% e hipoclorito de sódio a 2,5% com diferentes protocolos de irrigação em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis*. Vinte e quatro dentes unirradiculares extraídos foram selecionados, os canais radiculares preparados e inoculados com *E. faecalis* durante 60 dias. Os dentes foram aleatoriamente distribuídos em 8 grupos experimentais (n=3) e 2 grupos controles (n=3). Em todos os grupos experimentais foi realizado preparo do canal radicular e dois protocolos de irrigação - irrigação ultrassônica passiva e irrigação convencional. Nos grupos 1, 3, 5 e 7 foi feito o preparo do canal radicular associado à irrigação convencional com própolis vermelha a 30%, própolis verde a 40%, hipoclorito de sódio a 2,5% e água destilada, respectivamente. Nos grupos 2, 4, 6 e 8 foi realizado o preparo do canal radicular associado a irrigação ultrassônica passiva e irrigados com as mesmas soluções descritas anteriormente. Os grupos 9 e 10 constituíram os controles – negativo (canais radiculares não contaminados) e positivo (canais radiculares contaminados sem tratamento). Amostras dos canais radiculares foram coletadas e imersas em 7 mL de BHI por um período de 48 horas, com incubação a 37°C. O crescimento bacteriano foi analisado pela turbidez do meio de cultura. Os resultados mostraram efetividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis vermelha a 30% e hipoclorito de sódio a 2,5%, quando utilizada irrigação convencional e irrigação passiva, somente após 20 minutos. Os protocolos de irrigação e as substâncias testadas não foram efetivos para eliminar a contaminação dentinária bacteriana com *E. faecalis*.

Palavras-chave: Irrigantes, hipoclorito de sódio, própolis, *Enterococcus faecalis*, endodontia.

Abstract

The objective of this study was to investigate the antibacterial effect of alcoholic extracts of 30% red propolis, 40% green propolis and 2.5% sodium hypochlorite in different irrigation protocols in root canals infected *Enterococcus faecalis*. Twenty-four extracted teeth with one root canal were selected, the prepared root canals and inoculated with *E. faecalis* for 60 days. The teeth were randomly divided into eight experimental groups (n = 3) and 2 control groups (n = 3). In all experimental groups were performed root canal preparation and two irrigation protocols - passive ultrasonic irrigation and conventional irrigation. In the groups 1, 3, 5 and 7 was made ready root canal associated with conventional irrigation to 30% propolis, 40% propolis, 2.5% sodium hypochlorite and distilled water, respectively. In groups 2, 4, 6 and 8 was performed root canal preparation associated with passive ultrasonic irrigation and irrigated with the same solutions described above. In the groups 9 and 10 were the controls - negative (root canals uncontaminated) and positive (root canals contaminated untreated). Samples of root canals were collected and immersed in 7 mL of BHI for 48 hours, incubated at 37 °C. The bacterial growth was assessed by turbidity of the culture medium. The results showed antibacterial effectiveness of the alcoholic extract of 30% red propolis and 2.5% sodium hypochlorite when used conventional irrigation and passive irrigation, only after 20 minutes. The irrigation protocols and the substances tested were not effective to eliminate bacterial dentin contamination with *E. faecalis*.

Keywords: Irrigation, sodium hypochlorite, propolis, Enterococcus faecalis, endodontics.

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AD	Água destilada
BHI	Brain Heart Infusion
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
BR	BioRace
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético Dissódico
EPVm	Extrato de Própolis Vermelha
EPVd	Extrato de Própolis Verde
<i>et al.</i>	e colaboradores
°C	grau Celsius
GO	Goiás
h	Horas
IUP	Irrigação Ultrassônica Passiva
Lt	Lote
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mL	Mililitros
mm	Milímetro
min	Minuto
MCR	Modelagem do Canal Radicular
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
nº	Número
%	Porcentagem
UFCs	Unidades formadoras de colônias

Lista de Figuras

Figura 1. Delineamento experimental.....	30
Figura 2. (A, B). Contaminação bacteriana em canais radiculares infectados para análise em MEV (aumento de 5.000 e 10.000 vezes)	33

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais	30
Tabela 2. Eficácia antibacteriana de soluções irrigadoras em canais radiculares infectados por <i>E.faecalis</i>	34

Sumário

1 Introdução	22
2 Objetivos	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivo específico	26
3 Material e Métodos	27
3.1 Micro-organismo teste	27
3.2 Preparo dos dentes	27
3.3 Delineamento experimental.....	28
3.4 Preparo para análise no microscópio eletrônico de varredura	32
4 Resultados	34
5 Discussão	35
6 Conclusão	41
Referências	42
Apêndice	48
Anexo	74

1 Introdução

Os micro-organismos constituem importantes agentes etiológicos para a infecção dos tecidos pulpare e periapicais (Takehashi *et al.*, 1965; Sundqvist *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 2005). O crescimento bacteriano é favorecido pela complexa anatomia interna dos canais radiculares, áreas inacessíveis aos instrumentos endodônticos, que representam um ambiente ideal para a colonização e estruturação de um biofilme bacteriano (Nair *et al.*, 2005; Ricucci, Siqueira. 2010). O biofilme bacteriano estrutura-se a partir da fixação dos micro-organismos em uma superfície sólida incorporados em uma matriz extra-celular, resistente às ações de agentes antimicrobianos o que favorece a manutenção do processo infeccioso e representa um especial desafio para o sucesso do tratamento endodôntico (Sundqvist *et al.*, 1998; Love *et al.*, 2001; Nair *et al.*, 2005; Estrela *et al.*, 2009).

Os *Enterococcus faecalis* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, frequentemente isolados em canais radiculares infectados de dentes que exibem patologia periapical. A capacidade de invadir os túbulos dentinários, serem resistentes aos agentes antimicrobianos e interferir nas defesas do hospedeiro revela o seu papel patogênico. Portanto, o uso de um irrigante endodôntico que possa promover o rompimento do biofilme é essencial durante o tratamento do canal radicular (Sjögren *et al.*, 1990; Estrela *et al.*, 1999; Estrela *et al.*, 2004; Sedgley *et al.*, 2006).

O processo de sanificação de canais radiculares infectados constitui-se de procedimentos que visam reduzir a população de micro-organismos e de detritos, com a ação mecânica dos instrumentos e ação química dos irrigantes endodônticos (Estrela *et al.*, 2003, 2004). Assim, diferentes agentes químicos auxiliares ao preparo do canal radicular têm sido propostos. A seleção de um irrigante ideal depende principalmente de sua efetividade sobre micro-organismos e de sua tolerância tecidual periapical (Estrela *et al.*, 2004). O hipoclorito de sódio é extensivamente usado em endodontia como solução irrigadora devido ao efeito antimicrobiano. O mecanismo de ação inclui alteração biossintética; destruição de fosfolipídios; formação de cloraminas que interferem no metabolismo celular; ação oxidativa com inativação enzimática na bactéria e degradação de ácidos graxos e lipídeos (Estrela

et al., 2002). Contudo, a extrusão desse irrigante pode causar intensas reações periapicais (Sermeño *et al.*, 2009).

Estudos em busca de melhorar a atividade antimicrobiana e biológica das soluções irrigadoras estimulou novos estudos em busca de alternativas naturais. Neste sentido, a própolis têm sido alvo de investigações, por apresentar propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante, anticancerígena, etc. (Burdock, 1998; Marcucci, 2001; Pereira *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2003; Adelman, 2005; Bittencourt, 2008). Em função de sua baixa toxicidade tem sido estudada como possível medicamento intracanal (Silva, 2004; Arruda, 2005; Costa *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2010).

Maia Filho *et al.* (2008) compararam a eficácia do hipoclorito de sódio a 5%, gel de clorexidina a 2% e extrato de própolis frente ao *E. faecalis* pelo teste de difusão em ágar. O extrato de própolis apresentou uma boa atividade antimicrobiana. Ehsani *et al.* (2013) compararam a atividade antimicrobiana da clorexidina a 2%, gel de Aloe Vera e extrato alcoólico de própolis a 15% e 40%. A própolis e o Aloe Vera mostraram efeito antibacteriano sobre *E. faecalis*. Koo *et al.* (2000) avaliaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar do extrato de própolis a 10% e arnica montana a 10% sobre quinze micro-organismos da microbiota endodôntica, dentre os quais o *E. faecalis*. O extrato de própolis inibiu significativamente os micro-organismos testados com maiores halos de inibição para o *Actinomyces ssp.*

A própolis é uma substância formada por material resinoso, de odor característico, elaborada pelas abelhas, a partir de diferentes partes da planta (ramos, pólen, brotos, exsudatos de árvores e resinas). Na colméia as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas, tendo como objetivo proteger sua colméia contra insetos, micro-organismos e no reparo de frestas ou danos à própria colméia. (Marcucci, 1995; Pereira *et al.*, 2002). Sua composição química é complexa, heterogênea com mais de 300 constituintes, dentre esses: ácidos graxos e ácidos fenólicos, ésteres, flavonóides, terpenos, aldeídos, alcoóis aromáticos e naftaleno que exercem uma importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas (Burdock, 1998; Pereira *et al.*, 2002; Lima, 2006; Lustosa, 2008). Os principais constituintes são os compostos fenólicos, que se caracterizam pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. Os compostos fenólicos são representados pelos flavonóides (flavonas, flavonóis e

isoflavonas) e ácidos fenólicos, os quais são responsáveis pela atividade contra vários micro-organismos patogênicos (Burdock, 1998; Banskota, 1998; Soares, 2002; Hayacibara *et al.*, 2005; Lima, 2006).

A coloração e a composição química da própolis dependem de sua procedência, ou seja, está relacionada diretamente com a flora da região visitada pelas abelhas (Pereira *et al.*, 2002; Adelman *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007; Lustosa *et al.*, 2008) e condições ambientais (Viuda Martos *et al.*, 2008). Sua coloração pode variar do marrom escuro, para esverdeada até o marrom avermelhado em função da flora de origem que promove uma variabilidade em sua composição química (Bankova *et al.*, 2000).

Park *et al.* (2000) classificaram as amostras da própolis brasileira em 12 tipos, baseado nas características físico-químicas, sendo cinco tipos no Sul, um no Sudeste e seis no Nordeste do Brasil. Recentemente foi encontrada no nordeste brasileiro, região de manguezais uma nova própolis, classificada como do tipo 13, denominada própolis vermelha (Daugusch *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2007).

As abelhas *Apis Mellifera* coletam na superfície da leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* (rabo de bugio) uma resina vermelha, que pelo teste cromatográfico verificou-se uma similaridade nas amostras coletadas dessa resina da *Dalbergia ecastophyllum* com a composição química da própolis vermelha. Portanto, a principal origem botânica da própolis vermelha é a *Dalbergia ecastophyllum*. A própolis vermelha possui componentes (isoflavonas), nunca antes encontrados em nenhuma espécie de própolis brasileira: *dihidroxiisoflavona*, *homopterocarpina*, *medicarpina* e *4,7-dimethoxy-2'-isoflavona*, que são responsáveis pela atividade antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (Daugusch *et al.*, 2006; Alencar *et al.*, 2007). A principal origem botânica da própolis verde é a *Bacharis dracunculifolia* conhecida como alecrim do campo, e o seu teor de flavonóides é relativamente baixo (Pereira *et al.*, 1999).

Nas amostras analisadas de própolis provenientes de diferentes regiões foi encontrada uma importante diferença em flavonóides totais após análises colorimétricas. Os resultados indicaram que a composição química da própolis, especialmente em relação ao teor de flavonóides totais é dependente de uma variedade de fatores (Almeida *et al.*, 1997). Esses flavonóides presentes na própolis agem na membrana ou parede celular da bactéria, causando danos funcionais e

estruturais (Scazzochio *et al.*, 2005). O extrato alcoólico de própolis vermelha apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, obtendo resultado positivo na inibição desse micro-organismo (Daugusch *et al.*, 2007). Alencar *et al.* (2007) também demonstraram uma notável atividade antimicrobiana da própolis vermelha contra os microrganismos *S. aureus* e *S. mutans*, determinada pela concentração inibitória mínima.

Além da propriedade antimicrobiana a própolis também possui baixa toxicidade em polpa dental e células do ligamento periodontal ou fibroblastos, resultando em > 75% de células viáveis (Al-Shaher *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). Kumar *et al.* (2014) verificaram efetividade antibacteriana com irrigação com extrato de própolis a 25%, e devido a baixa toxicidade poderia ser utilizada em canais radiculares de dentes decíduos.

No processo de sanificação de canais radiculares infectados, o ultrassom tem sido empregado em diferentes etapas, tais como irrigação ultrassônica, instrumentação, no auxílio à remoção de medicação intracanal e retro preparo nas cirurgias pararendodônticas (Rödig *et al.*, 2010). A irrigação ultrassônica consiste na agitação da substância irrigadora com um instrumento endodôntico fino acionado por aparelho de ultrassom e têm se mostrado eficiente, inclusive em áreas de istmos (Alves *et al.*, 2011, Van der Sluis *et al.*, 2007). Bhuva *et al.* (2010) relataram resultados satisfatórios com emprego da irrigação ultrassônica passiva em comparação para irrigação convencional, quando utilizada hipoclorito de sódio a 1% e solução salina. Em concordância com Harrison *et al.* (2010) que encontraram resultados satisfatórios com hipoclorito de sódio a 1% na irrigação ultrassônica passiva por um minuto em canais radiculares contaminados por *E. faecalis*.

A crescente busca na seleção de substâncias irrigadoras com ação antimicrobiana e que apresente tolerância tecidual assume papel importante para redução de bactérias presente no sistema de canal radicular. Considerando o potencial da própolis vermelha como um agente antibacteriano, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis vermelha a 30%, própolis verde a 40% e hipoclorito de sódio a 2,5% como solução irrigadora, quando submetidas à irrigação ultrassônica passiva em canais radiculares infectados com *E. faecalis*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito antibacteriano de diferentes substâncias químicas em diferentes protocolos de irrigação em canais radiculares infectados.

2.2 Objetivo específico

Comparar o efeito antibacteriano dos extratos alcoólicos de própolis vermelha a 30%, própolis verde a 40% e hipoclorito de sódio a 2,5% nos protocolos de irrigação ultrassônica passiva e convencional em canais radiculares infectados por *E. faecalis*.

3 Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Goiás (CAAE nº 37973314.9.0000.5083 - Anexo A).

3.1. Micro-organismo teste

O delineamento do trabalho utilizado foi similar a metodologia desenvolvida previamente (Estrela *et al.*, 2007). Uma cepa de *E. faecalis* procedente da *American Type Culture Collection* (ATCC 29212) foi utilizada como indicador biológico. A cepa bacteriana foi inoculada em 7 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e incubado a 37°C por 24 horas. A suspensão experimental foi preparada pelo cultivo da cepa em superfície de ágar (BHIA - brain heart infusion agar; Difco Laboratories), em condições de incubação similar a descrita anteriormente. Decorridas 24 horas, as células bacterianas foram suspensas em solução salina no intuito de alcançar uma concentração de aproximadamente 3×10^8 células mL⁻¹, ajustada ao padrão turbidez 1 de McFarland.

3.2. Preparo dos dentes

No estudo foram utilizados trinta dentes humanos unirradiculares extraídos com cimento intacto, do serviço de urgência da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO-UFG) e com indicação de exodontia por motivo (periodontal, protético ou outros). Os dentes extraídos foram estocados em frasco contendo solução de timol 0,2% e posteriormente imersos em hipoclorito de sódio 5%, por 30 minutos para remoção de tecidos orgânicos. Foram realizadas radiografias periapicais (Eastman Kodak. Comp., NY, USA) dos dentes nos sentidos vestibulo-lingual e proximal para confirmar presença de canal radicular único e ausência de variações anatômicas. Foram excluídos os dentes com obliteração do canal radicular e com dilaceração da raiz.

Após as radiografias iniciais, as coroas foram removidas sob contínuo jato de ar/água, com broca laminada Endo-Z (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) em alta

rotação. Comprimentos radiculares foram padronizados em 16 mm (do ápice radicular até o limite amelocementário). Os dentes foram esvaziados até o limite apical com instrumento K-flex nº15 (Maillefer, Ballaigues, Switzerland), sendo posteriormente recuados 1 mm para ajuste do diâmetro anatômico. O diâmetro anatômico dos dentes selecionados correspondeu aproximadamente a 350-400 micrômetros (diâmetro que corresponde a lima tipo K-file nº 35/40) penetrar e manter justa até o limite de trabalho. A seguir os canais radiculares foram preparados com sistema BioRace (FKG Dentaire, La Chaux-de Fonds, Switzerland) utilizando o instrumento BR5 40/0.04 (Debelian; Sydney, 2009). Foi realizada irrigação convencional com 3 mL de hipoclorito de sódio 2,5% com seringa ultradente 5 mL e cânula de irrigação Endo Eze (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA).

A seguir, os canais foram secos e preenchidos com EDTA a 17% (pH 7.2 – Biodinâmica, Ibiporá, PR Brasil) durante 3 minutos para remoção da *smear layer* e depois autoclavados por 30 minutos a 120° C.

3.3. Delineamento experimental

No modelo experimental, uma plataforma dividida foi usada durante o período de inoculação com o indicador biológico. A porção coronária do canal radicular de cada dente foi conectada em um fundo cortado de um micro tubo de polipropileno de 1,5mL do tipo Eppendorf (Cral, São Paulo, SP, Brasil) usando adesivo cianoacrilato (Super Bonder, Itapevi, SP, Brasil) para prevenir infiltração na conexão. A conexão dente-tubo foi inteiramente coberta com duas camadas de esmalte de unha (Risqué, Niasi Cosméticos, SP Brasil). Os espécimes (dentes acoplados com os tubos de polipropileno) foram mantidos em hipoclorito de sódio a 5% (Fitofarma, Goiânia, GO, Brasil) por 30 minutos, lavados em água esterilizada por 30 minutos e a seguir colocados dentro do meio de cultura BHI. Para assegurar a desinfecção, o aparato teste foi incubado a 37°C por 24 horas. Decorrido o período, nenhum crescimento bacteriano foi observado. Cinco mililitros do BHI esterilizado foram misturados a 5 mL do inóculo bacteriano, e os grupos experimentais e controle positivo foram inoculados com *E. faecalis* durante 15 dias, usando seringas esterilizadas com volume suficiente para preencher o canal radicular. Este procedimento foi repetido a

cada 72 horas, sempre utilizando cultura pura com 24 horas de preparo e ajustada ao padrão 1 de McFarland a 37°C.

Durante esse período de 60 dias de contaminação dos canais radiculares, três dentes não contaminados foram deixados incubados a 37°C, como controle negativo e como controle positivo, três dentes foram inoculados com *E.faecalis* e incubados a 37°C. O grupo do controle negativo foi utilizado para verificar a esterilidade das amostras e o grupo do controle positivo foi usado para checar a viabilidade bacteriana durante o experimento.

Posterior ao período de formação do biofilme 60 dias, foi realizada coleta inicial nos canais radiculares dos grupos controle: positivo e negativo. Os canais radiculares foram preenchidos com água destilada esterilizada e seca com ponta de papel nº 40 esterilizados (Tanari, Tanariman Indústria Ltda., Manacapuru, AM, Brasil) que foram introduzidas dentro do canal radicular e mantidas por 1 minuto para coleta da amostra. Foram feitas três coletas em cada canal radicular utilizando três pontas de papel absorvente esterilizadas. As pontas foram individualmente transportadas e imersas em 7 mL de BHI (Difco laboratories), um meio adicionado com neutralizantes [Tween 80 e tiosulfato de sódio (P.A., Laboratório Art, Campinas, SP, Brasil)] em concentrações apropriadas, seguida pela incubação a 37°C por 48 horas.

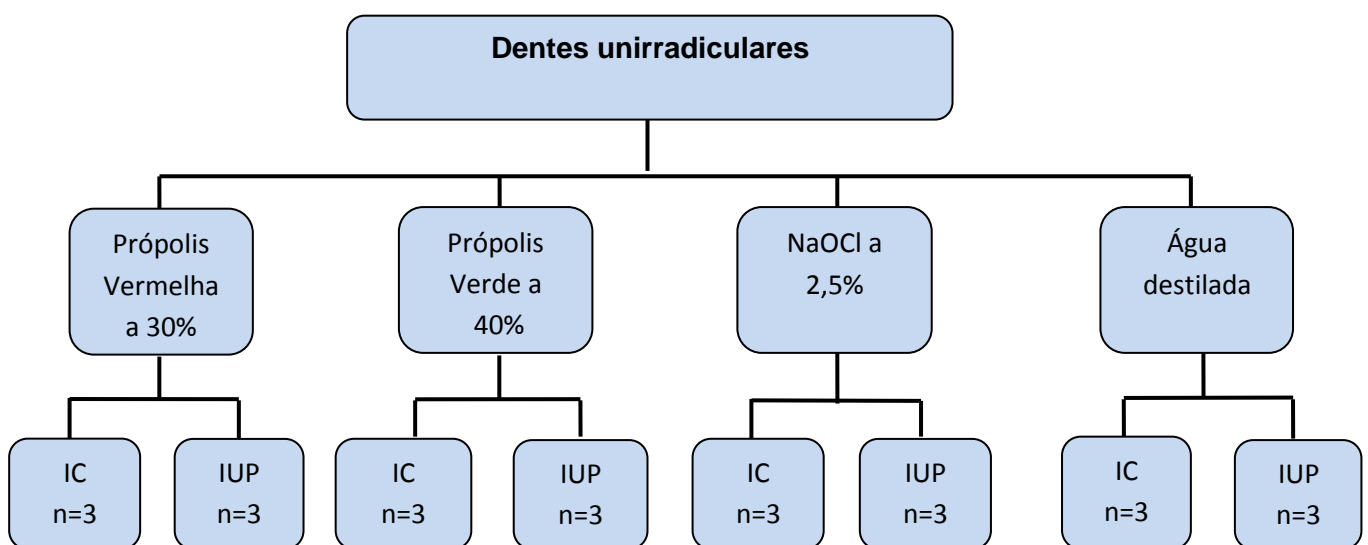
Os dentes (n=24) foram distribuídos aleatoriamente em 8 grupos experimentais (n=3) e 2 grupos controles (n=3). Em todos os grupos experimentais foi realizado preparo do canal radicular e dois protocolos de irrigação – irrigação convencional e irrigação ultrassônica passiva. Nos grupos 1, 3, 5 e 7 foi feito o preparo do canal radicular associada à irrigação convencional com extrato alcoólico de própolis vermelha a 30%, extrato alcoólico de própolis verde a 40%, hipoclorito de sódio a 2,5% e água destilada, respectivamente. Nos grupos 2, 4, 6 e 8 foi realizado o preparo do canal radicular associado a irrigação ultrassônica passiva com extrato alcoólico de própolis vermelha a 30%, extrato alcoólico de própolis verde a 40%, hipoclorito de sódio a 2,5%, água destilada, Grupo 9: controle positivo (n=3) e Grupo 10: controle negativo (n=3). Tabela 1.

Em todos os grupos experimentais foi realizada coleta inicial (antes dos procedimentos endodônticos) para checar a viabilidade bacteriana de cada amostra. A coleta foi realizada de forma idêntica a descritas anteriormente para os controles positivo e negativo.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.

Grupos	Estratégias antibacterianas	Amostras (n=30)
1	MCR + EPVm a 30% (IC)	3
2	MCR + EPVm a 30% (IUP)	3
3	MCR + EPVd a 40% (IC)	3
4	MCR + EPVd a 40% (IUP)	3
5	MCR + NaOCl a 2,5% (IC)	3
6	MCR + NaOCl a 2,5% (IUP)	3
7	MCR + H ₂ O destilada (IC)	3
8	MCR + H ₂ O destilada (IUP)	3
9	Controle Positivo	3
10	Controle Negativo	3

(MCR: modelagem do canal radicular; IC: irrigação convencional; IUP: irrigação ultrassônica passiva, EPVm: extrato de própolis vermelha, EPVd: extrato de própolis verde)

Figura 1. Fluxograma (Delineamento Experimental)

Os grupos foram preparados com a extensão do sistema BioRaCe (FKG Dentaire, Swiss Dental Products, La Chaux-de-Fonds, Swiss) seguindo a sequência BR6 50.02, e BR7 60.02, sendo cada um utilizada em apenas 5 canais radiculares.

A irrigação convencional foi realizada nos grupos 1, 3, 5 e 7 e irrigação ultrassônica passiva nos grupos 2, 4, 6 e 8, com os seguintes irrigantes teste: extrato alcoólico de própolis vermelha a 30% (Apiário Ilha do Porto do estado de Alagoas no NE, Brasil. Laboratório Natural Labor), extrato alcoólico de própolis verde a 40% (Apiário Santo Antônio do estado de SP, Brasil) e hipoclorito de sódio a 2,5% (Fitofarma, Goiânia, GO, Brasil) e água destilada. Cada grupo recebeu o mesmo volume de solução irrigadora (27 mL).

O processo de irrigação convencional foi realizado para os grupos 1, 3, 5 e 7 durante todo o preparo do canal radicular com seringa Ultradent 5mL e cânula de irrigação Endo-Eze Irrigator Tip (Ultradent Products Inc., South, Jordan, UT EUA), com diâmetro de 0,40 mm posicionada em 12mm.

Para os grupos 2, 4, 6 e 8 foi realizada uma agitação ultrassônica durante a última irrigação com o aparelho de ultrassom (EMS PM 200), potência 20% de acordo com as instruções do fabricante. A ponta ultrassônica (E1 irrisonic – Heise) foi posicionada no canal radicular e ativada por 30 segundos, realizando-se movimentos curtos de vaivém, com cuidado de não tocar as paredes do canal radicular para evitar danificá-la.

Os canais radiculares foram irrigados com 3 mL das soluções teste antes do preparo do canal radicular, durante e após a instrumentação com a lima BR #50.02 e BR # 60.02. Cada grupo recebeu o mesmo volume de solução irrigadora.

Posterior ao processo de sanificação de todos os grupos experimentais, cada canal radicular foi preenchido com 3 mL de EDTA 17% (pH 7.2- Biodinâmica, Ibiporá, PR, Brasil), que foi mantido sob agitação com uma lima manual por 3 minutos para remoção de smear layer. Uma irrigação adicional com 5 mL de água destilada esterilizada foi realizada com uma seringa Ultradent 5 mL e cânula de irrigação Endo-Eze Irrigator Tip (Ultradent Products Inc. South, Jordan, UT EUA), para neutralizar os efeitos das soluções irrigadoras em todos os grupos experimentais.

Em seguida a coleta microbiana para cada amostra, foi feita no canal radicular utilizando três pontas de papel absorvente de calibre nº 60 esterilizado (Tanari, Tanariman Indústria Ltda., Manacapuru, AM, Brasil) foram introduzidas em

cada grupo experimental por 1 minuto. As três pontas de papel absorvente utilizada em cada amostra foram individualmente transportadas e imersas em 7 mL de BHI, adicionado de neutralizantes (conforme descrito anteriormente) em concentrações apropriadas, seguida pela incubação a 37°C por 48 horas. Decorridas 72 horas, nova coleta foi realizada de maneira idêntica à descrita previamente. Posteriormente, os dentes foram estocados em micro tubos do tipo Eppendorf de polipropileno de 1,5 mL e incubados a 37°C por 48 horas.

O crescimento bacteriano foi analisado pela turbidez do meio de cultura, por meio de leitura visual, procedentes das coletas de 20 minutos e 72 horas. A análise foi realizada nos períodos de 24 e 48 horas posterior. Após a avaliação das alterações do meio de cultura, um inóculo de 0,1 mL obtido do meio foi transferido para 7 mL de Lethen (Difco Laboratories).

3.4. Preparo para análise no Microscópio Eletrônico de Varredura

A determinação qualitativa da contaminação dos canais radiculares foi feita utilizando microscopia eletrônica de varredura. O preparo e a análise das amostras foram realizados no laboratório de microscopia de alta resolução (Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás - Laboratório de Microscopia).

Posterior ao período experimental os dentes foram fixados em solução tamponada de formalina por uma semana. No grupo correspondente ao controle positivo foi realizado sulco longitudinal no sentido vestibulo-lingual com disco diamantado para exposição de toda a extensão do canal radicular e sem penetrar no canal radicular. Para a exposição de toda a extensão do canal radicular, o seccionamento foi feito com um cinzel e um martelo. Após separação longitudinal, os fragmentos receberam sulcos transversais para separação da raiz nos terços apical, médio e cervical. Os fragmentos foram fixados em solução tamponada de formalina por uma semana. A desidratação foi realizada em solução crescente de etanol 70%, 95% e 100% com três trocas de 10 minutos em cada solução. A secagem foi realizada em ponto crítico (AutoSamdri-815, Tousimis Research Corporation, Rockville, Maryland, USA). Os dentes foram submetidos ao preparo metalográfico para análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, JED, JSM, 6360LV,

Tokyo, Japan) com magnificação 5.000 e 10.000 vezes (Figura 2). As imagens foram analisadas para verificar o padrão de contaminação presente após 15 dias.

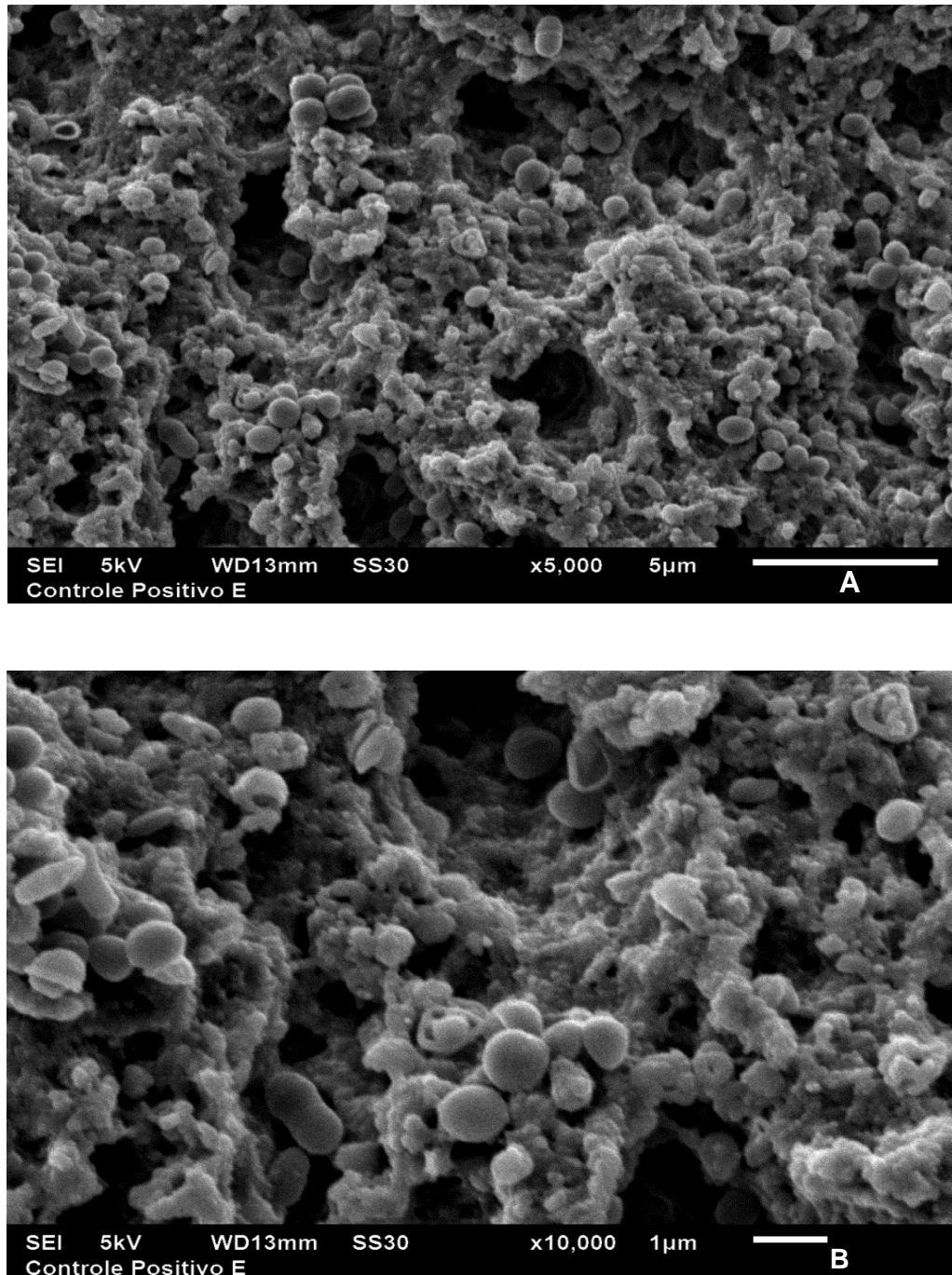


Figura 2 (A, B). Contaminação bacteriana em canais radiculares infectados para análise em MEV - aumento de 5.000x (A) e 10.000x (B).

4 Resultados

A eficácia antibacteriana das substâncias químicas estudadas está presente na tabela 2. Os resultados mostraram efetividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis vermelha a 30% e hipoclorito de sódio a 2,5%, quando utilizada irrigação convencional e irrigação passiva, somente após 20 minutos. Os protocolos de irrigação e as substâncias testadas não foram efetivos para eliminar a contaminação dentinária bacteriana com *E. faecalis*.

Tabela 2. Eficácia antibacteriana de soluções irrigadoras em canais radiculares infectados por *E. faecalis*.

Grupos/ Períodos	1 minuto	20 minutos	72 horas
MCR + EPVm a 30% (IC)	+++	---	+++
MCR + EPVm a 30% (IUP)	+++	---	+++
MCR + EPVd a 40% (IC)	+++	++-	+++
MCR + EPVd a 40% (IUP)	+++	++-	+++
MCR + NaOCl a 2,5% (IC)	+++	---	+++
MCR + NaOCl a 2,5% (IUP)	+++	---	+++
MCR + H ₂ O destilada (IC)	+++	+++	+++
MCR + H ₂ O destilada (IUP)	+++	+++	+++
Controle Positivo	+++	+++	+++
Controle Negativo	---	---	---

(MCR - modelagem do canal radicular; EPVm – extrato de própolis vermelha; IC – irrigação convencional; IUP – irrigação ultrassônica passiva; EPVd – extrato de própolis verde; +++: presença de bactéria; - - -: ausência de bactéria).

5 Discussão

As estratégias de sanificação do canal radicular envolvem procedimentos que visam reduzir os micro-organismos, as quais valorizam as fases de esvaziamento e alargamento, bem como a medicação intracanal e o selamento endodôntico e coronário. O tratamento endodôntico somente pode ser considerado concluído posterior à restauração definitiva do dente (Estrela *et al.*, 2014).

O controle bacteriano continua desafiador, e novas substâncias auxiliares ao processo de sanificação tem sido alvo de investigação. No presente estudo, o comportamento de extratos alcoólicos de própolis vermelha a 30%, própolis verde a 40% e hipoclorito de sódio a 2,5% empregados com irrigação convencional e ultrassônica passiva não foram eficazes na completa descontaminação da dentina radicular infectados com *E. faecalis*.

Estudos em busca de melhor atividade antimicrobiana e biológica das soluções com potencial de emprego intracanal direcionaram a alternativas naturais. A própolis tem sido estudada devido às suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidante, cicatrizante (Burdock, 1998; Marcucci, 2001; Pereira *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2004; Adelman, 2005; Gomes *et al.*, 2007; Bittencourt, 2008).

Os compostos químicos encontrados na própolis mostraram características antimicrobianas e de tolerância tecidual. A própolis vermelha (tipo 13) foi selecionada no presente estudo devido ao teor de flavonóides e compostos fenólicos (Duarte *et al.*, 2002; Alencar *et al.*, 2007). O extrato alcoólico de própolis vermelha a 30% apresenta uma composição química de 2,4% de flavonóides e 13,2% de componentes fenólicos; enquanto que, o extrato alcoólico de própolis verde a 40% apresenta a composição de 3,52% de flavonóide e 3,75% de componentes fenólico.

Essa propriedade antimicrobiana da própolis tem sido atribuída muito para os flavonóides (Koo *et al.*, 2000; Viuda-Martos *et al.*, 2008), que presentes na própolis possuem capacidade de agir na membrana ou parede celular da bactéria, dissolvendo a parte lipofílica (Cowan *et al.*, 1999; Koru, 2007), causando danos estruturais e funcionais (Scazzochio *et al.*, 2005). Segundo Almeida *et al.* (1997) existe uma diferença em flavonóides totais nas amostras de própolis provenientes de diferentes regiões.

No presente estudo, o efeito antibacteriano no período de 20 minutos mostrou que com irrigação convencional e ultrassônica o extrato alcoólico de própolis vermelha a 30% e hipoclorito de sódio a 2,5% foram superior ao extrato alcoólico de própolis verde a 40% frente à bactéria *E. faecalis*. Al-Qathami & Al Madi (2003) compararam a atividade antimicrobiana das própolis com especificação e concentração não indicada e o hipoclorito de sódio a 2,5% em dentina contaminada com *E. faecalis*. A irrigação com própolis não demonstrou diferença significativa em relação à solução de hipoclorito de sódio a 2,5%. Ehsani *et al.* (2013) compararam a atividade antimicrobiana do gel de Aloe Vera, extrato alcoólico de própolis a 15% e 40% e clorexidina a 2%. Os extratos de própolis de 15% e 40% e Aloe Vera apresentaram efeito antibacteriano sobre *E. faecalis*. Koo *et al.* (2000) avaliaram atividade antimicrobiana do extrato de própolis a 10% e Arnica Montana 10% sobre a microbiota endodôntica, incluindo o *E. faecalis*, O extrato de própolis inibiu significativamente os micro-organismos testados.

Gomes *et al.* (2007) pelo método de difusão em ágar verificaram a eficácia antimicrobiana da própolis nas concentrações (5, 10, 15 e 20%) sob algumas cepas (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus áureos*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces Israelli*). Todas as espécies testadas foram suscetíveis para a própolis. Valera *et al.* (2010) verificaram que canais radiculares contaminados com *Escherichia coli* e irrigados com extrato alcoólico de própolis a 12% foi efetiva para a eliminação desta bactéria, além de reduzir a quantidade de endotoxina.

Vargas *et al.* (2004) avaliaram uma ação antibacteriana de extrato alcoólico de própolis a 50%. O extrato de própolis demonstrou atividade antibacteriana por inibir o crescimento dos Gram-positivos em 92,6% e dos Gram-negativos em 42,5%. A própolis obteve maior efetividade contra bactérias Gram-positivos e limitada contra Gram-negativos (Marcucci *et al.*, 2001). Talvez essa resistência seja devida à complexidade da membrana citoplasmática, com maior teor de lipídeo da bactéria Gram-negativa.

Diferentes estudos envolvendo o potencial antimicrobiano da própolis têm relato de variação de resultados, o que pode ser explicado em função da diversidade de metodologias utilizadas, e das especificidades e concentrações das própolis (Koo *et al.*, 2000; Al-Qathami & Al Madi, 2003; Gomes *et al.*, 2007; Valera *et al.*, 2010; Ehsani *et al.*, 2013).

Fernandes *et al.* (2006) compararam a ação antimicrobiana da própolis obtida de três diferentes regiões do Brasil. A própolis obtida em São Paulo foi mais eficiente frente aos micro-organismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp* e *Candida albicans*), enquanto que para a bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*), a própolis mais eficaz era proveniente de Santa Catarina; e frente a *P. aeruginosa* maior ação antimicrobiana foi observada em amostras obtidas do Rio Grande do Norte. Assim, diferenças na atividade antimicrobiana em função do local de aquisição, pode-se verificar as diferenças de composições químicas regionais. À sua vez, Salatino *et al.* (2005) reportaram que variação na quantidade de compostos químicos encontrados em própolis de diferentes regiões promove uma variação em sua atividade antimicrobiana. Em relação à variação sazonal da própolis Sforcin *et al.* (2000) coletaram a própolis em Botucatu (SP), no inverno, verão, primavera e outono, sendo preparada na forma de extrato alcoólico. Atividade antimicrobiana sob o *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. typhimurium* não foi afetada com a variação das estações do ano.

Além da propriedade antimicrobiana, a própolis também apresenta baixa toxicidade. Al-Shaher *et al.* (2004) valendo-se de células do ligamento periodontal observaram que a própolis permitiu 75% de células viáveis, baixa toxicidade. Batista *et al.* (2012) avaliaram a ação cicatrizante de própolis verde e vermelha, correlacionando ao teor de flavonóides. Embora os teores de flavonóides totais da própolis verde sejam menores que a vermelha, a verde foi melhor na reparação de feridas. Não foi possível correlacionar o teor de flavonóides totais com a ação cicatrizante da própolis. O dado revela a necessidade da elucidação dos flavonóides encontrados em cada classe de própolis para desvendar qual flavonóide seria representativo no processo cicatricial.

Como a própolis apresenta pouca solubilidade em água, mas são altamente solúveis em álcool, a opção de uso no presente estudo foi pelo extrato alcoólico de própolis. Com a diluição da própolis em álcool ocorre liberação da parte apolar e com isso verifica-se a presença de parte polar onde se encontra os fenóis e flavonóides responsáveis pela atividade antimicrobiana. As concentrações variadas dos extratos alcoólicos de própolis dependem da sua diluição em álcool (Marcucci, 1995; Salomão *et al.*, 2004).

Ehsani *et al.* (2013), comparando a atividade antibacteriana da clorexidina a 2% com gel de Aloe Vera e extrato alcoólico de própolis 15% e 40% e extrato aquoso de própolis (0% de álcool), observaram que tanto os extratos alcoólicos de própolis e Aloe Vera gel apresentaram efeito antibacteriano sobre o *E. faecalis*. O extrato aquoso de própolis no teste de difusão em ágar não mostrou nenhum efeito antimicrobiano. Costa *et al.* (2008) demonstraram que a solução de extrato de própolis verde a 12% (sem álcool) quando comparada às outras substâncias que apresentou baixa atividade antimicrobiana. Reis *et al.* (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana da suspensão de própolis a 5% e 10% em propilenoglicol sobre *E. faecalis*, clorexidina (controle positivo) e propilenoglicol (controle negativo). O extrato de própolis a 5% e 10% suspenso em propilenoglicol não evidenciou atividade antimicrobiana com *E. faecalis*.

Vários estudos têm considerado o hipoclorito de sódio como a substância que aglutina o maior número de características para uso como irrigante em canais radiculares infectados (Estrela *et al.*, 2002, 2007, 2009, 2014).

O mecanismo de ação do hipoclorito de sódio envolve importantes reações químicas. Entre estas reações que se desenvolve entre o tecido orgânico e o hipoclorito de sódio verificam-se as reações de saponificação, de neutralização de aminoácidos e de cloraminação. O elevado pH do hipoclorito de sódio interfere na integridade da membrana citoplasmática, alterações biossintéticas no metabolismo celular e degradação fosfolipídica observada com a peroxidação lipídica. Observa-se que o hipoclorito de sódio atua como solvente de matéria orgânica e de gordura, transformando esses ácidos graxos (óleos e gorduras) em sais de ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool), o que reduz a tensão superficial da solução remanescente (explicada na reação de saponificação). O hipoclorito de sódio (hidróxido de sódio) neutraliza aminoácidos formando água e sal (interpretada na reação de neutralização de aminoácidos) e degrada ácidos graxos. A reação de cloraminação entre o cloro e o grupamento amina (NH₂) dos aminoácidos, com a formação de cloraminas interfere no metabolismo celular (Estrela *et al.*, 2002).

O hipoclorito de sódio tem mostrado efetividade antibacteriana em teste por contato direto em bactérias em estado planctônico (Estrela *et al.*, 2003); e inefetividade em teste para dentina contaminada por *E. faecalis* (Estrela *et al.*, 2007).

O complexo sistema de canais radiculares e o microambiente existente têm proporcionado a estruturação de biofilmes bacterianos (Sundqvist *et al.*, 1998; Love, 2001; Nair *et al.*, 2005; Estrela *et al.*, 2009; Ricucci e Siqueira, 2010). A efetividade antibacteriana de medicamentos de uso intracanal permanece em expressivo desafio na endodontia contemporânea (Estrela *et al.*, 2009), o que tem estimulado estudos envolvendo alternativas aos protocolos de irrigação (Van der Sluis *et al.*, 2007; Rödiger *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2010; Bhuvra *et al.*, 2010; Bhardwaj *et al.*, 2013).

O presente estudo mostrou inefetividade antibacteriana em ambos os protocolos de irrigação, tanto nos extratos alcoólicos de própolis vermelha a 30%, extrato alcoólico de verde a 40% e hipoclorito de sódio a 2,5%. Um aspecto importante que deve ser considerado no presente estudo foi o período de 15 dias de contaminação dentinária; e os intervalos de análise bacteriana (20 minutos e 72 horas), posterior ao processo de sanificação. A dificuldade em comparação em outros estudos se deve a metodologia, indicador biológico, período de contaminação dentinária e intervalos de análise no processo de sanificação.

Bhardwaj *et al.* (2013) verificaram que a irrigação ultrassônica passiva com o hipoclorito de sódio a 1% foi eficaz em remover completamente o biofilme de *E. faecalis* quando comparado com substâncias naturais (Aloe Vera, suco de Nona e Própolis). Kandaswamy *et al.* (2010) verificaram que o suco de Nona e própolis, foram eficientes em dentina contaminada por *E. faecalis* durante 1, 3 e 5 dias. Harrison *et al.* (2010) mostraram que o hipoclorito de sódio a 1% com auxílio da irrigação ultrassônica passiva foi efetiva, mas não removeu completamente o *E. faecalis* dos canais radiculares infectados. Bhuvra *et al.* (2010) observaram que houve completa remoção do biofilme de *E. faecalis* nos canais radiculares quando utilizada hipoclorito de sódio a 1% com irrigação ultrassônica passiva.

No presente estudo, foi verificada uma impregnação e pigmentação oleosa escurecida nos grupos experimentais constituídas pelo extrato alcoólico vermelha a 30% e extrato alcoólico verde a 40%.

No atual contexto da endodontia deve-se, considerar todos os recursos para se alcançar o sucesso do tratamento endodôntico. Baseado nos resultados do presente estudo, o extrato alcoólico de própolis vermelha a 30% e extrato alcoólico de própolis verde a 40% não foram estimuladores mesmos frente às propriedades intrínsecas desta substância. O hipoclorito de sódio, apesar de não ser detentor de todas as propriedades desejáveis de um irrigante endodôntico, continua a expressar o maior número de vantagens para indicação como irrigante de canal radicular infectado.

6 Conclusão

Baseado na metodologia descrita e dentro das limitações inerentes ao estudo pode-se concluir que a efetividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis vermelha a 30% e hipoclorito de sódio a 2,5%, quando utilizada irrigação convencional e irrigação passiva foi observada apenas após 20 minutos. Os protocolos de irrigação e as substâncias testadas não foram efetivos para eliminar a contaminação dentinária bacteriana com *E. faecalis*.

Referências

ADELMAN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. **Dissertação de Mestrado**. Universidade do Paraná, 2005.

ALMEIDA, R. B; CAMAROTO, J. L; NAVARRO, D. F; PARK, Y. K; IKEGAKI, M; KOZLOWSKI Jr, V. A. Determinação de flavonóides totais em amostras de própolis. **Ciênc Biol Saúde**. v. 3, n.1, p.33-41, 1997.

ARRUDA, A. O; et al. Análise macroscópica e MEV da superfície do canal radicular após utilização do extrato de própolis a 0,25% como irrigante. **J Bras Endod**. v. 5, n.19, p.280-7, may 2004.

ALENCAR, S. M; OLDONI, T. L. C; CASTRO, M. L; CABRAL, I. S. R, COSTA-NETO, C. M; CURY, J. A; ROSALEN, P. L; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **J Ethnopharmacol**. v. 113, p.278-83, may/jun. 2007.

AL-QATHAMI, H; AL-MADI, B. D. S. Comparison of sodium hypochlorite, propolis and saline as root canal irrigants: A pilot study. **Saudi Dent J**. v. 15, n.2, p.100-3, may/aug. 2003.

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**. v. 30, n.5, p.359-61, may 2004.

ALVES, F. R. F; ALMEIDA, B. M; NEVES, M. A. S; MORENO, J. O; RÔÇAS, I. N; SIQUEIRAI, J. F. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. **J Endod**. v. 37, n.4, p.496-501, april 2011.

BANSKOTA, A. H; TEZUKA, Y; PRASAIN, J. K; MATSUSHIGE, K; SAIKI, I; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **J Nat Prod**. v. 61, p. 290-96, jan. 1998.

BANKOVA, V. S; CASTRO, S. L; MARCUCCI, C. M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**. v. 31, p.3-15, jan/sep. 1999.

BATISTA, L. L. V; CAMPESATTO, E. A; ASSIS, M. L. B; BARBOSA, A. P. F; GRILLO, L. A. M; DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Rev Col Bras Cir**. v. 39, n.6, p.515-20, 2012.

¹ Referências formatadas segundo (ABNT NNR 6024:2012). Abreviaturas de periódicos segundo Medline

BHARDWAJ, A; VELMURUGAN, N; SUMITHA; BALLAL, S. Efficacy of passive ultrasonic irrigation with natural irrigants (Morinda citrifolia juice, Aloe Vera and Propolis) in comparison with 1% sodium hypochlorite for removal of *E. faecalis* biofilm: An *in vitro* study. **Indian J Dent.** v. 24, n.1, p.35-41, fev/jun. 2012.

BHUVA, B; PATEL, S; WILSON, R; NIAZI, S; BEIGHTON, D; MANNOCCI, F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. **J Endod.** v. 43, p.241-50, 2010.

BITTENCOURT, F. O. Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra candida albicans de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha. **Dissertação de Mestrado Universidade Tiradentes, 2008.**

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). **Food chemic toxic.** v. 36, n.1, p.347-63, aug. 1998.

CABRAL, R. S. I; OLDONI, C. L. T; PRADO, A; BEZERRA, N. M. R; ALENCAR, M. S. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim Nova.** v.32, n. 6, p. 1523-27, 2009.

CASTRO, M. L; CURY, J. A; ROSALEN, P. L. Própolis do sudeste e nordeste do brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quim Nova.** v. 30, n.7, p.1512-16, 2007.

COSTA, E. M. M. B; ESMERALDO, M. R. A; CARVALHO, M. G. F; DANIEL, R. L. D. P; PASTRO, M. F; JÚNIOR, F. S. L. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e de substâncias utilizadas em endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.** v. 8, n.1, p.21-25, jan/abr. 2008.

COWAN, M. M. Plant Products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev.** v. 12, n. 4, p. 564-82, oct. 1999.

DUARTE, S; ROSALEN, P. L; HAYACIBARA, M. F *et al.* The influence of a novel propolis on *mutans streptococcus* biofilms and caries development in rats. **Arch Oral Biol.** v. 51, p.15-22, 2006.

DAUGSCH, A; MORAES, C. S; PACHECO. E; LIMA, I. B; ABREU, J. A; PARK, Y. K. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Nectar Farmac.** 2006.

EHSANI, M; MARASHI, M. A; ZABIHI, E; ISSAZADEH, M; KHAFRI, S. A comparison between anti-bacterial activity of propolis and Aloe Vera on *Enterococcus faecalis* (an *in vitro* study). **Int J Mol Cell Med Summer.** v. 2, n.7, p.110-17, july/aug. 2013.

ESTRELA, C; PIMENTA, F. CRISTINA; YOKO, I. I; BAMMANN, L. Antimicrobial Evaluation of Calcium Hydroxide in Infected Dentinal Tubules. **J Endod.** v. 25, n.6, p.416-18, june 1999.

ESTRELA, C; ESTRELA, C. R. A; BARBIN, E. L; SPANÓ, J. C. E; MARCHESAN, M. A; PÉCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz Dent J.** v. 13, n.2, p.113-17, 2002.

ESTRELA, C; RIBEIRO, R. G; ESTRELA, C. R. A; PÉCORÁ, J. D; SOUSA-NETO, D. M. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Braz Dent J**. v. 14, n.1, p.58-61, 2003.

ESTRELA, C; HOLLAND, R; BERNABÉ, E. F. P; SOUZA, V; ESTRELA, C. R.A. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dogs' teeth with apical periodontitis. **Braz Dent J**. v.15, n.3, p.181-85, 2004.

ESTRELA, C; ESTRELA, C. R. A; DECURCIO, D. A; HOLLANDA, A. C. B; SILVA, J. A. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **Endod J**. v.40, n.2, p.85-93, 2007.

ESTRELA, C; SYDNEY, G. B; FIGUEIREDO, J. A. P; ESTRELA, C. R. A. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. **J Appl Oral Sci**. v.17, n.1, p.1-7, jan/may 2009.

ESTRELA, C; SYDNEY, G. B; FIGUEIREDO, J. A. P; ESTRELA, C. R. A. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **J Appl Oral Sci**. v.17, n.2, p.87-9, 2009.

FERNANDES, A, J; LOPES, M. M. R; COLOMBARI, V; MONTEIRO, A. C. M; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil, **Ciência Rural**. v. 36, n.1, p.294-97, jan/fev 2006.

GOMES, R. T; TEIXEIRA, K. I. R; CORTÉS, M. E; SANTOS, V. R. Antimicrobial activity of a propolis adhesive formulation on different oral pathogens. **Braz J Oral Sci**. v. 6, n.22, p.1387-1391, july/sep. 2007.

GUPTA, S; KUNDABALA, M; ACHARYA, S. R; BALLAL, V. A comparative evaluation of the antibacterial efficacy of propolis, 3% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gluconate against *E. faecalis* an in vitro study. **Endodontol**. p.31-38, 2007.

HAYACIBARA, M. F; KOO, H; ROSALEN, P. L; DUARTE, S; FRANCO, E. M; BROWEN, W. H; IKEGAKI, M; CURY, J. A. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol**. v. 101, p.110-115, march/april 2005.

HARRISON, A. J; CHIVATXARANUKUL, P; PARASHOS, P; MESSER, H. H. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. **Int Endod J**. v. 43, p.968-77, 2010.

KAYAOGLU, G; ÖMÜRLÜ, H; AKCA, G; GÜREL, M; GENÇAY, O; KADRIYE, S; SALIH, B. Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. **J Endod**. v. 37, n.3, p.376-80, march 2011.

KAKEHASHI, S; STANLEY, H. R; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. v. 20, n.3, p.340-9, 1965.

KANDASWAMY, D; VENKATESHBABU, N; GOGULNATH, D; KINDO, A. J. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. **Int Endod J.** v. 43, p.419-23, january 2010.

KOO, H; GOMES, B. P. F. A; ROSALEN, P. L; AMBROSANO, G. M. B; PARK, Y. K; CURY, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. **Arc Oral Biol.** v. 45, n.1, p.141-48, july/aug. 2000.

KORU, O *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe.** v.13, p.140-45, march. 2007.

LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J.** v. 34, n.1, p.399-405, january 2001.

LIMA, I. O; OLIVEIRA, R. A. G; LIMA, E. O; FARIAS, N. M. P; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Braz J Pharmacog.** v. 16, n.2, p.197-201, jun. 2006.

LUSTOSA, S. R; GALINDO, A. B; NUNES, L. C. C; RANDAU, K. P; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Braz J Pharmacog.** v. 18, n.3, p.447-54, jun. 2008.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie.** v. 23, p.83-99, june/nov. 1994.

MARCUCCI, M. C; FERRERES, F; GARCÍA-VIGUERA, C; Bankova, V. S; DE CASTRO, S. L; VALENTE, P. H. M; DANTAS, A. P; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol.** v. 74, n.1, p.105-12, July. 2001.

MAIA FILHO, E. M; MAIA, C. C. R; BASTOS, A. C. S. C; NOVAIS, T. M. G. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. **Rev Gaucha Odontol.** v. 56, n.1, p.21-5, jan/mar. 2008.

NAIR, P. N. R; HENRY, S; CANO, V; VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 99, n.2, p.231-52, february 2005.

NASCIMENTO, E. A; CHANG, R; MORAIS, E. S. A. L; PILÓ-VELOSO, D; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Braz J Pharmacog.** v. 18, n.3, p.379-86, july/sept. 2008.

PARK, Y. K; IKEGAKI, M; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Apacame-Mensagem Doce.** n. 56, p.1-9, may 2000.

PEREIRA, A. S; SILVA, J. F. M; KITZKE, R; CARDOSO, J. N; AQUINO, F. R. N. Pentacyclic triterpenoid alkanooates in propolis. **Naturforsch.** v. 54, p.115-18, june/july. 1999.

PEREIRA, A. S; SEIXAS, F. R. N. S; AQUINO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova.** v. 25, n.2, p.231-326, jan/july. 2002.

RAMOS, I. F. A. S; BIZ, M. T; PAULINO, N; SCREMIN, A; DELLA BONA, A; BARLETTA, F. B; FIGUEIREDO, J. A. P. Histopathological analysis of corticosteroid-antibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an *in vivo* study. **J Appl Oral Sci.** v. 20, n.1, p.50-56, may 2010.

REIS SÓ, M. V; WAGNER, M. H; ROSA, R. A; TELLES, L; COLPANI, F; HENZ, S; Magro, M. L. Atividade antimicrobiana *in vitro* de uma suspensão de própolis frente ao *Enterococcus faecalis*. **Rev Gaúcha Odontol.** v. 16, n.3, p.277-81, sept/dez. 2011.

RICUCCI, D; SIQUEIRA, J. F. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. **J Endod.** v. 36, n.1, p.1-15, jan. 2010.

RÖDIG, T; SEDGHI, M; KONIETSCHKE, F; LANGE, K; ZIEBOLZ, D; HÜLSMANN, M. Efficacy of syringe irrigation, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. **Int Endod J.** v. 43, p.581-89, dec/jan. 2010.

SALATINO, A; TEIXEIRA, E. W; NEGRI, G; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **CAM.** v. 2, p.33-38, 2005.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; CAMPOS, L. C.; MACHADO, D. G.; AQUINO NETO, F. R.; CASTRO, S. L. Chemical composition microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology.** v. 38, p. 87-92, november 2003.

SCAZZOCCHIO, F; D'AURIA, F. D; ALESSANDRINI, F; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiol Res.** v. 4, p.327-33, december 2006.

SERMEÑO, R. F; DA SILVA, L. A. B; HERRERA, H; HERRERA, H; SILVA, R. A.B;LEONARDO, M. R. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 10, n.8, p.46-9, december 2009.

SEDGLEY, C; NAGEL, A; DAHLÉN, G; REIT, C; MOLANDER, A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **J Endod** 2006. v. 32, n.3, p.173-77, march. 2006.

SHINGARE, P; CHAUGULE, V. Comparative evaluation of antimicrobial activity of miswak, propolis, sodium hypochlorite and saline as root canal irrigants by microbial culturing and quantification in chronically exposed primary teeth. **Germes**. v. 1, p.12-21, 2011.

SILVA, F. B; ALMEIDA, J. M; SOUSA, S. M. G. Medicamentos naturais na Endodontia - estudo comparativo da ação antiinflamatória. **Braz Oral Res**. v.18, n.2, p.174-79, 2004.

SILVA, B. B; ROSALEN, P. L; CURY, J. A; IKEGAKI, M; SOUZA, V. C; ESTEVES, A; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Adv Ac Public**. v. 5, n.3, p.313-16, july. 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr**, Campinas. v. 15, n.1, p.71-81, jan/april 2002.

SJÖGREN, U; HÄGGLUND, B; SUNDQVIST, G; WING, K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. **J Endod**. v. 85, n.1, p.86-93, january 1990.

SUNDQVIST, G; FIGDOR, D; PERSSON, S; SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 85, n.1, p.86-93, 1998.

TEIXEIRA, E. W; MESSAGE, D; MEIRA, R. M. S. A; SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis: Importância e perspectivas. **B Industr. anim N. Odessa**. v. 60, n.1, p.86-106, jun/nov. 2003.

VAN DER SLUIS, L. W. M; VERSLUIS, M; WU, M. K; WESSELINK, P. R. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. **Int Endod J**. v. 40, p.415-426, sept/dec. 2006.

VALERA, M. C; ROSA, J. A; MAEKAWA, L. E. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 110, p.e70-e74, jan. 2010.

VARGAS, A. C; LOGUERCIO, A. P; WITT, N. M; COSTA, M. M; SILVA, M. S; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**. v. 34, n.1, p.159-63, jan/fev. 2004.

VIUDA-MARTOS, M; RUIZ-NAVAJAS, Y; FERNANDEZ-LOPEZ, J; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. **J Food Sci**. v. 73, n.9, p.117-24, 2008.

APÊNDICE

Apêndice A

Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), de uma pesquisa. Meu nome é Mônica Misaé Endo, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é endodontia (tratamento de canal). Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma e não haverá prejuízo na continuidade do seu tratamento junto à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato a pesquisadora responsável Mônica Misaé Endo no telefone 3315-3550, inclusive ligações a cobrar. Em caso de dúvidas sobre seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar contato com o Comitê de Ética em Pesquisa Universidade Federal de Goiás pelo telefone 3521-1215.

Título da pesquisa: Efeito antimicrobiano de extratos de própolis vermelha e verde no processo de sanificação de canais radiculares infectados.

Você participará dessa pesquisa pela doação do dente que será extraído de acordo com o tratamento que foi indicado no tratamento estabelecido para melhorar a saúde de sua boca. O dente cedido será utilizado numa pesquisa para avaliar produtos que podem ser usados para limpar o canal do dente durante o tratamento de canal (Tratamento endodôntico). A cirurgia para extração será realizada na Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, seu dente será guardado e em nenhum momento você não será identificado durante a pesquisa (será mantido o sigilo da sua identidade), mesmo quando os resultados da pesquisa forem divulgados.

Após a cirurgia você receberá as orientações, por escrito, sobre o repouso e o que fazer para uma boa recuperação, bem como os remédios que deve tomar. Se houver dor, inchaço ou qualquer desconforto decorrente da cirurgia, o senhor(a)

poderá entrar em contato por telefone (inclusive à cobrar) com o pesquisador responsável.

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer momento que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer perda de benefícios.

A sua participação no estudo não acarretará custos para você uma vez que seu tratamento será realizado para tratar seus problemas dentários já existentes. Não haverá nenhuma recompensação financeira. Seu dente será adequadamente guardado até o final desta pesquisa e, posteriormente, caso você autorize, será doado para o treinamento e aprendizagem de alunos da Faculdade de Odontologia. Quando necessário, o descarte será realizado em local destinado para o descarte de material biológico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, no entanto, os resultados serão publicados com o objetivo de melhorar a qualidade do tratamento de canal (Tratamento endodôntico) oferecido à toda a população. Após a extração do seu dente, seu tratamento será continuado nas clínicas de reabilitação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás ou você será encaminhado para os serviços de atenção básica do serviço público de saúde. Qualquer tipo de dano sofrido por você em função da participação nesta pesquisa será devidamente ressarcido por indenização.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA OU DO RESPONSÁVEL

Eu, _____.

RG _____, CPF _____, prontuário nº _____,

abaixo assinado, concordo em participar do estudo Efeito antibacteriano de extrato de própolis vermelha e verde em canais radiculares infectados, como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pela pesquisadora **Mônica Misaé Endo** sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu tratamento).

Local e data: _____

Nome e Assinatura do sujeito: _____

Comitê de Ética em Pesquisa/CEP e Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
E-mails: cep.prppg.ufg@gmail.com, ceua.ufg@gmail.com

Apêndice B

ANTIBACTERIAL EFFECT OF RED PROPOLIS EXTRACT AND GREEN CHANNELS IN ROOT INFECTED BY ENTEROCOCCUS FAECALIS

Mônica Misaé Endo, DDS, MS, Carlos Estrela, DDS, MS, PhD, Professor*
corresponding author - Department Endodontics Dental School, Federal University of
Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

e-mail: monica.endo@yahoo.com.br

Abstract

The objective of this study was to investigate the antibacterial effect of alcoholic extracts of 30% red propolis, 40% green propolis and 2.5% sodium hypochlorite in different irrigation protocols in root canals infected *Enterococcus faecalis*. Twenty-four extracted teeth with one root canal were selected, the prepared root canals and inoculated with *E. faecalis* for 60 days. The teeth were randomly divided into eight experimental groups (n = 3) and 2 control groups (n = 3). In all experimental groups were performed root canal preparation and two irrigation protocols - passive ultrasonic irrigation and conventional irrigation. In the groups 1, 3, 5 and 7 was made ready root canal associated with conventional irrigation to 30% propolis, 40% propolis, 2.5% sodium hypochlorite and distilled water, respectively. In groups 2, 4, 6 and 8 was performed root canal preparation associated with passive ultrasonic irrigation and irrigated with the same solutions described above. In the groups 9 and 10 were the controls - negative (root canals uncontaminated) and positive (root canals contaminated untreated). Samples of root canals were collected and immersed in 7 mL of BHI for 48 hours, incubated at 37 °C. The bacterial growth was assessed by turbidity of the culture medium. The results showed antibacterial effectiveness of the alcoholic extract of 30% red propolis and 2.5% sodium hypochlorite when used conventional irrigation and passive irrigation, only after 20 minutes. The irrigation protocols and the substances tested were not effective to eliminate bacterial dentin contamination with *E. faecalis*.

Keywords: Irrigation, sodium hypochlorite, propolis, Enterococcus faecalis, endodontics.

Introduction

Microorganisms are important etiologic agents for dental pulp and periapical tissues infection [1-3]. The bacterial growth is enhanced by internal radicular canal complex anatomy, inaccessible areas to endodontic instruments, which represent an ideal environment for bacterial biofilm colonization and structuring [3, 4]. Bacterial biofilm is structured from microorganisms attachment on a solid surface embedded in an extracellular matrix, resistant to antimicrobial agents of actions favoring the maintenance of infection process and represents a special challenge for successful Endodontic treatment [2, 3, 6, 7].

Enterococcus faecalis are Gram-positive cocci, facultative anaerobic, often isolated in infected teeth radicular canals exhibiting periapical pathology. The ability to invade the dentinal tubules, to be resistant to antimicrobial agents and interfere with host defenses reveals its pathogenic role. Therefore, the use of an endodontic irrigating which can promote the disruption of the biofilm is essential during radicular canal treatment [7-10].

The infected radicular canal sanitization process consists of procedures to reduce the population of microorganisms and debris, with the mechanical action of the instruments and chemical action of endodontic irrigation [9, 11]. Thus, different auxiliary chemicals to the radicular canal preparation have been proposed. Selecting an ideal irrigating mainly depends on its effectiveness on micro-organisms and their periapical tissue tolerance [9]. Sodium hypochlorite is extensively used in endodontics as irrigating solution due to the antimicrobial effect. The mechanism of action includes biosynthetic change; destruction of phospholipids; chloramines formation which interfere cell metabolism; oxidative action with enzymatic inactivation in bacteria and degradation of fatty acids and lipids [12]. However, extrusion of this irrigating can cause intense periapical reactions [13].

Studies concerning antimicrobial activity and biological processing of irrigating solutions for improving search stimulated further studies looking for natural alternatives. In this regard, propolis have been investigated for presenting antimicrobial properties, anti-inflammatory, antioxidant, healing and anticancer [14-20]. Because of its low toxicity has been studied as possible intracanal medication [21-23].

Maia Filho et al. [24] compared the effectiveness of 5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gel and propolis extract against *E. faecalis* by agar diffusion test. Propolis extract showed good antimicrobial activity. Ehsani et al. [25] compared the antimicrobial activity of 2% chlorhexidine, Aloe Vera gel and alcoholic extract of 5% and 40% propolis. Propolis and Aloe Vera showed antibacterial effect on *E. faecalis*. Koo et al. [27] evaluated the antimicrobial activity by agar diffusion method of 10% propolis extract and 10% arnica montana against fifteen microorganisms in endodontic microbiota, among which *E. faecalis*. Propolis extract significantly inhibited the microorganisms tested with the largest inhibition zones for *Actinomyces spp.*

Propolis is a substance formed by resinous material with a characteristic odor, made by bees from plant parts (branches, pollen, buds, tree exudates and resins). In the hive the bees add salivary secretions and enzymes, aiming to protect their hive against insects, micro-organisms and to repair cracks or damage to their own hive [15, 16]. Its chemical composition is complex, heterogeneous with over 300 constituents, among these: fatty acids and phenolic acids, esters, flavonoids, terpenes, aldehydes, aromatic alcohols and naphthalene which have an importance in physical, chemical and biological properties [14, 16, 27, 28]. The main constituents are phenolic compounds, which are characterized by the presence of at least one hydroxyl group bonded directly to an aromatic ring. Phenolic compounds are represented by flavonoids (flavones, flavonols and isoflavones) and phenolic acids, which are responsible for the activity against various pathogenic microorganisms [14, 27, 29, 30].

The color and the chemical composition of propolis depends on its origin, that is, is directly related to the flora of the region visited by bees [16, 18, 28, 31] and environmental [32]. May vary in color from dark brown to greenish to reddish brown depending on the origin of flora that promotes variability in their chemical composition [29].

Park et al. [33] classified Brazilian propolis samples on 12 types based on physical and chemical characteristics, five types in the south, one in southeast and six in northeastern Brazil. Recently it was found in northeastern Brazil, mangrove region a new propolis, classified as type 13, named red propolis [34, 35].

The *Apis mellifera* bees collect on the surface of *Dalbergia ecastophyllum* leguminous vegetable (monkey tail) a red resin, which by chromatographic test there was a similarity in the samples collected of this *Dalbergia ecastophyllum* resin to the chemical composition of red propolis. Therefore, the main botanical origin of propolis is the ecastophyllum *Dalbergia*. The propolis has components (isoflavones), never found before in any species of Brazilian propolis: dihidroxiisoflavona, homoptero carpine, medicarpin and 4'-7 dimethoxy-2'-isoflavone, which are responsible for antimicrobial, anticancer and antioxidant activity [34, 37]. The main botanical origin of green propolis is *Bacharis dracunculifolia* known as rosemary field, and their content flavonoid is relatively low [16].

In the analyzed propolis samples from different regions an important difference was found in total flavonoids after colorimetric analysis. The results indicated that the chemical composition of propolis, especially in relation to the total flavonoid content is dependent on a factors variety. These flavonoids in propolis act on bacteria's membrane or cell wall, causing structural and functional damage [37]. The alcoholic extract of propolis showed antimicrobial activity against *S. aureus*, obtaining positive results in the inhibition of this micro-organism [34]. Alencar et al. [36] also demonstrated a remarkable antimicrobial activity of propolis against microorganisms *S. aureus* and *S. mutans*, determined by the minimum inhibitory concentration.

In addition to the antimicrobial property propolis also has low toxicity and dental pulp cells of the periodontal ligament fibroblasts and resulting in > 75% viable cells [20, 39]. Kumar et al. [39] found antibacterial effectiveness with irrigation propolis extract 25%, and because of low toxicity could be used in radicular canals of deciduous teeth.

In the infected radicular canals sanitization process, ultrasonic devices has been used in different steps, such as ultrasonic irrigation, instrumentation, aiding removal of temporary dressing and retro preparation in periradicular surgery [40]. Ultrasonic irrigation is the bustle of irrigating solutions with a thin endodontic instrument triggered by ultrasound machine and it has proven effectivity, including in isthmus areas [41, 42]. Bhuva et al. [43] have reported satisfactory results with passive ultrasonic irrigation use compared to conventional irrigation when used in 1% sodium hypochlorite and saline solution. In agreement with Harrison et al. [45] which found satisfactory results with 1% sodium hypochlorite on passive ultrasonic irrigation for one minute in contaminated radicular canals with *E. faecalis*.

The growing search irrigating solutions selection of with antimicrobial action and which makes tissue tolerance plays an important role in reduction of bacteria present in the radicular canal system. Considering the potential of propolis as an antibacterial agent, the present study aims to evaluate the antibacterial activity of the alcoholic extract of red propolis at 30%, green propolis at 40% and sodium hypochlorite at 2.5% as irrigating solution, when subjected to passive ultrasonic irrigation in radicular canals infected with *E. faecalis*.

Materials and Methods

This study was approved by Ethics in Research Committee of Goiás Federal University (CAAE No 37973314.9.0000.5083 - Annex A).

Microorganism test

The study design was similar to that developed methodology previously used [45]. A strain of *E. faecalis* coming from the American Type Culture Collection (ATCC 29212) was used as a biological indicator. The bacterial strain was inoculated into 7 ml of Brain Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated for 24 hours at 37°C. Experimental suspension was prepared by growing strain on an agar surface (BHIA - brain heart infusion agar; Difco Laboratories) in a similar incubation conditions as described above. After 24 hours, the bacterial cells were suspended in saline solution in order to achieve a concentration of about 3×10^8 ml⁻¹ cells adjusted to 1 McFarland turbidity standard.

Teeth preparation

For the study, thirty uniradicular human teeth were extracted with intact cementum, at emergency department on Dentistry College, at Goiás Federal University (UFG-FO) and exodontia indication by reason (periodontal, prosthetic or other). The teeth were stored in a bottle containing 0.2% thymol solution and subsequently immersed in 5% sodium hypochlorite for 30 minutes to remove organic tissue. Teeth periapical radiographs (Eastman Kodak. Comp., NY, USA) in bucco lingual and proximal directions were taken to confirm presence of uniradicular canal and absence of anatomical variations. Teeth with obliteration of the radicular canal and disruption of root were excluded.

After initial radiographs, the crowns were removed under continuous jet of air/water, with laminated drill Endo-Z (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) at high speed. Radicular lengths were standardized at 16 mm (from the apex to the amelocementarium limit). The teeth were emptied to the apical limit with K-flex instrument # 15 (Maillefer, Ballaigues, Switzerland), subsequently retreated 1 mm to fit the anatomical diameter. The anatomical diameter of the selected teeth was approximately 350-400 micrometers (diameter corresponding to K file-file No. 35/40) to penetrate and maintain just to the working limit. At the following radicular canals were prepared with BioRace system (FKG Dentaire, La Chaux-de Fonds, Switzerland) using the BR5 40/12:04 instrument (Debelian; Sydney, 2009). Conventional irrigation was performed with 3 mL of 2.5% sodium hypochlorite with ultradente 5 ml syringe and Endo Eze irrigation cannula (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA).

On the next, the canals were dried and filled with 17% EDTA (pH 7.2 - Biodynamics, Ibirorã, PR Brazil) for 3 minutes to remove the smear layer and then autoclaved for 30 minutes at 120° C.

Experimental design

In the experimental model, a split platform was used during the inoculation period the biological indicator. The coronal portion of the radicular canal of each tooth was connected to a bottom of a micro cut 1.5 mL polypropylene tube Eppendorf (Cral, São Paulo, SP, Brazil) using adhesive cyanoacrylate (Super Bonder, Itapevi,

SP, Brazil) to prevent leakage at the connection. The tooth-tube connection was entirely covered with two layers of nail polish (Risqué, Niasi Cosmetics, SP Brazil). The specimens (teeth engaged with polypropylene tubes) were maintained in 5% sodium hypochlorite (Fitofarma, Goiânia, GO, Brazil) for 30 minutes, rinsed in sterile water for 30 minutes and then placed within the BHI culture. To ensure disinfection, the test apparatus was incubated at 37 ° C for 24 hours. After this period, no bacterial growth was observed. Five milliliters of sterile BHI were mixed with 5 mL of the bacterial inoculum, and the experimental and positive control groups were inoculated with *E. faecalis* for 15 days using sterile syringes with a sufficient volume to fill the radicular canal. This procedure was repeated every 72 hours, always using pure culture with 24 hours of preparation and set the standard 1 McFarland at 37°C.

During the 60 days of radicular canal infection three teeth were left uncontaminated incubated at 37°C as negative control and as positive control, three teeth were inoculated with *E. faecalis* and incubated at 37°C. The negative control group was used to verify the sterility of the samples and the positive control group was used to check the bacterial viability during the experiment.

After 60 days biofilm formation period, was held initial collection in radicular canals of control groups: positive and negative. The radicular canals were filled with sterile distilled water and dried with #40sterilized paper points (Tanari, Tanariman Industrial Ltda., Manacapuru, Amazonas, Brazil) which were introduced into the radicular canal and maintained for 1 minute for sample collection. Three collections were made in each radicular canal using three sterile absorbent paper points. The points were individually transported and immersed in 7 mL of BHI (Difco Laboratories), a medium added with neutralizing [Tween 80 and sodium thiosulfate (PA Art Laboratory, Campinas, Brazil)] at appropriate concentrations followed by incubation at 37°C for 48 hours.

The teeth (n = 24) were randomly distributed into eight experimental groups (n = 3) and two control groups (n = 3). In all experimental groups were performed radicular canal preparation and two irrigation protocols - conventional irrigation and passive ultrasonic irrigation. In groups 1, 3, 5 and 7 was performed radicular canal preparation associated with conventional irrigation with alcoholic extract of red propolis at 30%, alcoholic extract of green propolis at 40%, sodium hypochlorite at 2.5% and distilled water respectively. In groups 2, 4, 6 and 8 was performed radicular

canal preparation associated with passive ultrasonic irrigation with alcoholic extract of red propolis at 30%, alcoholic extract of green propolis at 40%, sodium hypochlorite at 2.5% and water distilled. Group 9: positive control (n = 3) and Group 10: negative control (n = 3) (Table 1).

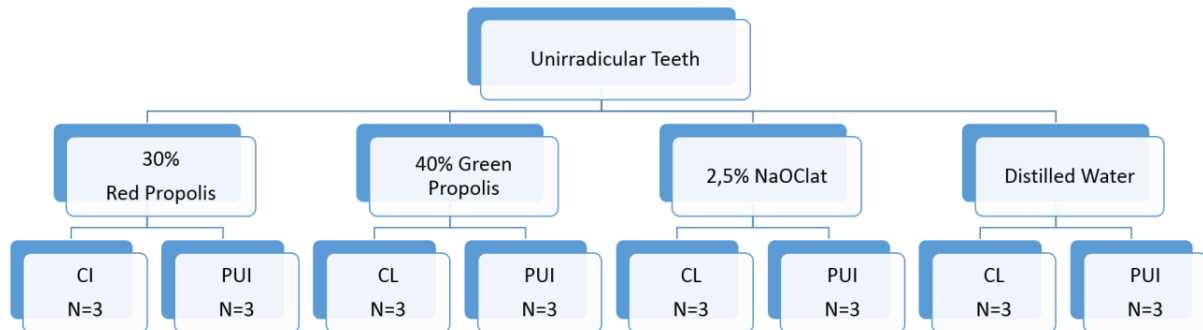
In all experimental groups initial collection was performed (before endodontic procedures) to check for bacterial viability of each sample. Data collection was conducted in the same manner described above for the positive and negative controls.

Table 1. Experimental groups distribution

Groups	Antibacterial strategies.	Samples (n=30)
1	PCS + RPE 30% (CI)	3
2	PCS + RPE 30% (PUI)	3
3	PCS + GPE 40% (CI)	3
4	PCS + GPE 40% (PUI)	3
5	PCS + NaOCl 2,5% (CI)	3
6	PCS + NaOCl 2,5% (PUI)	3
7	PCS + H ₂ O distilled (CI)	3
8	PCS + H ₂ O distilled (PUI)	3
9	Positive Control	3
10	Negative Control	3

(PCS: Root Canal preparation; NaOCl: Sodium Hypochlorite 2.5%; RPE – Red Propolis Extract, GPE – Green Propolis Extract; CI: Conventional Irrigation; PUI: Passive Ultrasonic Irrigation)

Figure 1. Flowchart (Experimental Design)



The groups were prepared with BioRaCe system extension (FKG Dentaire, Swiss Dental Products, La Chaux-de-Fonds, Swiss) following sequence BR6 50.02, 60.02 and BR7, each one used in only 5 radicular canals.

Conventional irrigation was performed in groups 1, 3, 5 and 7 and passive ultrasonic irrigation in groups 2, 4, 6 and 8, with the following test irrigators: alcoholic extract of red propolis at 30% (Ilha do Porto Apiary from Alagoas state in NE. Natural Labor Laboratory), alcoholic extract of green propolis at 40% (Santo Antonio Apiary, from São Paulo state, Brazil) and sodium hypochlorite at 2.5% (Fitofarma, Goiânia, GO, Brazil) and water distilled. Each group received the same irrigation solution volume (27 mL).

The conventional irrigation process was carried out for groups 1, 3, 5 and 7 throughout the radicular canal preparation with Ultradent 5ml syringe and Endo-Eze Irrigator Tip irrigation cannula (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT USA) with 0,40 mm diameter positioned at 12mm.

For groups 2, 4, 6 and 8 an ultrasonic stirring was performed during the last irrigation with ultrasonic device (EMS MW 200), at 20% power in accordance with the manufacturer's instructions. The ultrasonic tip (E1 irrisonic - Heise) was positioned in the radicular canal and activated for 30 seconds, performing short shuttle movements, careful not to touch the walls of the root canal to avoid damaging it.

Radicular canals were irrigated with 3 mL of solution test before radicular canal preparation, during and after instrumentation with file #BR 50.02 and BR# 6002. Each group received the same volume of irrigating solution.

After the sanitization process of all experimental groups, each radicular canal was filled with 3 ml of 17% EDTA (pH 7.2- Biodynamics, Ibioporã, PR, Brazil), which

was kept under stirring with a hand file for 3 minutes to remove of smear layer. An additional irrigation with 5 ml of sterile distilled water was performed with a 5 ml Ultradent syringe and Endo-Eze Irrigator Tip irrigation cannula (Ultradent Products Inc. South Jordan, UT USA) to neutralize the effects of irrigating solutions in all experimental groups.

Then microbial collection for each sample was taken from the radicular canal using three sterilized absorbent paper points # 60 caliber (Tanari, Tanariman Industry Ltda., Manacapuru, Amazonas, Brazil) which were introduced in each experimental group for 1 minute. The three absorbent paper points were used for each sample individually transported and immersed in 7 ml of BHI neutralizing added (as described above) at appropriate concentrations followed by incubation for 48 hours at 37°C. After 72h, a second test was conducted in the same manner as described previously. Thereafter, the teeth were stored in Eppendorf micro tubes polypropylene 1.5 mL and incubated at 37 ° C for 48 hours.

The bacterial growth was analyzed by medium culture turbidity through visual reading, samples coming from 20 minutes to 72 hours. The analysis was performed in the periods 24 and 48 hours later. After changes evaluation in the medium culture, an inoculum of 0.1 ml from obtained medium was transferred to 7 mL of Letheen (Difco Laboratories).

Preparation for analysis in the Electronic Scanning Microscope

The contamination qualitative determination of the radicular canal was performed using electronic scanning microscopy. The preparation and analysis of the samples were performed in the high resolution microscopy laboratory (Physics Institute at Goiás Federal University - Microscopy Laboratory).

After the experimental period the specimens were fixed in buffered formalin solution for one week. In the group corresponding to the positive control was performed longitudinal groove in buccolingual direction with diamond disc to display the entire length of the radicular canal without penetrating the radicular canal. For exposure of radicular canal entire length, sectioning was done with a chisel and hammer. After longitudinal separation, the fragments received transverse grooves to separate the root in the apical, middle and cervical thirds. The fragments were fixed in buffered formalin solution for a week. Dehydration was performed in ethanol

solution increased at 70%, 95% and 100% with three changes after 10 min in each solution. Drying was performed in critical point (815 Auto Samdri, Tousimis Research Corporation, Rockville, Maryland, USA). The teeth were subjected to metallographic preparation for analysis in the Electronic Scanning Microscope (SEM, JED, JSM, 6360LV, Tokyo, Japan) with a magnification 5,000 and 10,000 times (Figure 2). The images were analyzed to determine the pattern of contamination present after 15 days.

Results

The antibacterial efficacy of the studied chemical substances is presented in Table 2. The results showed antibacterial effectiveness of the alcoholic extract of red propolis at 30% and sodium hypochlorite at 2.5% when used conventional and passive irrigation only after 20 minutes. Irrigation protocols and the tested substances were not effective in eliminating dentin bacterial contamination with *E. faecalis*.

Table 2. Antibacterial Efficacy of irrigating solutions in radicular canals infected with *E. faecalis*.

Groups/ Periods	1 minute	20 minutes	72 hours
<i>PCS + RPE 30% (CI)</i>	+++	---	+++
<i>PCS + RPE 30% (PUI)</i>	+++	---	+++
<i>PCS + GPE 40% (CI)</i>	+++	++-	+++
<i>PCS + GPE 40% (PUI)</i>	+++	++-	+++
<i>PCS + NaOCl 2,5% (CI)</i>	+++	---	+++
<i>PCS + NaOCl 2,5% (PUI)</i>	+++	---	+++
<i>PCS + H₂O distilled (CI)</i>	+++	+++	+++
<i>PCS + H₂O distilled (PUI)</i>	+++	+++	+++
Positive Control	+++	+++	+++
Negative Control	---	---	---

(*PCS* – Root canal preparation; *RPE* – Red Propolis Extract; *CI* – Conventional irrigation; *PUI* – Passive Ultrasonic Irrigation; *GPE* – Green Propolis Extract; +++: bacteria presence; - - -: bacteria absence).

Discussion

The sanitation strategies involve radicular canal procedures to reduce the micro-organisms, which value the phases of emptying and enlargement, as well as intracanal medication and endodontic and coronal sealing. Radicular canal treatment can only be considered complete after the final tooth restoration [9].

The bacterial control remains challenging, and new auxiliary sanitization substances process has been under investigation. In this study, the alcoholic extracts behaviors of red propolis at 30%, green propolis at 40% and sodium hypochlorite at 2.5% used in conventional and passive ultrasonic irrigation were not effective in complete decontaminating in the radicular dentin infected with *E. faecalis*.

Studies in search of better antimicrobial activity and biological solutions with intracanal employment potential have directed to natural alternatives. Propolis has been studied due to their antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, healing properties [14-19, 47, 48].

The chemical compounds found in propolis showed antimicrobial and tissue tolerance characteristics. Propolis (type 13) was selected in this study because of its flavonoids and phenolic compounds content [36, 48]. The alcoholic extract of red propolis at 30% has a chemical composition of 2.4% of flavonoids and 13.2% of phenolic compounds; while the alcoholic extract of green propolis at 40% shows the composition of 3.52% of flavonoids and 3.75% of phenolic compounds. This antimicrobial propolis property has been attributed much to the flavonoids [26, 32], which are present in propolis with capacity to act on bacteria membrane or cell wall, dissolving the lipophilic part [49, 50], causing structural and functional damage [37]. According to Almeida et al. [51] there is a difference in total flavonoids in propolis samples from different regions.

In this study, the antibacterial effect in the period of 20 minutes showed that with conventional and ultrasonic irrigation the alcoholic extract of red propolis at 30% and sodium hypochlorite at 2.5% was higher than the alcoholic extract of green propolis at 40% against the bacteria *E. faecalis*. Al-Qathami & Al Madi [52] compared the antimicrobial propolis activities with not indicated specification and concentration and sodium hypochlorite 2.5% in contaminated dentin with *E. faecalis*. Irrigation with propolis showed no significant difference with sodium hypochlorite solution at 2.5%. Ehsani et al. [25] compared the antimicrobial activity of Aloe Vera gel, alcoholic

extract of propolis 15% and 40% and 2% chlorhexidine. The extracts of propolis at 15% and 40% and Aloe Vera showed antibacterial effect on *E. faecalis*. Koo et al. [26] evaluated the antimicrobial activity of propolis extract at 10% and Arnica Montana at 10% on the endodontic microbiota, including *E. faecalis*, propolis extract significantly inhibited the tested micro-Organisms. Gomes et al. [47] by agar diffusion method verified the antimicrobial efficacy of propolis concentrations (5, 10, 15 and 20%) in some strains (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israeli*). All testec species were susceptible to propolis. Valera et al. [54] found that radicular canals contaminated with *Escherichia coli* and irrigated with alcoholic extract of propolis at 12% was effective bacteria elimination and reducing endotoxin amount.

Vargas et al. [46] evaluated an antibacterial action of alcoholic extract of propolis at 50%. Propolis extract demonstrated antibacterial activity by inhibiting the growth of Gram-positive in 92.6% and Gram-negative in 42.5%. Propolis achieved a greater effectiveness against Gram-positive bacteria and limited against Gram-negative bacteria [15]. Perhaps this resistance is due to the complexity of the cytoplasmic membrane, with a higher lipid content on Gram-negative bacteria.

Different studies involving antimicrobial potential of propolis present varying results report, which can be explained by the diversity of methodologies used and particular features and concentrations of propolis [25, 26, 47, 52, 53].

Fernandes et al. [55] compared the antimicrobial activity of propolis obtained from three different regions of Brazil. The propolis obtained in São Paulo was more efficient compared to the Gram-positive microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp* and *Candida albicans*), while for Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) propolis from Santa Catarina was the most effective; and for *P. aeruginosa* greater antimicrobial activity was observed on samples from Rio Grande do Norte. Thus, differences in antimicrobial activity according to the place of purchase, you can check the differences in regional chemical compositions. On his turn, Salatino et al. [55] reported that variation in the amount of chemical compounds found in propolis from different regions promotes a variation in its antimicrobial activity. Regarding the seasonal variation of propolis, Sforcin et al.[56] collected propolis in Botucatu (SP), in winter, summer, spring and autumn, being prepared in

the form of alcoholic extract. Antimicrobial activity in *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. typhimurium* was not affected with the change of the seasons.

In addition to the antimicrobial property, propolis also has low toxicity. Al-Shaher et al. [38] making use of the periodontal ligament cells it was observed that propolis allowed 75% viable cells, low toxicity. Batista et al. [57] evaluated the healing action of green and red propolis, correlating the content of flavonoids. Although the total flavonoids of green propolis are smaller than the red, the green was better in wound repair. It was not possible to correlate the content of total flavonoids with healing action of propolis. This reveals the need for elucidation of flavonoids found in each propolis class to unravel flavonoid which one would be representative for healing process.

As propolis has poor solubility in water, but highly soluble in alcohol, the option to use in this study was the alcoholic extract of propolis. With the dilution of the alcohol occurs propolis release of nonpolar part and therefore there is the presence of polar part where are found phenols and flavonoids responsible for the antimicrobial activity. The varying concentrations of alcoholic propolis extracts depend on their dilution in alcohol [15, 58].

Ehsani et al. [25] compared the antibacterial activity of chlorhexidine at 2% with Aloe Vera gel and alcoholic extract of propolis at 15% and 40% and aqueous extract of propolis (0% alcohol), they observed that both the alcoholic extracts of propolis and Aloe vera gel exhibit antibacterial effect on *E. faecalis*. The aqueous extract of propolis in the agar diffusion test showed no antimicrobial effect. Costa et al. [22] demonstrated that green propolis extract solution at 12% (no alcohol) compared to the other substances showed low antimicrobial activity. Reis et al. [59] evaluated the antimicrobial activity of propolis suspension at 5% and 10% in propyleneglycol on *E. faecalis*, chlorhexidine (positive control) and propylene glycol (negative control). The propolis extract at 5% and 10% suspended in propylene glycol did not show antimicrobial activity against *E. faecalis*.

Several studies have considered the sodium hypochlorite like substance which agglutinates the largest number of characteristics for its use as irrigant in infected radicular canals [6, 12, 45, 60].

The action mechanism of sodium hypochlorite involves important chemical reactions. Among these reactions, which are developed between the organic material and sodium hypochlorite, the saponification reactions, neutralization of amino acids

and chloramination can be verified. The sodium hypochlorite high pH interfere with the integrity of the plasma membrane, changes in cellular metabolism, biosynthesis and phospholipid degradation observed with lipid peroxidation. The sodium hypochlorite observed acts as a solvent of organic matter and fat, transforming these fatty acids (fats and oils) in fatty acid salts (soap) and glycerol (alcohol), which reduces the surface tension of the remaining solution (explained in the saponification reaction). Sodium hypochlorite (sodium hydroxide) neutralizes amino acid to form water and salt (played in the amino acid neutralization reaction), and degrade fatty acids. The reaction of chloramination between chlorine and grouping amine (NH₂) of amino acids, with the formation of chloramines interferes in cell metabolism [2].

Sodium hypochlorite has been shown antibacterial effectiveness in bacteria testing contact in planktonic state [11]; and ineffectiveness in contaminated dentin test by *E. faecalis* [45].

The complex radicular canal system and the existing microenvironment have provided the structuring of bacterial biofilms [2-6]. The antibacterial effectiveness intracanal used drugs remains a significant challenge in contemporary endodontics [6], which has stimulated studies of alternatives to irrigation protocols [42, 43, 44, 61, 62].

The present study showed antibacterial irrigation ineffectiveness in both protocols, in alcoholic extracts of red propolis at 30%, alcoholic extract from green propolis at 40% and sodium hypochlorite at 2.5%. An important aspect to be considered in this study was 15 days of dentin contamination; and analyzing bacterial intervals (20 minutes and 72 hours) after the sanitization process. The difficulty compared to other studies is due to the methodology, biological indicator, dentin contamination period and gap analysis in the sanitization process.

Bhardwaj et al. [62] reported that passive ultrasonic irrigation with sodium hypochlorite at 1% was effective in completely biofilms remove of *E. faecalis* compared to natural substances (Aloe Vera, Nona juice and propolis). Kandaswamy et al. [63] verified that Nona juice and propolis were effective in dentin contaminated by *E. faecalis* for 1, 3 and 5 days. Harrison et al. [44] showed that sodium hypochlorite at 1% with the aid of passive ultrasonic irrigation was effective, but not completely removed *E. faecalis* from infected radicular canals. Bhuva et al. [43]

observed a complete removal of *E. faecalis* biofilm in radicular canals when used sodium hypochlorite at 1% with passive ultrasonic irrigation.

In this study, an impregnation and oily darkened pigmentation in the experimental groups constituted by the red alcoholic extract at 30% and green alcoholic extract at 40% was observed.

In the current context of endodontics it must consider all resources to achieve successful endodontic treatment. Based on the results of this study, the alcoholic extract of red propolis at 30% and alcoholic extract of green propolis 40% were not stimulating even in the face of the intrinsic properties of this substance. Sodium hypochlorite, although not being the holder of all desirable properties of an endodontic irrigator, continues to express the wider range of indication benefits as irrigant for infected radicular canal.

Conclusion

Based on the methodology described and within the limitations inherent to the study it can be concluded that the antibacterial efficacy of an alcoholic extract of red propolis at 30% sodium hypochlorite and 2.5% when used conventional and passive irrigation was observed only after 20 minutes. Irrigation protocols and the substances were not effective in eliminating bacterial dentin contamination with *E. faecalis*.

References

1. Adelman J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. Dissertação de Mestrado. Universidade do Paraná, 2005.
2. Almeida RB, Camaroto JL, Navarro DF, Park YK, Ikegaki M, Kozłowski Jr, VA. Determinação de flavonóides totais em amostras de própolis. *Ciênc Biol Saúde* 1997;3(1):33-41.
3. Arruda AO. Análise macroscópica e MEV da superfície do canal radicular após utilização do extrato de própolis a 0,25% como irrigante. *J Bras Endod* 2004;5(19):280-7.

4. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol* 2007;113:278-83.
5. Al-Qathami H, Al-Madi BDS. Comparison of sodium hypochlorite, propolis and saline as root canal irrigants: A pilot study. *Saudi Dent J* 2003;15(2):100-3.
6. 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.
7. Alves FRF, Almeida BM, Neves MAS, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira JF. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod* 2011;37(4):496-51.
8. Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki I, Kadota S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J Nat Prod* 1998;61:290-96.
9. Bankova VS, Castro SL, Marcucci CM. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 1999;31:3-15.
10. Batista LLV, Campesatto EA, Assis MLB, Barbosa APF, Grillo LAM, Dornelas CB. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. *Rev Col Bras Cir* 2012; 39(6):515-20.
11. Bhardwaj A, Velmurugan N, Sumitha Ballal S. Efficacy of passive ultrasonic irrigation with natural irrigants (Morinda citrifolia juice, Aloe Vera and Propolis) in comparison with 1% sodium hypochlorite for removal of *E. faecalis* biofilm: An *in vitro* study. *Indian J Dent* 2012; 24(1):35-41.
12. Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazil S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *J Endod* 2010;43:241-50.
13. Bittencourt FO. Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra candida albicans de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha. Dissertação de Mestrado Universidade Tiradentes, 2008.
14. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food chem toxicol* 1998;36(1):347-63.

15. Cabral RSI, Oldoni CLT, Prado A, Bezerra NMR, Alencar MS. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim Nova* 2009;32(6):1523-27.
16. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim Nova* 2007;30(7):1512-16.
17. Costa EMMB, Esmeraldo MRA, Carvalho MGF, Daniel RLDP, Pasto MF, Júnior FSL. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e de substâncias utilizadas em endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2008;8(1):21-25.
18. Cowan MM. Plant Products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12(4):564-82.
19. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF *et al.* The influence of a novel propolis on *mutans streptococcus* biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol* 2006;51:15-22.
20. Dausch A, Moraes OCS, Pacheco AE, Lima IB, Abreu JÁ, Park YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica. *Nectar Farmac.* 2006.
21. Ehsani M, Marashi MA, Zabihi E, Issazadeh M, Khafri S. A comparison between anti-bacterial activity of propolis and Aloe Vera on *Enterococcus faecalis* (an *in vitro* study). *Int J Mol Cell Med Summer* 2013;2(7):110-17.
22. Estrela C, Pimenta F, Cristina Yoko II, Bammann L. Antimicrobial Evaluation of Calcium Hydroxide in Infected Dentinal Tubules. *J Endod* 1999; 25(6):416-18.
23. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pércora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002; 3(2):113-17.
24. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pércora JD, Sousa-Neto DM. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14(1):58-61.
25. Estrela C, Estrela CRA, Holland R, Bernabé EFP, Souza V. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dogs' teeth with apical periodontitis. *Braz Dent J* 2004;15(3):181-85.
26. Estrela C, Estrela CRA, Decurso DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Endod J* 2007;40(2):85-93.

27. Estrela C, Estrela CRA, Sydney GB, Figueredo JAP. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. *J Appl Oral Sci* 2009;17(1):1-7.
28. Estrela C, Sydney GB, Figueredo JAP, Estrela CRA. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J Appl Oral Sci* 2009;17(2):87-9.
29. Fernandes AJ, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil, *Ciência Rural* 2006;36(1):294-97.
30. Gomes RT, Teixeira KIR, Cortés ME, Santos VR. Antimicrobial activity of a propolis adhesive formulation on different oral pathogens. *Braz J Oral Sci* 2007;6(22):1387-1391.
31. Gupta S, Kundabala M, Acharya SR, Ballal VA. Comparative evaluation of the antibacterial efficacy of propolis, 3% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gluconate against *E. faecalis* an in vitro study. *Endodontol* 2007;31-38.
32. Haycibara MF, Koo H, Rosalen PL, Duarte S, Franco EM, Browen WH, Ikegaki M, Cury JA. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol* 2005;10(1):110-15.
33. Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J* 2010;43:968-77.
34. Kayaoglu G, Ömümlü H, Akca G, Gürel M, Gençay O, Kadriye S, Salih B. Antibacterial activity of propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod* 2011;37(3):376-80.
35. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20(3):340-9.
36. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J* 2010;43:419-23.
37. Koo H, Gomes BPF, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arc Oral Biol* 2000;45(1):141-48.

38. Koru O. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 2007;13:140-45.
39. Love RM. *Enterococcus faecalis* a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34(1):399-405.
40. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Braz J Pharmacog* 2006;16(2):197-201.
41. Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Neto PJR. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Braz J Pharmacog* 2008;18(3):447-54.
42. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1994;23:83-99.
43. Marcucci MC, Ferreres F, García-Vigueira C, Bankova VS, De Castro SL, Valente PHM, Dantas AP, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2001;74(1):105-12.
44. Maia Filho EM, Maia CCR, Bastos ACSC, Novais TMG. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. *Rev Gaucha Odontol* 2008;56(1):21-5.
45. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(2):231-52.
46. Nascimento EA, Chang R, Morais ESAL, Piló-Veloso D, Reis DC. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). *Braz J Pharmacog* 2008;18(3):379-86.
47. Park, YK, Ikegaki, M, Alencar, SM. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Apacame-Mensagem Doce* 2000;56:1-9.
48. Pereira AS, Silva JFM, Kitzke R, Cardoso JN, Aquino FRN. Pentacyclic triterpenoid alkanooates in propolis. *Naturforsch* 1999;54:115-18.
49. Pereira AS, Seixas FRNS, Aquino FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim. Nova* 2002;25(2):231-36.

50. Ramos IFAS, BIZ MT, Paulino N, Scremin A, Della Bona A, Barletta FB, Figueiredo JAP. Histopathological analysis of corticosteroid-antibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpectomy: an *in vivo* study. *J Appl Oral Sci* 2010;20(1):50-56.
51. Reis Só MV, Wagner MH, Rosa RA, Telles L, Colpani F, Henz S, Magro ML. Atividade antimicrobiana *in vitro* de uma suspensão de própolis frente ao *Enterococcus faecalis*. *Rev Gaúcha Odontol* 2011;16(3):277-81.
52. Ricucci D, Siqueira JF. Fate of the tissue in lateral canals and apical ramifications in response to pathologic conditions and treatment procedures. *J Endod* 2010;36(1):1-15.
53. Rödíg T, Sedghi M, Konietzschke F, Lange K, Ziebolz D, Hülsmann M. Efficacy of syringe irrigation, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. *Int Endod J* 2010;43:581-89.
54. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *CAM* 2005;2:33-38.
55. Salomão K, Dantas AP, Borda CM, Campos LC, Machado DG, Aquino Neto FR, Castro SL. Chemical composition microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Letters in Applied Microbiology* 2003;38:87-92.
56. Scazzocchio F, D'auria FD, Alessandrini F, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 2006;4:327-33.
57. Sermeño RF, Da Silva LAB, Herrera H, Silva RAB, Leonardo MR. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;10(8):46-9.
58. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 2006;32(3):173-77.
59. Shingare P, Chaugule V. Comparative evaluation of antimicrobial activity of miswak, propolis, sodium hypochlorite and saline as root canal irrigants by microbial culturing and quantification in chronically exposed primary teeth. *Germes* 2011;1:12-21.

60. Silva FB, Almeida JM, Sousa SMG. Medicamentos naturais na Endodontia - estudo comparativo da ação antiinflamatória. *Braz Oral Res* 2004;18(2):174-79.
61. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Adv Ac Public* 2007;5(3):313-16.
62. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr, Campinas* 2002; 15(1):71-81.
63. Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;85(1):86-93.
64. Sundqvist G, Figdorl D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85(1):86-93.
65. Teixeira EW, Message D, Meira RMSA, Salatino A. Indicadores da origem botânica da própolis: Importância e perspectivas. *B Industr. anim N. Odessa* 2003; 60(1):86-106.
66. Van Der Sluis L WM, Versluis M, WU MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2006;40:415-426.
67. Valera MC, Rosa JA, Maekawa LE. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:70-74.
68. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural* 2004;34(1):159-63.
69. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Pérez-Álvarez JA. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *J Food Sci* 2008;73(9):117-24.

ANEXOS

THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL

Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact tswj@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to tswj@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and "if not rejected right away" by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Microarray Data Submission

For any article that includes microarray data, this data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to

its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

The Scientific World Journal is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of The Scientific World Journal, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

1. Paper title
2. Full author names
3. Full institutional mailing addresses
4. Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be

appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interests in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interests, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.”

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

International Commission on Zoological Nomenclature

When publishing papers which describe a new zoological taxon name, Hindawi aims to comply with the requirements of the International Commission on Zoological

Nomenclature (ICZN). Therefore, for all papers that include the naming of a new zoological taxon, authors are requested to contact Zoobank, the online registration system for the International Commission on Zoological Nomenclature, to obtain a Life Science Identifier (LSID). Moreover, authors are requested to insert the following text in the “Materials and Methods” section, in a subsection to be called “Nomenclatural Acts”:

The new names contained in this article are available under the International Code of Zoological Nomenclature. This work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank. Zoobank Life Science Identifier (LSID) for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The LSID registration and any associated information can be viewed in a web browser by adding the LSID to the prefix “<http://zoobank.org/>.”

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any human experiments, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work on human subjects who carry a risk of harm must include a statement that the experiment was conducted with the understanding and the consent of the human subject, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors should provide a full description of any anesthetic and surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.