



**Efecto antibacteriano de la Procaína al 2% más cafeína y del Propóleo al 40%
sobre cepas de *Enterococcus faecalis*: Estudio in vitro**

**Antibacterial effect of Procaine 2% with caffeine and of propolis 40% on strains
of *Enterococcus faecalis*: in vitro study**

**Efeito antibacteriano da procaína ao 2% mais cafeína e Própolis ao 40% sobre
cepas de *Enterococcus faecalis*: Estudo in vitro**

Tatiana Galuth Barragán Chaguaro¹, Roberto Xavier Romero Cazares²

RECIBIDO: 05/mar/2017 **CORREGIDO:** 03/jun/2017 **APROBADO:** 02/jul/2017

1 Egresado de la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecuador; tatianagaluth@hotmail.com

2 PhD en Formación. Especialista. Docente investigador, Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, Quito; xromero@uce.edu.ec

RESUMEN

El uso de agentes fitoterápicos en las áreas de la salud tienen cada vez más realce debido a su capacidad antibacteriana y gran biocompatibilidad. **Objetivo:** Evaluar la acción antibacteriana de la Procaína al 2% más Cafeína y del Propóleo 40% sobre cepas de *Enterococcus faecalis* como coadyuvante en la irrigación en el tratamiento de conducto. **Materiales y métodos:** La muestra fue de 28 cajas Petri con medio de cultivo Agar sangre de cordero. Fueron sembradas cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, en cada caja, fueron colocados sensibilizadores en blancos embebidos con las siguientes sustancias: G1: Hipoclorito de sodio al 5% (control positivo), G2: Propóleo 40%, G3: Procaína al 2% más cafeína al 0,25% (Impletol) y G4: Solución Salina (control negativo). Las muestras fueron sembradas en ambiente anaerobio e incubadas a 35°C, el diámetro de la zona de inhibición bacteriana fue medido después de las 48 horas. Los datos fueron analizados estadísticamente a través del test de Tukey con un nivel de significancia de 5%. **Resultados:** El valor de la media de los halos de inhibición por cada grupo fueron: (G1) 21,54; (G2) 10,18mm y 0,0mm para G3 y G4. Hubo diferencias estadísticamente significativas entre las sustancias utilizadas con el hipoclorito de sodio ($p \leq 0,05$). **Conclusiones:** El Propóleo es una sustancia apta para utilizarla como coadyuvante en la irrigación en el tratamiento de conducto, mientras que la procaína más cafeína no mostró ningún efecto antibacteriano sobre *E. faecalis*.

Palabras clave: Agentes fitoterápicos, Reducción bacteriana, Irrigantes endodónticos.

ABSTRACT

The use of phytotherapeutic agents in health areas has become increasingly important thanks to its antibacterial capabilities and considerable biocompatibility. **Objective:** to evaluate the antibacterial effect of procaine 2 % with caffeine and propolis 40 %, against *Enterococcus faecalis* strains, as an enhancer for irrigation in root canal treatment. **Materials and methods:** the sample consisted of 28 Petri dishes with a culture medium of lamb blood agar. Strains of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were cultured in each dish. White Sensi discs soaked in the mentioned substances were added: G1 – Sodium Hypochlorite with a 5 % concentration positive control; G2 - G2: propolis 40%, G3: Procaine 2 % concentration and caffeine. G2: Propóleo 40%, G3: Procaine 2% with caffeine 0,25% (Impletol) and G4: Saline Solution control negativo. The samples were cultured in an anaerobic environment and were incubated at 35°C, the diameter of the bacterial inhibition area was measured after 48 hours. The data recollected were statistically analyzed with the Turkey Test with a significance level of 5%. **Results:** the value of the average of inhibition halos for each group was: (G1)21,54;(G2)10,18mm and 0,0mm for G3 and G4. There were statistically significant differences between the substances used with the sodium hypochlorite ($p \leq 0,05$). **Conclusions:** the propolis is an adjuvant substance in the root canal treatment irrigation while the procaine with caffeine did not show any antibacterial effect on *E. faecalis*.

Keywords: phytotherapeutic agents, bacterial reduction, irrigant in endodontic.

RESUMO

O uso de agentes à base de plantas nas áreas da saúde tem cada vez mais importância devido à sua capacidade antibacteriana e elevada biocompatibilidade. **Objetivo:** Avaliar a ação antibacteriana da procaína ao 2% mais cafeína e Própolis 40% sobre cepas de *Enterococcus faecalis*, como adjuvante na irrigação no tratamento de canal. **Materiais e Métodos:** A amostra foi composta por 28 placas de Petri com meio de cultura ágar sangue de carneiro. Foram semeadas cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, em cada placa de petri, foram colocados discos sensíveis em alvos embebidos com as seguintes substâncias: G1: hipoclorito de sódio ao 5% (controle positivo), G2: Própolis 40%, G3: Procaína ao 2% mais cafeína 0,25% (Impletol) e G4: Solução salina (controle negativo). As amostras foram semeadas e incubadas em atmosfera anaeróbica a 35 ° C, o diâmetro da inibição bacteriana foi medido após 48 horas. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%. **Resultados:** O valor médio dos halos de inibição por grupo foram: (G1) 21,54; (G2) 10,18mm e 0,0 milímetros para G3 e G4. Houve diferenças estatisticamente significativas entre as substâncias utilizadas com o hipoclorito de sódio ($p < 0,05$). **Conclusões:** A própolis é uma substância adequada para uso como adjuvante em irrigação no canal radicular, descartando assim a eficácia antibacteriana sobre *E. faecalis* da procaína 2% mais cafeína.

Palavras-chave: Endodontia; cavidade pulpar; desinfetantes.

INTRODUCCIÓN

El uso de agentes fitoterápicos en Odontología cada vez es más constante debido a su capacidad antibacteriana y a la gran biocompatibilidad con los tejidos orales¹.

El origen microbiológico de las enfermedades pulpares es considerado como uno de los principales factores etiológicos, es por eso que un correcto preparo químico mecánico del sistema de conductos radiculares, es una de las etapas con mayor importancia dentro de la Endodoncia actual.²

La instrumentación mecánica, por si sola, no elimina completamente los microorganismos presentes en las infecciones endodónticas,³ existen varias superficies que no son instrumentadas por estos y se debe a las diversas características anatómicas que se presentan en el sistema de canales radiculares tales como istmos, canales accesorios, deltas apicales etc.^{4,5} Estas variables anatómicas han hecho que las investigaciones en el campo endodóntico se concentre en la búsqueda de métodos complementares de desinfección, buscando sustancias irrigadoras que ayuden o complementen la instrumentación con la desinfección química.⁶ Dichas sustancias deben tener entre sus características ideales la eliminación o disminución de la carga bacteriana, biocompatibilidad con los tejidos periapicales, disolución del tejido pulpar, sustantividad entre otras al igual que la de conseguir una desinflamación de la zona y por ende una regeneración apical.^{7,8} El fracaso del tratamiento de conducto está generalmente asociado a la presencia de biofilm bacteriano provocando reaparición de la sintomatología clínica^{9,10}

Una de las principales bacterias envueltas en la infección secundaria es el *Enterococcus faecalis*, la cual debido a su difícil erradicación se recurre a la utilización de sustancias irrigadoras químicas y medicación intracanal para tratar de conseguir un sistema de canales radiculares lo más aséptico posible.^{11,12}

Durante los últimos años se ha visto la necesidad de buscar nuevos irrigantes que sean capaces de reemplazar o de actuar sinérgicamente a las sustancias habituales y que por otro lado puedan tener una mejor biocompatibilidad con los tejidos periapicales.¹³

INTRODUCTION

The use of phytotherapeutic agents in Dentistry has become increasingly important as a consequence of their antibacterial capabilities and exceptional biocompatibility with oral tissue.

The microbiological origin of pulp infections is considered one of the most common etiological factors, which is why an adequate chemomechanical preparation of the root canal system is of significant importance in current Endodontic therapy.

Mechanical instrumentation on its own does not eliminate all microorganisms present in root canal infections. There may be many surfaces which do not get affected by the instrumentation due to a variety of anatomical characteristics inherent to the root canal system, such as, isthmus, cavity access, apical deltas, etc. These anatomical variables have caused that most of the research work developed in the Endodontic field is focused on finding complementary methods of disinfection, looking for irrigating substances that help or complement instrumentation along with chemical disinfection. Some ideal characteristics that such substances need to have are the ability to eliminate or reduce bacterial load, biocompatibility with periapical tissue, pulp tissue dissolution, substantivity, reduction of swelling and apical regeneration, among others. Failure of root canal treatment is generally associated to the presence of a bacterial biofilm, which causes the reappearance of clinical symptomatology.

One of the most common bacteria associated to secondary infection is *Enterococcus faecalis*. Due to the high difficulty regarding the removal of this strain of bacteria, it is common to use irrigating chemical substances and medication in an attempt to obtain a root canal system as aseptic as possible.

In the last two years, it has been made clear the need of new irrigants, capable of substituting or acting synergistically with the habitual substances, and, at the same time, that have a better biocompatibility with periapical tissue.

Últimamente, la medicina natural, ha recibido mucha atención de los científicos y clínicos, comprobando sus efectos fitoterapéuticos de las plantas y sus productos, demostrando entre unas de sus características, el combatir algunos agentes patógenos que afectan la salud de los seres humanos.^{1,2}

El Propóleo es una sustancia compleja, de origen vegetal que es preparado por las abejas a partir de la recolección de resinas producidas en algunas plantas, principalmente en árboles, una de las propiedades más importantes de este es la actividad antimicrobiana que posee, la cual es atribuida por los flavonoides, siendo este un compuesto bioactivo para tratamientos antisépticos, herpes, amigdalitis, posee propiedades cicatrizante, antiinflamatorias y anticariogénicas, por ello ha sido implementado en diversos tratamientos odontológicos como es en el caso de Cirugía Oral, Periodoncia, Endodoncia y Patología Oral entre otras.^{1,2}

La Procaína más Cafeína es utilizada en la terapia neural como una sustancia que posee efecto neural terapéutico ya que repolariza el milivoltaje de la membrana celular, reordenando de esta manera las funciones normales en el lugar del estímulo y en él o los sitios afectados,^{14,15,16} además, este producto es comercializado en el Ecuador con características de poseer efecto antibacteriano.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la acción antibacteriana de la Procaína al 2% más Cafeína al 0.25% y del Propóleo 40% sobre cepas de *Enterococcus faecalis*, como coadyuvante en la irrigación en el tratamiento de conducto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio contó con la aprobación del comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecuador (FO-UCE).

Se emplearon 28 cajas de Petri sembradas con cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, las

Natural medicine has received some recent attention from scientists, proving phytotherapeutic effects of plants and derived products, and showing the ability of fighting off pathogens that affect human health as one of its main characteristics.

Propolis is a complex substance of plant origin, made by bees in the process of collecting resins produced by some plants, especially trees. One of its main characteristics is its antimicrobial capability, which is acquired thanks to flavonoids, a bioactive component for antiseptic treatment, herpes, and tonsillitis. It has healing, anti-inflammatory, and anticarcinogenic properties. As a result, propolis has been implemented in a variety of dental treatments, such as Oral surgery, Periodontology, Endodontic therapy, and Oral pathology, among others.

Procaine enhanced with caffeine is used in Neural therapy because of its therapeutic effect, since it repolarizes the millivoltage of the cellular membrane, rearranging the normal functions on the stimulated, and affected areas. It also has antibacterial capabilities. Finally, this is a product commercialized in Ecuador.

Thus, the objective of this project is to evaluate the antibacterial action of procaine at a 2 % concentration enhanced by caffeine at a 0.25 % concentration, and propolis 40 %, against *Enterococcus faecalis*, as a complement for irrigation in root canal treatment.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Ethics Committee of the Dentistry School of the Central University of Ecuador (FO-UCE).

The sample consisted of 28 Petri dishes with the medium on lamb blood agar plates to culture the

cuales para su proceso de activación fue seguido el protocolo recomendado por la casa productora. (Medibac S.A)

La activación de la cepa se realizó en el laboratorio de la Facultad de Bioquímica de la Universidad Central del Ecuador, en donde se colocó a la cepa en un caldo de cultivo Mueller-Hinton, posteriormente y bajo un medio de anaerobiosis se procedió a incubarlas durante 48 horas a 37°C. Después de este tiempo se pudo observar el crecimiento de la bacteria por la presencia de turbidez en el tubo que fue cultivada. La estandarización de la cepa se realizó según la escala de Mc Farland 0.5 en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Central (FO-UCE), fue utilizado un inóculo de colonias aisladas de *E. faecalis* se midió el número de bacterias por milímetro y se sembró el mismo porcentaje de bacterias en las placas de agar sangre de cordero, logrando así la estandarización de las bacterias. Bajo condiciones estériles se procedió a cultivar la cepa de *E. faecalis* en 28 placas Petri con agar sangre de cordero, posteriormente y bajo la ayuda de una pipeta electrónica fueron embebidos los sensidiscos con 10µL de las diferentes sustancias, las cuales fueron divididas en 4 grupos: G1: Hipoclorito de sodio al 5% (control positivo), G2: Propóleo 40%, G3: Procaína al 2% más cafeína al 0,25% (Impletol) y G4: Solución Salina (control negativo). Una vez impregnados los sensidiscos con cada una de las sustancias de estudio se esperó 3 minutos para lograr una adecuada absorción, luego se colocó en las cajas Petri las cuales fueron insertadas en jarra de anaerobiosis facilitando el crecimiento de la bacteria. Todas las muestras fueron incubadas a 35°C por un periodo de 48 horas.

Una vez transcurrido el tiempo estipulado se pudo observar el crecimiento de *E. faecalis* en el agar y los halos de inhibición formados (Figura 1). Seguido a esto se procedió a medir cada uno de los halos formados con la ayuda de una regla milimetrada.

strain ATCC 29212 of *Enterococcus faecalis*, following the procedure for bacteria activation recommended by the manufacturer (Medibac S.A.).

The strain activation was performed in the laboratory of Biochemistry School of the Central University of Ecuador. The strain was placed in a Mueller-Hinton broth. The strains were incubated on an anaerobic medium at 30 °C for 48 hours. After that time, it was possible to see the growth of the bacteria by looking at the turbidity of the tube where it was cultured. The standardization of the strain was done according to the Mc Farland 0.5 scale in the laboratory of Dentistry School of the Central University of Ecuador (FO-UCE). The strain used was an isolated colony of *Enterococcus faecalis* culture, counting the number of bacteria per millimeter, and culturing the same percentage of bacteria on the lamb blood agar plates, and thus, achieving the standardization of the bacteria. The strain was cultured under sterile conditions. Using an electronic pipette, the discs were soaked with 10µL of the different substances. They were divided into four groups: G1: Sodium hypochlorite at 5 % concentration, G2: Propolis 40 %, G3: Procaine at 2 % concentration with caffeine at 0,25 % (Impletol), and G4: saline solution (negative control). The discs were soaked with the respective substances of study for three minutes until proper absorption is attained. Then, they were placed on the Petri dishes fixed to the anaerobic container, allowing a correct growth of the bacteria. All samples were incubated at 35 °C for 48 hours.

After this time was completed, the bacterial growth and the inhibition halos were visible (Figure 1). Next, the halos were measured using the right tool.

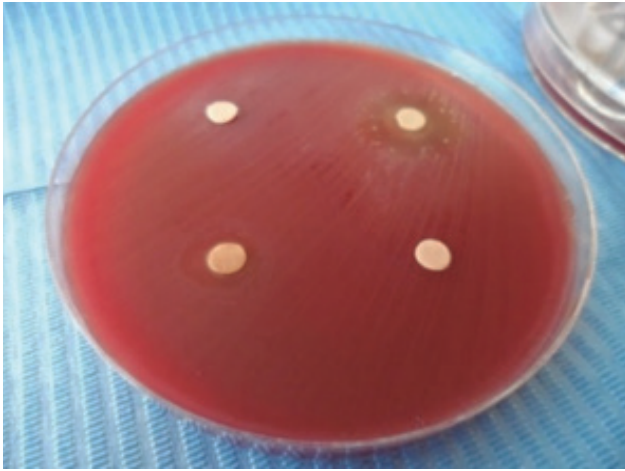


Figura 1: Colocación de sensidisks en medio agar para observar los halos de inhibición de los diferentes grupos de estudio.

Los resultados obtenidos se evaluaron según los criterios de sensibilidad y resistencia citados por The guidelines of National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).¹⁷

Sensible: Halos de inhibición ≥ 10 mm
Resistente: Halos de inhibición < 10 mm

Posteriormente se procedió a la eliminación de las muestras clasificándolos como desechos infecciosos ya que contenían muestras biológicas contaminada (Protocolo de eliminación de desechos biológicos de la FO-UCE), para lo cual todas las cajas Petri utilizadas fueron llevadas al autoclave por 30 minutos a 121°C.

Los datos fueron procesados y analizados a través del programa Bioestat 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, AM Brasil). El análisis estadístico utilizado fue el test de Tukey con un nivel de significancia de 5%.

RESULTADOS

La media de los halos de inhibición de los diferentes grupos estudiados en las 28 placas Petri se observan en la Tabla 1.

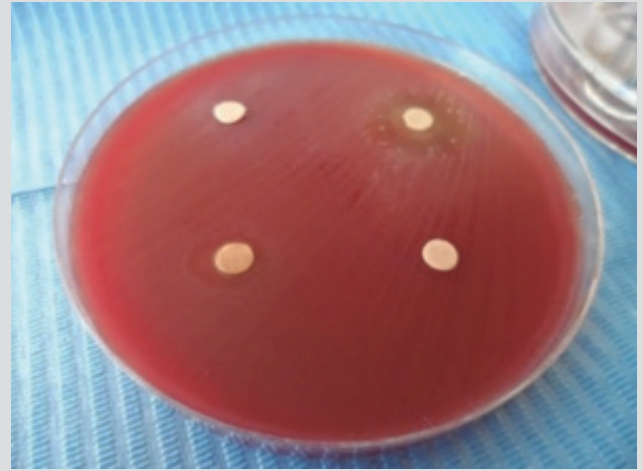


Figure 1: Location of Sensi-discs in agar medium to observe the inhibition halos of the different groups of study.

The results obtained were evaluated according to the criteria of sensibility and resistance mentioned by The guidelines of National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).¹⁷

Sensitive: inhibition Halos ≥ 10 mm
Resistant: inhibition Halos < 10 mm

After that, the samples were eliminated as infectious waste because they contained contaminated biological samples. Biological waste disposal protocol of FO-UCE, for this all the Petri dishes used were taken to the autoclave for 30 minutes at 121°C.

The data was processed and analyzed with the Bioestat 5.3 Program (institute of development Sustentável Mamirauá, Tefé, AM Brasil). The statistical analysis used was the Tukey Test with a significance level of 5%.

RESULTS

The average of the inhibition halos of the different groups studied in the 28 Petri dish is shown in the Chart 1.

Tabla 1. Media y Desviación Estándar de los grupos estudiados (N=28)

SUSTANCIAS	MEDIA (mm)	DESVIACION ESTANDAR
PROPOLEO (G2)	10,18	± 1,442
PROCAINA + CAFEINA (G3)	0.00	0.0
CONTROL POSITIVO (G1)	21,54	± 4,096
CONTROL NEGATIVO (G4)	0.00	0.0

Fue observado una diferencia estadísticamente significativa con los grupos G2, G3 y G4 comparados con el grupo control positivo (Cuadro 1).

Cuadro 1: Test de Tukey de los grupos estudiados.

Grupos de Estudio		p
G1: Hipoclorito de sodio al 5%	G2: Propóleo al 40%	0,013
	G3: Procaína + Cafeína	< 0,001
	G4: Suero Fisiológico	< 0,001

DISCUSIÓN

En el campo de las ciencias de la salud son utilizados con mayor frecuencia productos naturales para tratamiento de diferentes dolencias, así como, nuevos productos que no causen efectos negativos en los tejidos circundantes.

El propóleo sustancia compleja de origen vegetal que es preparado por las abejas a partir de la recolección de resinas producidas en algunas plantas presentan actividad antimicrobiana.² Numerosos estudios demuestran la actividad antibacteriana del Propóleo en Odontología, Koo et al., 2002¹⁸ evidencian la actividad antimicrobiana del Propóleo sobre cepas de *S. mutans* al igual que la capacidad de esta sustancia para la inhibición de la glucosiltransferasa. Otro estudio muestra efecto antibacteriano de la solución hidroalcohólica del Propóleo al 4% en el 62% de los Streptococos del grupo *viridans*, 85% de *S. aureus* y 85% de *lactobacillus sp.*¹⁹ Ferreira et al., 2007²⁰. observaron que el extracto etanólico de Propóleo es tan efectivo como las otras sustancias

Chart 1. Average and standard deviation of the studied groups (N=28)

SUBSTANCES	AVERAGE (mm)	STANDARD DEVIATION
PROPOLIS (G2)	10,18	± 1,442
PROCAINE + CAFFEINE (G3)	0.00	0.0
POSITIVE CONTROL (G1)	21,54	± 4,096
NEGATIVE CONTROL (G4)	0.00	0.0

There was a significant statistical difference with the groups G2, G3 and G4 compared with the positive control group (Chart 1).

Chart 1: Turkey Test of the studied groups.

Groups of Study		p
G1: Sodium hypochlorite 5%	G2: Propóleo al 40%	0,013
	G3: Procaine + Caffeine	< 0,001
	G4: Saline Solution	< 0,001

DISCUSSION

Health areas are increasingly using natural products for the treatment of different diseases, as well as new products that do not produce negative effects on the surrounding tissues.

The propolis, a complex substance of vegetal origin prepared by bees from the collecting of resins produced in some plants, presents antimicrobial activity.² Multiple studies show the antibacterial activity of Propolis in dentistry, Koo et al., 2002¹⁸ proof the antimicrobial activity of Propolis over *S. mutans* strains as well as the ability of this substance to inhibit the glucosyltransferase. Other study shows the antibacterial effect of the hydroalcoholic solution of propolis at 4% in the 62% of Streptococcus *viridians*, 85% of *S. aureus* and 85% of *lactobacillus sp.*¹⁹ Ferreira et al., 2007²⁰. observed that the ethanolic extract of Propolis is as effective as other substances used as antibacterials in

utilizadas como antibacterianos en los conductos radiculares frente a *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens*. Estudios realizados en FO-UCE^{21,22} evidenciaron en el primer caso que el extracto de Propóleo utilizado al 10% produjo un halo de inhibición medio de 14,75 mm sobre cepas de *Enterococcus faecalis* siendo mayor al del Hidróxido de Calcio. De igual manera Soon²² pudo comprobar la eficacia del Propóleo al compararlo con el Hipoclorito de Sodio al 2.25% sobre la misma cepa bacteriana, observando resultados más favorables para el Propóleo. Arslan et al., 2011²³ demostraron que el Propóleo posee actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* y *Candida albicans*. Moncla et al., 2012²⁴ evaluaron el efecto del extracto de Propóleo sobre cepas de *Enterococcus*, observando una inhibición en el crecimiento de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*. Estos estudios muestran que el Propóleo posee actividad inhibitoria sobre *E. faecalis* al igual que lo evidenciado en el presente estudio. Drago et al.,²⁵ demostraron la actividad antibacteriana del Propóleo especialmente sobre bacterias Gram positivas y levaduras. Maia et al., 2008²⁶ demostraron que el extracto de Propóleo presentó mayor actividad antimicrobiana, siendo superior el halo inhibitorio que el del Hipoclorito de Sodio al 5% contra *E. faecalis*, estos resultados son diferentes a los encontrados en el presente estudio, lo cual podría deberse a que fueron utilizados extractos hidroalcohólicos con concentración mayor de alcohol 7:3 (alcohol 70% y Propóleo 30%), en nuestro estudio se utilizó una concentración de 30:30:40 (alcohol 30%, solución salina 30%, propóleo 40%), al igual que el hipoclorito de sodio el cual fue de reciente preparación.

En el presente estudio se pudo evidenciar que el Propóleo posee actividad antibacteriana contra cepas puras de *E. faecalis*, al igual que en los estudios presentados anteriormente, lamentablemente la concentración de flavonoides presentes en el propóleo varía mucho y eso hace difícil poder conseguir una concentración adecuada de estos compuestos a los cuales se les atribuye su poder bacteriano.^{27,28,29} A pesar de obtener capacidad inhibitoria sobre cepas de *E. faecalis* y al comprar los resultados con el hipoclorito de sodio se evidencia que el propóleo no podría ser una sustancia utilizada como irrigante primario en los tratamientos de conducto por lo que su in-

the root canals against *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens*. Previous studies carried out on FO-UCE^{21,22} showed in the first case that the propolis extract at 10% produced a poor inhibition halo 14,75mm on *Enterococcus faecalis* siendo strains higher than the calcium hydroxide. In the same way, Soon²² proved the Propolis effectiveness when comparing it with the Sodium Hypochlorite 2,25% on the same bacterial strain, getting better results for the Propolis. Arslan et al., 2011²³ showed that the Propolis has antimicrobial against *E. faecalis* y *Candida albicans*. Moncla et al., 2012²⁴ evaluated the effect of Propolis extract on *Enterococcus* strains, which showed an inhibition in the growth of *E. faecium* and *E. faecalis* strains. This studies show that the propolis has inhibiting activity on *E. faecalis* as well as the results in the present study. Drago et al.,²⁵ showed the Propolis antibacterial action specially on Gram-positive bacteria and yeasts. Maia et al., 2008²⁶ showed that the Propolis extract had higher antimicrobial activity, with a greater inhibitory halo than the Sodium hypochlorite 5% against *E. faecalis*, these results are different than the ones found in the present study, which could be due to the use of hydroalcoholic extracts with higher concentration of alcohol 7:3 (70% alcohol and 30% propolis), in our study we used a concentration of 30:30:40 (30% alcohol, 30% saline solution, 40% propolis) as the Sodium hypochlorite which was recently prepared.

In this study, the propolis has antibacterial action against pure *E. faecalis* strains, as well as the previous studies above, unfortunately, the flavonoids concentration in the propolis changes a lot and that makes it difficult to achieve an adequate concentration of these compounds to which they attribute their bacterial power.^{27,28,29} Despite the fact of getting inhibitory capacity on strains of *E. faecalis* and when comparing the results with the sodium hypochlorite, it is evident that the propolis could not be a substance used as a primary irrigator in the root canal treatment so that it would be suggested as a complementary irrigator

dicación estará dada como un irrigante complementario ya que su capacidad antibacteriana y biocompatibilidad con los tejidos periradiculares lo hace poseer características del irrigante ideal.³⁰ Por otro lado, la actividad antibacteriana de la Procaína más Cafeína sobre cepas de *E. faecalis* no fue demostrado en el presente estudio, por lo que no concuerdan con Machiavelli³¹ quien le atribuye a la Procaína una actividad antibacteriana, cabe recalcar que este autor no menciona que bacterias presentan susceptibilidad a esta sustancia e indica que actualmente se está realizando estudios para determinar que bacterias son susceptibles a esta sustancia, en cuanto a la cafeína se ha podido determinar la importancia de ésta en la cavidad oral demostrando su capacidad inhibitoria sobre algunas bacterias como *S. mutans* y *S. Sanguis*,³² además la interacción de esta sustancia con algunos antibióticos también ha sido relatado, evidenciando capacidad inhibitoria en cepas de *S. aureus* y Enterobacterias.^{33,34}

En nuestra investigación, al realizar el análisis se demostró que el Propóleo si posee un efecto antimicrobiano contra *E. faecalis* y que es una sustancia apta para utilizarla como coadyuvante en la irrigación mientras que la Procaína más Cafeína (Impletol) no posee dicha acción.

La elección de la capa bacteriana se dio ya que la mayoría de estudios in vitro utilizan al *E. faecalis* como modelo de evaluación de resultados a diferentes protocolos de instrumentación, sustancias irrigadoras o medicamento intracanal, ya que esta bacteria posee una alta capacidad para resistir al preparo químico mecánico del tratamiento de conducto, formar biofilms de sobrevivir bajo condiciones escasas de nutrientes.³⁴ De la misma manera estudios in vivo demuestran que la tasa de permanencia de esta bacteria después del preparo químico mecánico es elevada.³⁵

Es por eso que se recomienda realizar estudios utilizando estas sustancias con otro tipo de bacterias que se podrían cultivar de los conductos necróticos radiculares, al igual que evaluar las sustancias que produjeron mejor efecto antibacteriano en biofilms multiespecies de por lo menos 21 días de maduración a través de métodos moleculares.

since its antibacterial capacity and biocompatibility with the periradicular tissues makes it have characteristics of the ideal irrigator.³⁰ In the other hand, the procaine with caffeine antibacterial activity on *E. faecalis* strains was proved on the current study, so it does not agree with Machiavelli³¹ who attributes an antibacterial action to procaine, it should be noted that this author does not mention which bacteria is susceptible to this substance and points that nowadays, studies are under way to determine which bacteria are susceptible to this substance, in terms of caffeine, it has been possible to determine the importance of it in the mouth showing its inhibitory capacity on some bacteria like *S. mutans* and *S. Sanguis*,³² furthermore, the interaction of this substance with some antibiotics has also been related, having inhibitory action on *S. aureus* strains and enterobacteria,^{33,34}

In the current study, when doing the analysis, it was shown that the propolis has an antimicrobial effect against *E. faecalis* and that it is a substance suitable for using as an adjuvant in irrigation, whereas procaine with caffeine (Impletol) does not have this action.

The bacteria strain choosing was because of most in vitro studies use *E. faecalis* as a model of evaluation of results to different cleaning and shaping protocols, irrigating substances or intracanal medication in order that this bacteria has a high ability to resist chemomechanical preparation during the root canal treatment, making up biofilms capable of living in poor nutrient conditions.³⁴ In the same way, in vivo studies show that this bacteria permanence rate after the chemical and mechanical preparation is very high.³⁵

This is the reason why it is recommended to do studies using substances with other kind of bacteria that could be cultivated in necrotic root canals, as well as evaluating the substances that had better antibacterial effect on biofilms with multiple species Of at least 21 days mature through molecular methods.

CONCLUSIÓN

La procaína más cafeína no mostró ningún efecto antibacteriano sobre *E. faecalis* mientras que el propóleo si presenta efecto inhibitorio y puede ser considerado como irrigante complementar en el tratamiento de conductos.

CONCLUSION

Procaine with caffeine did not show any antibacterial effect on *E. faecalis* while the propolis do present an inhibitory effect and it may be considered as complementary irrigator for root canal treatments.

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. Premoli G; Laguado P; Díaz N; Romero C; Villarreal J; González A. Uso del Propóleo en Odontología. Acta Odontológica Venezolana, 2010;48(2)
2. Jean-Prost P, Le Conte Y. Apicultura Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena. 4ta ed. Madrid: Ediciones mundi-Prensa; 2007.
3. Siqueira JF, Jr., Alves FR, Versiani MA, Roccas IN, Almeida BM, Neves MA, et al. Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. J Endod. 2013;39(8):1044-50.
4. Versiani MA, De-Deus G, Vera J, Souza E, Steier L, Pecora JD, et al. 3D mapping of the irrigated areas of the root canal space using micro-computed tomography. Clin Oral Investig. 2015;19(4):859-66.
5. Amoroso-Silva P, Alcalde MP, Hungaro Duarte MA, De-Deus G, Ordinola-Zapata R, Freire LG, et al. Effect of finishing instrumentation using NiTi hand files on volume, surface area and uninstrumented surfaces in C-shaped root canal systems. Int Endod J. 2017;50(6):604-11.
6. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG, et al. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. Acta Odontol Scand. 2013;71(3-4):424-31.
7. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32(5):389-98.
8. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. Dent Clin North Am. 2010;54(2):291-312.
9. Nair PN, 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.
10. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15(6):348-81.
11. Chávez de Paz L. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities. Journal of Endodontics, 2007;33(6):652-62.
12. Pinheiro ET; Gomes BPF; Druker DB; Zaia AA; Ferraz CCR; Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. International Endodontic Journal, 2004;37:756-63.
13. Zehnder M. Root Canal Irrigants. Journal of Endodontics, 2006; 32(5):389 –98
14. Weinstein MP. Comparative Evaluation of Penicilin, Ampicilin and Imipenem MICs and Susceptibility Breakpoints for Vancomycin-Susceptible and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. Journal of Clinical Microbiology, 2001;39(7):2729-31.

15. Panaque MR; Gonzalez AM; Rodriguez BM. Utilidad de la terapia neural en sepsis de conductos radiculares 2008 - 2009. Policlínico tipo III. *Multimed*, 2009;13(3-4).
16. Morse D. Immunologic aspects of pulpal-periapical diseases: A review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1977;43(3):436-51.
17. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012;29(1).
18. Koo H; Rosalen PL; Cury JA; Park YK; Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002;46(5):1302-9.
19. Gutiérrez MS; Romero GC; Hidalgo GCR; Pérez CEO; Díaz PB. Acción antibacteriana de la tintura hidroalcohólica de propóleos al 4 % en gérmenes de origen endodóncico. *AMC*;1999,3(4).
20. Ferreira FB; Torres SA; Rosa OP; Ferreira CM; Garcia RB; Marcucci MC; Gomes BP. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007;104(5):709-16.
21. Gonzalón López, Lilian Patricia. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano como medicamento intraconducto entre el hidróxido de calcio y el extracto de propóleo sobre el *enterococcus faecalis*, [Tesis de pregrado]. Quito: Univerisidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología;2015
22. Soon, Ji. Estudio comparativo in vitro de la actividad antimicrobiana de Propóleo versus Hipoclorito de Sodio utilizados como irrigantes en Endodoncia. [Tesis de Posgrado de Endodoncia]. Quito: Univerisidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología;2013
23. Arslan S; Ozbilge H; Kaya EG; Er O. In vitro antimicrobial activity of propolis, BioPure MTAD, sodium hypochlorite, and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Saudi medical journal*, 2011;32(5):479-83.
24. Moncla BJ; Guevara PW; Wallace JA; Marcucci MC; Nor JE; Bretz WA. The inhibitory activity of typified propolis against *Enterococcus* species. *Z Naturforsch*, 2012;67(5-6):249-56.
25. Drago L; Mombelli B; De Vecchi E; Fascina MC; Tocalli L; Gismondo M. In Vitro Antimicrobial Activity of propolis dry extract. *J Chemoterapy*, 2000;12(5):390-5.
26. Maia Filho E; Maia C; Bastos A; Novais T. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodónticas e propolis sobre *Enterococcus faecalis*. *RGO*, 2008; 56(1):21-5.
27. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012;23(2):174-81.
28. Cushnie TP; Lamb A. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2011, 38(2):99-107.
29. Petti S; Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of Dentistry*. 2009;37(6):413–23.
30. Van der Waal S; Oonk C; Nieman S; Waselink P; De Soet J; Crielaard W. Additional disinfection with a modified salt solution in a root canal model. *Journal of Dentistry*. 2015;43(10):1280–84.
31. Machiavelli R. La Terapia Neural 2006 Disponible en: <http://www.terapianeural.com>.
32. Ferrazzano GF; Amato I; Ingenito A; De Natale A; Pollio A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia*. 2009;80(5):255-62.

33. Esimone CO; Okoye FBC; Nworu CS; Agubata CO. In vitro interaction between caffeine and some penicillin antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2008;7(2):969-74.
34. Almeida AA; Farah A; Silva DA; Nunan EA; Gloria MB. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *J Agric Food Chem*. 2006;54(23):8738-43.
35. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(5):308-20.
36. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod*. 2015;41(8):1207-13