

Atividade antimicrobiana *in vitro* de uma suspensão de própolis frente ao *Enterococcus faecalis*

Antimicrobial in vitro activity of a propolis suspension against Enterococcus faecalis

Marcus Vinícius Reis Só*
Márcia Helena Wagner**
Ricardo Abreu da Rosa***
Lucas Telles****
Francisco Colpani*****
Sandra Henz*****
Miriam Lago Magro*****

Resumo

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da suspensão de própolis a 5 e 10% sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). **Métodos:** O teste de difusão em ágar e a técnica do disco foram empregados para as seguintes substâncias: (n = 19) extrato seco de própolis a 5 e 10%, clorexidina (controle positivo) e propilenoglicol (controle negativo). O diâmetro dos halos de inibição bacteriana foi medido após 24 horas. **Resultados:** Diferenças estatisticamente significantes foram observadas através do teste Anova (1 via) e post hoc de Tukey com nível de significância de 5% (p < 0,001). O grupo da clorexidina mostrou halos de inibição de crescimento bacteriano com média de 6,631 mm, ao passo que a própolis a 5 e 10% e o propilenoglicol não apresentaram halos. **Conclusão:** O extrato de própolis a 5 e 10% suspenso em propilenoglicol não evidenciou atividade antimicrobiana, *in vitro*, em comparação com o *Enterococcus faecalis*.

Palavras-chave: Própolis. *Enterococcus faecalis*. Endodontia.

Introdução

A necessidade de novos materiais que apresentem propriedades biológicas e antimicrobianas, aliada ao grande avanço da fitoterapia nos últimos anos, tem estimulado a avaliação de diferentes substâncias que possuam propriedades terapêuticas para a odontologia¹⁻³. Exemplo desses produtos é a própolis, *Casearia sylvestris*, uma resina de coloração e consistência variada, produzida pelas abelhas a partir da mistura de substâncias coletadas de diferentes partes das plantas (brotos, botões florais e exsudatos resinosos) com secreções produzidas em seu organismo⁴. Investigações científicas revelaram efeitos antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios, antitumorais e com propriedades imunomoduladoras⁵.

Koo et al.⁶ (2000) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato de própolis a 10% e *Arnica montana* 10% sobre 15 micro-organismos da microbiota endodôntica, dentre os quais o *E. faecalis*. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar. O extrato de pró-

* Professor Adjunto de Endodontia da Faculdade de Odontologia, Departamento de Odontologia Conservadora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

** Professora Assistente de Endodontia do curso de Odontologia, Departamento de Enfermagem e Odontologia da Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

*** Doutorando do Programa de Pós-Graduação *Strito Sensu* da Faculdade de Odontologia, Departamento de Odontologia Conservadora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

**** Cirurgião-dentista graduado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

***** Professora Adjunta de Cariologia, Departamento de Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

***** Professora Assistente de Endodontia, Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

polis inibiu significativamente todos os micro-organismos testados ($p < 0,05$), com maiores halos de inibição para o *Actinomyces spp.*

Groisman et al.⁷ (2005) avaliaram o efeito da própolis a 1,5 e 3% e da clorexidina 0,06 e 0,12% sobre os micro-organismos salivares. Os autores verificaram que a solução de própolis a 3% associada à clorexidina 0,12% e que as soluções de própolis a 3 e 1,5% associadas à clorexidina 0,06% reduziram o número de *Streptococcus sp* em 26,7, 25,9 e 24,9% respectivamente ($p < 0,01$).

Maia Filho et al.⁸ (2008) compararam a eficácia de três irrigantes empregados em endodontia e o extrato de própolis frente ao *Enterococcus faecalis*. Foram utilizados o teste de difusão em ágar e as seguintes substâncias: hipoclorito de sódio 5%, gel de clorexidina 2%, hidróxido de cálcio e extrato hidroalcoólico de própolis. O extrato de própolis apresentou uma boa atividade antimicrobiana, sendo maior que o hipoclorito de sódio 5%. Entretanto, o gel de clorexidina foi mais efetivo contra o *E. faecalis*.

Awawdeh et al.⁹ (2009) compararam a atividade antimicrobiana da própolis e do hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, durante um e dois dias, num modelo de dentina infectada com *E. faecalis*. Cinquenta discos de dentina de 7 mm de comprimento, obtidos de dentes humanos, foram empregados. Desses, 45 foram infectados com *E. faecalis* e divididos em dois grupos de vinte discos (hidróxido de cálcio ou própolis), cinco foram mantidos estéreis como controle negativo e cinco discos, como controle positivo. Os resultados demonstraram que a própolis foi significativamente mais efetiva do que o hidróxido de cálcio após um curto período de tempo.

Kandaswami et al.¹⁰ (2000) investigaram a atividade antimicrobiana da *Morinda citrifolia juice*, gel de clorexidina 2%, própolis, povidone iodine 2% e hidróxido de cálcio sobre a dentina do canal radicular infectada com *E. faecalis*, em duas profundidades, 200 e 400 micrometros e em três intervalos de tempo (1, 3 e 5 dias). O número de unidades formadoras de colônia foi estatisticamente significante para todos os grupos quando comparado com o grupo controle (solução salina). O grupo da clorexidina gel apresentou a melhor eficácia antimicrobiana (100%), seguido pelo grupo da povidone iodine (87%), própolis (71%) *Morinda juice* (69%) e hidróxido de cálcio (55%). Não houve diferença significante entre a *Morinda citrifolia juice* e a própolis, bem como em relação às duas profundidades.

A instalação de processos infecciosos no sistema de canais radiculares tem como consequência a periodontite apical, sendo o controle dos micro-organismos no sistema de canais radiculares um grande desafio do tratamento endodôntico¹¹⁻¹². Para tanto, necessitamos de substâncias que penetrem no sistema de canais e atuem sobre a microbiota endodôntica. O hidróxido de cálcio tem sido escolhido em razão das suas propriedades biológicas e microbiológicas¹³⁻¹⁵. Entretanto, evidências científicas

vêm apontando para a resistência de alguns micro-organismos ao hidróxido de cálcio¹⁶⁻¹⁷.

Os *Enterococcus faecalis* são cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, encontrados isolados, aos pares ou em cadeias curtas¹⁸. Esse micro-organismo é raramente encontrado em infecções primárias¹⁹, mas é a espécie predominante em casos de retratamento endodôntico²⁰⁻²¹, chegando a constituir de 38 a 70% da microbiota nesses casos²²⁻²³, sendo detectado em vinte de trinta casos de infecções endodônticas persistentes associadas a dentes com canais obturados¹⁸. Essa alta prevalência nas complicações pós-tratamento endodôntico é atribuída, de modo especial, à sua capacidade de aderir ao colágeno, potencializada pela presença de soro humano e, no processo de colonização, de invadir os túbulos dentinários, além de interferir nas defesas do hospedeiro e resistir à ação de substâncias antimicrobianas, fazendo de sua colonização uma constante fonte de reinfecção do canal obturado^{24,13,25}.

O presente estudo tem por objetivo avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de cepas padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) frente à solução de própolis seco veiculado a propilenoglicol nas concentrações de 5 e 10%.

Materiais e método

A metodologia deste trabalho consiste em um estudo experimental, *in vitro*, controlado e randomizado, realizado no laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Faculdade de Odontologia do Rio Grande do Sul, Brasil (Labim).

Procedimentos experimentais

Obtenção das amostras de própolis

O extrato seco de própolis foi obtido no estado do Rio Grande do Sul e analisado pelo Laboratório All Chemistry (Certificado: 37542-1). As soluções de própolis a 5 e a 10% suspensas em propilenoglicol foram manipuladas pelo método de levigação no laboratório da farmácia Marcela (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil).

Preparo do meio

Inicialmente, foram preparados 300 mL de meio de cultura ágar cérebro-coração – BHIA (Becton Dickinson and Co. Franklin Lakes, New Jersey, EUA), utilizando-se água destilada como solvente. A seguir, o meio preparado foi esterilizado e, após resfriamento até a temperatura de 50 °C, transferido para 19 placas de Petri (150 x 10mm) esterilizadas. Cada placa recebeu 15 mL de meio de cultura, ficando com uma espessura de 2 mm. Posteriormente, as placas foram levadas à capela de fluxo laminar, em temperatura ambiente, até ocorrer o completo resfriamento do meio de cultura.

Micro-organismo utilizado

O *Enterococcus faecalis* foi obtido a partir de cepas padrão (ATCC 29212) e foi previamente semeado em uma placa de Petri, contendo BHIA. Após, com uma alça de platina, o micro-organismo foi semeado em um tubo contendo 10 mL de caldo de soja tryptcase – TSB (HIMEDIA, Mumbai – Índia). Este tubo foi levado à estufa de cultura e incubado por um período de 24 horas a 37 °C.

Passado esse período, suspensões bacterianas ajustadas de acordo com a turbidez do tubo número 1 da escala de Mac Farland foram obtidas diluindo-se as colônias bacterianas, crescidas no BHIA, em 20 mL de água destilada.

Processo de inoculação do meio

A seguir, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão microbiana foi transferida para cada uma das 19 placas de Petri, contendo meio de cultura. A suspensão foi semeada em toda superfície do meio de cultura com o auxílio de um *swab*, de modo a se obter um crescimento confluyente.

Técnica do disco – difusão em ágar

Na superfície do meio de cultura inoculado de cada uma das 19 placas foram colocados quatro discos de papel filtro de um centímetro de diâmetro, previamente confeccionados e esterilizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Antes de serem levados à superfície do meio de cultura, os discos foram embebidos durante o período mínimo de 1min em 1 mL de cada uma das substâncias em estudo (n = 19): C+ (controle positivo): solução de clorexidina a 2%; C- (controle negativo): propilenoglicol; S1: solução de própolis a 5%; S2: solução de própolis a 10%.

Pré-incubação e incubação

As placas de Petri foram pré-incubadas em temperatura ambiente por 1 hora, a fim de permitir a difusão das substâncias antes do desenvolvimento microbiano. A seguir, foram incubadas a 37 °C por 24 horas em microaerofilia. Decorrido o período de incubação, com o auxílio de uma régua milimetrada e uma boa fonte de luz refletida, foi realizada a mensuração do diâmetro da zona de inibição do crescimento microbiano ao redor de cada um dos discos. Foram realizadas duas medidas por dois examinadores diferentes. A média de ambas foi calculada e utilizada para fins de análise dos resultados.

Interpretação dos resultados

As medidas dos halos de inibição de crescimento bacteriano dos grupos experimentais foram analisadas pela análise da variância (1 via) e teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados e processados com o auxílio do

programa SPSS (Statistical Package for the Social Science) versão 3.0.

Resultados

Os resultados do presente estudo demonstram diferença estatisticamente significativa entre a clorexidina a 2% (controle positivo) e os demais grupos experimentais (Tab. 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão dos halos de inibição bacteriana dos grupos experimentais em mm

Grupo	N	Média	Desvio padrão
Clorexidina 2% (C+)	19	6,631	0,597
Propilenoglicol (C-)	19	0,000	0,000
Própolis 5%	19	0,000	0,000
Própolis 10%	19	0,000	0,000

Análise de variância -1 via e teste de Tukey – nível de significância 5% (P < 0,001)

O grupo da clorexidina mostrou halos de inibição de crescimento bacteriano com média de 6,631 mm, ao passo que a própolis a 5 e 10% e o propilenoglicol (controle negativo) não apresentaram halos (p < 0,001).

Discussão

Em endodontia, no tratamento de dentes com canais infectados, a preocupação em diminuir a população de micro-organismos, promovendo a sanificação do sistema de canais radiculares, é motivo de inquietantes pesquisas no campo da microbiologia endodôntica.

O hipoclorito de sódio e a clorexidina, durante o preparo biomecânico, a pasta de hidróxido de cálcio em suas diferentes veiculações, como curativo de demora, são exemplos de substâncias que venceram a barreira do tempo e são empregadas com o intuito de combater as infecções endodônticas. Cada uma tem a sua devida importância. Entretanto, a busca por uma substância ideal, com a qual se consiga uma maior efetividade sobre os micro-organismos endodontopáticos e, ao mesmo tempo, apresente biocompatibilidade e não citotoxicidade, norteia as pesquisas da comunidade científica.

A escolha do *Enterococcus faecalis* justifica-se em razão de ser um micro-organismo que compõe a microbiota endodôntica, principalmente relacionado aos casos de insucessos endodônticos, nos quais lesões refratárias ao tratamento não reparam pela terapia endodôntica convencional. Esse micro-organismo gram-positivo e anaeróbio facultativo tem demonstrado tolerar níveis de pH elevados (acima de 12), suportando o mecanismo de ação do hidróxido de cálcio até mesmo quando em contato direto^{12,25-27}.

O teste de difusão em meio sólido é uma técnica consagrada para avaliar a atividade antibacteriana de determinada substância. Entretanto, há de

se considerar as limitações que apresenta, entre as quais se pode citar a sua incapacidade de fornecer condições de igualdade para se comparar substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas²⁸. Além disso, a presença de enzimas bacterianas, a composição do meio, a densidade do inóculo, o tempo de incubação, a temperatura e a estabilidade do medicamento são fatores que influenciam em resultados conflitantes.

Considerando que o teste de difusão em ágar é mais eficiente para as substâncias solúveis em água, neste estudo se empregou o extrato seco de própolis suspenso em propilenoglicol. Assim, é possível fazer-se a ligação de que, sendo o propilenoglicol hidrossolúvel, a utilização do teste de difusão em ágar pode ser justificada.

Um aspecto que merece atenção é a presença de estudos que veiculam a própolis em substâncias como o etanol a 70 ou 80%^{6,8}, clorexidina a 0,06 e 0,12%⁷. A opção pelo propilenoglicol justificou-se pelo interesse em estudar apenas a ação da própolis frente ao *E. faecalis*, evitando qualquer tipo de alteração na atividade deste.

Os resultados obtidos para o extrato seco de própolis a 5 e 10% com ausência de halos de inibição mostraram a falta de ação destes sobre o *E. faecalis*. Esse fato permite questionarmos o emprego dessas substâncias nas situações clínicas em que ocorre a viabilidade desse micro-organismo. Por outro lado, estudos de Awawdeh et al.⁹ (2009) e Kandaswami et al.¹⁰ (2010) demonstraram resultados de boa eficácia antimicrobiana para a própolis. Entretanto, os estudos citados foram realizados *ex vivo*, em dentina infectada com *E. faecalis*, não podendo ser confrontados com o presente trabalho em razão das diferenças metodológicas.

Os resultados do presente estudo também diferem dos obtidos por Koo et al.⁶ (2000) e Maia Filho et al.⁸ (2008), os quais encontraram atividade antimicrobiana para o extrato de própolis frente ao *E. faecalis*. Explicações para essas diferenças podem estar relacionadas ao veículo. A maioria dos estudos emprega extrato hidroalcolico, ao passo que o presente estudo optou pelo emprego do propilenoglicol, substância desprovida de qualquer atividade antibacteriana.

Entretanto, a não produção de halos de inibição nem sempre pode significar que as substâncias não apresentam atividade antibacteriana, pois podem não apresentar boa difusão em ágar. Isso pode ocorrer pelo fato de os meios de cultura apresentarem substâncias tamponadoras. Assim, mesmo que sofram difusão, essa pode ser lenta em razão da baixa solubilidade da substância, o que faz com que os níveis de pH alcançados pelo meio não sejam elevados o suficiente para apresentar atividade antimicrobiana²⁹.

Esse foi o primeiro estudo que empregou a própolis suspensa em propilenoglicol, sendo necessário compreender melhor o comportamento dessa subs-

tância nesse veículo. A própolis é uma substância não solúvel em água, fato que explica a confecção de uma suspensão através do processo de levigação, onde se colocou a própolis em um gral e, aos poucos, foi adicionado o propilenoglicol, levigando a própolis nesse veículo e gerando uma suspensão facilmente dispersível. Para avaliar a veracidade dos resultados torna-se importante o emprego de outras metodologias, como os testes que apresentam meio de cultura líquido, por oferecerem maiores condições de igualdade para substâncias que possam apresentar dificuldades de dissociação e difusão em ágar.

Outro ponto que deve ser ressaltado é a diversidade dos componentes presentes em cada amostra de própolis. Alguns estão presentes em todas as amostras, ao passo que outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies de determinadas plantas e regiões. Pelo menos duzentos componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origens diversas, dentre os quais ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides, terpenos, esteroides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftalina³⁰. A atividade antimicrobiana possui maior ou menor efeito mediante os componentes químicos, o gênero da abelha coletora e os meios de preparo da própolis³¹. Essa constatação pode explicar a discrepância de resultados entre estudos de semelhante metodologia.

Conclusão

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, é lícito concluir que o extrato de própolis a 5 e 10% suspenso em propilenoglicol não evidenciou atividade antimicrobiana, *in vitro*, frente ao *Enterococcus faecalis*.

Abstract

Objective: the objective of this study is to evaluate in vitro the antimicrobial activity of 5% and 10% propolis suspension against Enterococcus faecalis (ATCC 29212). Methods: The agar diffusion test and the disc method were used for the following substances: (n = 19) propolis dry extract at 5% and 10%, chlorhexidine (positive control) and propylene glycol (negative control). The inhibition halos were measured after 24 hours. Results: Statistically significant differences were observed through the ANOVA (1 via) and Tukey test with 5% of significance level (p < 0.001). The chlorhexidine group showed bacterial growth inhibition halos with average size of 6.631mm, while propolis at 5% and 10% and the propylene glycol groups did not develop halos. Conclusion: The propolis extract suspension at 5% and 10% in propylene glycol did not present antimicrobial activity in vitro against Enterococcus faecalis.

Key-words: Propolis. Enterococcus faecalis. Endodontics.

Referências

1. Lima RVE. Análise histológica comparativa entre o extrato de própolis verde, óleo-resina da copaíba e a pasta Guedes-Pinto no processo de reparação da polpa dental de ratos [Dissertação de Mestrado] Natal: Curso de Odontologia da Escola de Saúde da Universidade Potiguar; 2007.
2. Arruda AO, Souza LG, Biz MT, Ramos IFAS, Figueiredo JAP, Mazzuoc C. Análise macroscópica e MEV da superfície do canal radicular após utilização do extrato de própolis a 0,25% como irrigante. *JBE* 2004; 5(19):280-7.
3. Bretz WA, Chiego Jr DJ, Marcucci MC, Cunha I, Custódio A, Schneider LG. Preliminary report on the effects of própolis on wound healing in the pulp. *Z Naturforsch C*. 1998; 53(11/12):1045-8.
4. Ghisalberti CL. Própolis: a review. *Bee world* 1979; 60:59-84.
5. Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, Vladimir-Knezevic S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available própolis products. *Acta Pharm* 2005; 55: 423-30.
6. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of própolis and Arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45(2):141-8.
7. Groisman S, Swerts MSO, Fiorini JE, Costa AMDD, Pereira AD, Sansone C. Antibacterial effects of solutions of própolis, chlorhexidine and their combinations on saliva microorganisms. *Caries Res* 2005; 39(4):329.
8. Maia Filho EM, Maia CCR, Bastos ACSC, Novais TMG. Efeito antimicrobiano *in vitro* de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre o *Enterococcus faecalis*. *RGO* 2008; 56(1):21-5.
9. Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of própolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. *Aust Endod J* 2009; 35:52-8.
10. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, própolis, morinda citrifolia juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *Int Endod J* 2010; 43(5):419-23.
11. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006; 39(4):249-81.
12. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 234-39.
13. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hidroxide in infected dental tubules. *J Endod* 1998; 24:15-7.
14. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study basic on scientific evidences. *J Appl Oral Sci* 2003; 11(4):269-82.
15. Silveira AM, Vieira LHP, Siqueira Jr JF, Macedo SB, Consolaro A. Periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz Dent J* 2007; 18(4):299-304.
16. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6:142-9.
17. Waltimo TM, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MP et al. Susceptibility of oral candida species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999; 32:96-8.
18. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30(5):315-20.
19. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16(10):498-504.
20. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31(1):1-7.
21. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26(10):593-5.
22. Peciuliene V, Reynayd AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34(6):429-34.
23. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolate from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(2):100-3.
24. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Aboim MC, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(6):741-9.
25. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* - the root canal survivor and "star" in post - treatment disease. *Endod Topics* 2003; 135-9.
26. Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small - understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J* 2007; 52 (Suppl 1):S38-S51.
27. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 39:399-405.
28. Estrela C, Rodrigues de Araújo Estrela C, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *J Endod* 2001 Dec; 27(12):720-3.
29. Gomes BPFAG, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(4):544-50.
30. Marcucci MC. Própolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; (26):83-99.
31. Swerts MSO, Freitas E, Silva DS, Maldonato DV, Totti DA, Costa JM, et al. Atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias bucais. *JBE* 2002; 3(10): 256-61.

Endereço para correspondência:

Márcia Helena Wagner
Rua Borges de Medeiros, 534/204 Centro
96810-034 Santa Cruz do Sul - RS
Fone: (51)3711-1242/ 9997-5639
E-mail: marciahwagner@gmail.com

Recebido: 17.05.2011 Aceito: 24.08.2011