

Mayta Tovalino, Frank R.; Sacsaquispe Contreras, Sonia
Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de
Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y
Staphylococcus aureus (ATCC 25923)
Revista Estomatológica Herediana, vol. 20, núm. 1, enero-marzo, 2010, pp. 19-24
Universidad Peruana Cayetano Heredia
Lima, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=421539355004>

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

Frank R. Mayta Tovalino¹
Sonia Sacsaquispe Contreras²

¹Cirujano Dentista
²Docente del Departamento Académico de Medicina, Cirugía y Patología Oral. Facultad de Estomatología. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Correspondencia

Frank Roger Mayta Tovalino.
Calle Santa María Reyna Mz. Q Lt. 30 Urb. San
Diego - Lima 31, Perú
Teléfono: 99117-8533 / 573-0527
e-mail: comunez18@hotmail.com

Recibido : 26 de setiembre del 2008

Aceptado : 15 de abril del 2009

RESUMEN

El propósito del estudio fue demostrar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo (EEP) de Oxapampa-Perú evaluando *in vitro* su acción antibacteriana frente al *S. mutans* y *S. aureus* para enfrentarlas a las soluciones: Propóleo 10% y 30% y compararlas con los testigos clorhexidina 0,12 y 0,05%, listerine® y agua destilada. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de Kirby-Bauer. El diseño del estudio fue de tipo experimental *in vitro* y el tamaño muestral fue 16. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba t de Student. Se determinó que para el *S. aureus*, el EEP al 30% presentó mayor eficacia con una media de 11,77mm±0,19 y se encontró que las dos concentraciones de propóleo a las 24 y 48 horas mostraron diferencia significativa $p=0,007$. Además, se determinó que para el *S. mutans*, tanto el EEP al 10% y 30% a las 24 y 48 horas no mostraron diferencia significativa. Se concluye que el EEP al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano que el Listerine® contra el *S. mutans* $p<0,001$ e igual en efectividad que la clorhexidina 0,05% frente al *S. aureus*.

Palabras clave: PRÓPOLIS / *Streptococcus mutans* / *Staphylococcus aureus*.

Evaluation *in vitro* of antibacterial effect of ethanolic extract of propolis of Oxapampa - Peru against *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

ABSTRACT

The purpose of this study was to demonstrate the antibacterial effect of ethanolic extract of propolis of Oxapampa-Peru, evaluating *in vitro* its antibacterial action against *S. mutans* and *S. aureus* to compare with the solutions: Propolis 10 and 30%, Clorhexidine 0.12 and 0.05%, Listerine® and distilled water, using the Kirby-Bauer method. The study design was experimental *in vitro* and the sample size was n=16. For the analysis of data we used the Student t test. It was found that for *S. aureus*, the EEP-30% was more effective with an average of 11.77±0.19 mm and found that both concentrations of propolis at 24 and 48 hours showed significant difference $p=0.007$. Furthermore, it was determined that for *S. mutans*, the EEP 10 and 30% at 24 and 48 hours showed no significant differences. In conclusion, the EEP 30% had the greatest antibacterial effect than Listerine® against *S. mutans* with $p<0.001$ and EEP 30% had the same activity that chlorhexidine 0.05%, over *S. aureus*.

Key words: PROPOLIS / *Streptococcus mutans* / *Staphylococcus aureus*.

Introducción

La cavidad oral alberga innumerales microorganismos en un ecosistema de complejidad considerable. Estos microorganismos constituyen la flora oral del ser humano, la cual es altamente diversa. Estos microorganismos orales son parte importante en la salud y la enfermedad oral; por lo tanto es de vital importancia buscar nuevas sustancias para ayudar a controlar la proliferación de estos microorganismos.

El propóleo es una sustancia compleja constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia (1-3). Además una de las propiedades más importantes del propóleo es su actividad antibacteriana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides (2-4). Al igual que la miel, el propóleo se conoce desde la más remota antigüedad y ha sido utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades. Con el posterior

desarrollo de la farmacéutica y tratamientos fitoterápicos existe un resurgimiento en su uso. Es por esa razón que en los últimos años se han realizado algunas investigaciones acerca de los productos provenientes de las abejas y sus potenciales beneficios para la salud oral (4). Por lo tanto, es de resaltar que el Perú tiene una gran biodiversidad en flora, la cual favorece el desarrollo de la apicultura especialmente en la zona del valle de Oxapampa en el departamento de Pasco.

Por lo tanto este trabajo de investigación se enfoca en determinar la acción antibacteriana del extracto etanólico de propóleo (EEP) de Oxapampa - Perú frente a dos cepas de microorganismos de la cavidad oral como el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus mutans*.

Material y métodos

El presente estudio, de tipo experimental *in vitro*, estuvo conformada por 16 cultivos de las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Obtención del EEP: El propóleo fue extraído de la región de Oxapampa - Perú, con la ayuda de un especialista con experiencia en la recolección de este recurso natural de un Centro de Apicultura. Se recolectaron 1500 Kg. y se procedió a envasarlo para su transporte.

El propóleo fue recolectado mediante condiciones de higiene, las cuales impidieron la contaminación de esta, se separaron algunos componentes que no forman parte de ella como restos pequeños de madera, de hojas y otros, que puedan alterar su composición.

El transporte del propóleo desde el lugar de recolección hacia un Instituto de Investigación Farmacéutica de Recursos Naturales; se realizó en frascos de vidrio estériles para evitar la contaminación del propóleo.

Para el procesamiento del EEP, el propóleo fue extendido sobre una mesa y se seleccionaron aquellos que no presenten impurezas, luego fue cortado en trozos pequeños y posteriormente pulverizado en un mortero de porcelana y fue extraído con alcohol de 70°csp 100ml. Se prepararon dos extractos

alcohólicos, al 10% y al 30% por maceración durante 8 días a 37°C en estufa; luego se filtró varias veces con papel filtro whatman número 40 y se obtuvo la solución etanólica del propóleo.

Después fue sometido a un rotavapor a 40°C para extraer el etanol, luego de este proceso, aun queda residuos de etanol dentro del extracto el cual tiene que ser eliminado totalmente. Todo este proceso fue llevado a cabo en un Instituto de Investigación Farmacéutica de Recursos Naturales.

Procedimiento microbiológico: El Cultivo de las cepas se realizó en el laboratorio de microbiología de la UPCH, por el investigador principal, bajo la supervisión de una microbióloga antes de realizar el cultivo de las cepas, estas fueron reactivadas debido a que se encontraban a -80°C, para lo cual, fueron sometidos a dos pasos de reactivación a las 24 y 48 horas antes del experimento y fueron colocadas a 37°C. Posteriormente se realizó el sembrado selectivo mediante la técnica del hisopado sobre los medios de cultivo respectivos.

- Agar Müller Hinton (MH): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- Agar Brain Heart Infusion (BHI): *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Para la preparación de los medios de cultivo, se prepararon 10 tubos de ensayo con Caldo Brain Heart Infusión (BHA), 10 tubos de ensayo con Caldo Müller Hinton (MHB) y 10 tubos de ensayo con Thioglicolato.

Además se prepararon 12 placas de medio BHI con 20ml de medio y 12 placas de medio MH con 20ml de medio, para los cuales se emplearán 250ml de BHA, 250ml de

MHA, 100ml de BHI y 100ml de MHB, 100ml de Thioglicolato y 50ml de H2O destilada.

La preparación de los discos con EEP, fue con los discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales fueron embebidos con 60µl de EEP al 10% y al 30% respectivamente y como pruebas de control se utilizaron discos de papel filtro whatman embebidos en agua destilada y clorhexidina al 0.12%, clorhexidina al 0,05%, Amoxicilina y listerine solución que fueron colocados inmediatamente para el enfrentamiento bacteriano en los medios de cultivo específicos para cada tipo de bacteria.

Para el análisis de la actividad antimicrobiana del EEP, los discos con EEP al 10% y 30% fueron colocados en placas petri estériles conteniendo el agar nutritivo específico para cada cepa, incubadas a 37°C, por 24 y 48 horas, la actividad antimicrobiana fue determinada por la formación del halo inhibitorio alrededor de los discos medida mediante una regla vernier, el cual, nos determinó la cantidad en milímetros del diámetro del halo de inhibición.

Los datos fueron registrados mediante una ficha de recolección de datos.

Una vez terminada la elaboración de la prueba piloto, se procedió a verificar las mediciones de los halos de inhibición entre el investigador principal y la especialista en microbiología, para lo cual de uso la prueba de Coeficiente de correlación intraclass (0,9) para determinar la calibración del investigador principal.

Consideraciones éticas: El presente estudio *in vitro* que trabajó con cepas bacterianas fueron registradas y se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de la UPCH.

Análisis estadístico: Los datos fueron procesados y analizados mediante el programa SPSS versión 15. Para el análisis univariado, se procedió a obtener la media y desviación estándar de las variables en estudio, registrada en una tabla de frecuencia.

Para conocer si la muestra tenía distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene y para el análisis bivariado, se observó la relación de las variables dependiente e independiente; se realizó la Prueba t de Student con una significancia estadística de $p=0,05$.

Resultados

Al analizar la acción antibacteriana contra el *S. aureus* de los EEP, se encontró que el propóleo al 10% presentó una media de 9,95mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,62 mientras que el propóleo al 30% presentó una media de 11,77mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,19. Al comparar se encontró que el diámetro del halo de inhibición contra el *S. aureus* de las dos concentraciones de propóleo mostraron diferencia significativa ($p=0,007$) (Tabla 1).

Al analizar la acción antibacteriana contra el *S. mutans* de los EEP, se encontró que el propóleo al 10% presentó una media de 11,47mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,57 mientras que el propóleo al 30% presentó una media de 11,57mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,97. Al comparar se encontró que el diámetro del halo de inhibición contra el *S. mutans* de las dos concentraciones de propóleo no mostraron diferencia significativa ($p=0,865$) (Tabla 2).

Al analizar la acción

antibacteriana contra el *S. aureus*, se encontró que el propóleo al 10% presentó una media de 9,95mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,62. Al comparar se encontró que el EEP al 10% fue mayor al compararlo con el de listerine® $p<0,001$. Además, se encontró que el diámetro del halo de inhibición del EEP al 10% fue menor al compararlo con el de la clorhexidina al 0,05% con un $p=0,010$. Y se encontró que el diámetro del halo de inhibición del EEP al 10% fue menor al compararlo con el de la clorhexidina al 0,12% ($p=0,001$). Al analizar la acción antibacteriana contra el *S. aureus*, se encontró que el propóleo al 30% presentó una media de 11,77mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,19. Al comparar se encontró que el diámetro del halo de inhibición del propóleo al 30% fue mayor al compararlo con el de listerine® con un $p<0,001$. Además, se encontró que el diámetro del halo de inhibición del propóleo al 30% fue mayor al compararlo con el de la clorhexidina al 0,05% con un $p=0,237$. Y se encontró que el diámetro del halo de inhibición del propóleo al 30% fue menor al compararlo con el de la clorhexidina al 0,12% ($p=0,001$) (Tabla 3).

Al analizar la acción anti-

bacteriana contra el *S. mutans*, se encontró que el propóleo al 10% presentó una media de 11,47mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,57. Al comparar se encontró que el diámetro del halo de inhibición del propóleo al 10% fue menor al compararlo con el de la clorhexidina 0,05% con un $p<0,001$. Y se encontró que el diámetro del halo de inhibición del propóleo al 10% fue menor al compararlo con el de la clorhexidina 0,12% ($p=0,001$). Al analizar la acción antibacteriana contra el *S. mutans*, se encontró que el propóleo al 30% presentó una media de 11,57mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,97. Al comparar se encontró que el diámetro del halo de inhibición del propóleo al 30% fue mayor al compararlo con el de la clorhexidina 0,05% con un $p<0,001$. Además, se encontró que el diámetro del halo de inhibición del propóleo al 30% fue menor al compararlo con el de la clorhexidina 0,12% ($p<0,001$) (Tabla 4).

Tabla 1. Evaluación *in vitro* de la acción antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleo de Oxapampa - Perú frente al *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Halo a las 24 horas.

| Grupo | Media | Mediana | Min | Max | DS |
|--------------|-------|---------|-------|-------|------|
| Propóleo 10% | 9,95 | 9,95 | 9,30 | 10,60 | 0,62 |
| Propóleo 30% | 11,77 | 11,82 | 11,50 | 11,95 | 0,19 |

Prueba T ($p=0,007$); Shapiro-Wilk=0,454; Prueba de Levene=0,005.

Tabla 2. Evaluación *in vitro* de la acción antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleo de Oxapampa - Perú frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Halo a las 24 horas.

| Grupo | Media | Mediana | Min | Max | DS |
|--------------|-------|---------|------|------|------|
| Propóleo 10% | 11,47 | 11,55 | 10,8 | 12,0 | 0,57 |
| Propóleo 30% | 11,57 | 11,40 | 10,6 | 12,9 | 0,97 |

Prueba T ($p=0,865$); Shapiro-Wilk=0,734; Prueba de Levene=0,535.

Discusión

El propóleo está siendo utilizado en la medicina natural debido a las aplicaciones clínicas que presenta. Según Bankova et al. (3) el propóleo es una mezcla compleja que contiene principalmente fenoles. Según Gangre (5) los flavonoides, aglicólicos han sido considerados como los principales componentes fenólicos y están asociados a los efectos beneficiosos del propóleo. Sin embargo, Bankova (3) mencionan que la composición de los componentes de la actividad biológica de este depende del origen de la muestra de propóleo. (3)

Algunos estudios han reportado que ciertos flavonoides presentan actividad biológica contra microorganismos orales y mencionaron que el propóleo inhibía

in vitro la actividad de la formación del glucano y la glucosiltransferasa demostrando la actividad antibacteriana contra el *S. mutans* y *S. sobrinus*. La actividad antibacteriana del propóleo ha sido estudiada por ciertos autores, sin embargo, según Bankova (3) y Elaine (6) pocos estudios han investigado esta actividad contra patógenos orales.

De lo antes mencionado, surgió el propósito del estudio, el cual fue demostrar la actividad antibacteriana del EEP en los grupos de estudios que estuvieron conformados por los cultivos de las cepas de *S. mutans* (ATCC 25175) y *S. aureus* (ATCC 25923). La muestra del estudio estuvo conformada por los cultivos de las cepas de *S. mutans*, *S. aureus* y el tamaño muestral fue determinado en base a la prueba

piloto donde se formaron cuatro grupos experimentales, utilizando el Método de Kirby-Bauer y la medición de los halos de inhibición, la actividad antimicrobiana fue determinada por la formación del halo inhibitorio alrededor de los discos medida mediante una regla vernier, el cual, nos determinó la cantidad en milímetros del diámetro del halo de inhibición. Todos estos procedimientos fueron realizados por el investigador principal; sin embargo, previamente se procedió a verificar las mediciones de los halos de inhibición entre el investigador principal y la especialista en microbiología, para lo cual se utilizó la prueba de Coeficiente de correlación intraclass (0,9) para determinar la calibración interpersonal del investigador principal.

El presente trabajo mostró que el EEP al 30% tuvo una mayor actividad antimicrobiana in vitro que el EEP al 10% frente al *S. aureus* (ATCC 25923) $p=0,007$. Una posible explicación para que exista esta diferencia entre ambos EEP al 10% y 30% sería la concentración, la cual influye en sus respectivas actividades antimicrobianas para esta cepa utilizada. Sin embargo, tal diferencia no pudo ser encontrada entre el EEP al 10% y 30% frente al *S. mutans* (ATCC 25175) $p=0,865$.

Además, se evidenció que la actividad antibacteriana del EEP al 10% y 30%, en comparación a los controles positivos, hubo diferencia significativa ante la clorhexidina al 0,12% y ante la amoxicilina, tal vez esto se debió a que estos controles son altamente específicos para las cepas utilizadas en el estudio, al comparar estos resultados fueron similares a los descritos por Soares et al. (7) pero diferentes a los

Tabla 3. Evaluación y comparación del efecto antibacteriano del propóleo al 10%, 30% y grupos control frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Halo a las 24 horas.

| Grupo | Media | Mediana | Prueba t | Shapiro-Wilk | Prueba de Levene |
|---------------------|------------|------------|----------|--------------|------------------|
| Propóleo 10% | | | | | |
| Listerine® | 9,95/0 | 9,95/0 | p<0,001 | 0,454 | 0,002 |
| Clorhexidina 0,05% | 9,95/11,6 | 9,95/11,6 | p=0,010 | 0,714 | 0,003 |
| Clorhexidina 0,12% | 9,95/13,9 | 9,95/14,0 | p<0,001 | 0,702 | 0,006 |
| Propóleo 30% | | | | | |
| Listerine® | 11,77/0 | 11,82/0 | p<0,001 | 0,414 | 0,048 |
| Clorhexidina 0,05% | 11,77/11,6 | 11,82/11,6 | p=0,237 | 0,714 | 0,848 |
| Clorhexidina 0,12% | 11,77/14,2 | 11,82/14,2 | p<0,001 | 0,798 | 0,620 |

Tabla 4. Evaluación y comparación del efecto antibacteriano del propóleo al 10%, 30% y grupos control frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Halo a las 24 horas.

| Grupo | Media | Mediana | Prueba t | Shapiro-Wilk | Prueba de Levene |
|---------------------|------------|------------|----------|--------------|------------------|
| Propóleo 10% | | | | | |
| Listerine® | 11,77/0 | 11,55/0 | p<0,001 | 0,416 | 0,001 |
| Clorhexidina 0,05% | 11,77/18,8 | 11,55/18,8 | p=0,001 | 0,797 | 0,342 |
| Clorhexidina 0,12% | 11,77/20,7 | 11,55/20,8 | p<0,001 | 0,416 | 0,000 |
| Propóleo 30% | | | | | |
| Listerine® | 11,57/0 | 11,4/0 | p<0,001 | 0,734 | 0,060 |
| Clorhexidina 0,05% | 11,77/18,8 | 11,4/18,8 | p=0,001 | 0,797 | 0,295 |
| Clorhexidina 0,12% | 11,77/20,7 | 11,4/20,8 | p<0,001 | 0,734 | 0,038 |

descritos por Eguizábal et al. (8) quien encontró que el EEP mostró mayor actividad antibacteriana que la Clorhexidina 0,12%. Sin embargo, en el presente estudio al analizar y comparar los resultados obtenidos se encontró que la actividad antibacteriana del EEP al 30% contra el *S. mutans* fue superior frente al listerine® ($p<0,001$), pero menor ante la clorhexidina al 0,05%, al analizar y comparar los resultados para el *S. aureus* se pudo apreciar que la acción antibacteriana del EEP al 30% fue mayor frente al listerine® ($p<0,001$) y alcanzo en efectividad a la clorhexidina 0,05% debido a que no hubo diferencia entre ambas ($p=0,211$).

Al analizar y comparar los resultados obtenidos se observó que el EEP tiene una actividad antibacteriana contra *S. mutans* y el *S. aureus* y estos fueron similares a los descritos por Elaine et al., Popova et al., Cihangir et al., Fernandes et al., Fernandes et al., Gonsales et al., Agra da Silva et al., Soares et al., Alencar et al., Yaghoubi et al., Muli et al., Yi H et al., Packer et al., Moreno et al. y Eguizábal et al., quienes también encontraron que el EEP tiene una actividad antibacteriana, independientemente del origen y de la concentración del EEP (6)(7)(9-21).

Por otro lado, al analizar los resultados para todas las muestras se evidenció una máxima acción antibacteriana a las 24 horas de incubación comparándola con las demás muestras, sin embargo, el tiempo de exposición de las bacterias al propóleo es una variable importante en la evaluación de la actividad antibacteriana frente a *S. mutans* y *S. aureus*. Además, al evaluar la acción antibacteriana del EEP a las 48 horas, esta disminuye en su capacidad para inhibir

microorganismos. Al analizar y comparar estos resultados fueron distintos a los mencionados por Moreno et al. (19), quien encontró que el extracto de propóleo incrementaba su acción pasado las 48 horas. Según Bankova (3) y Farré (1) una posible explicación para estos resultados diversos es que la composición del propóleo es variable dependiendo de la región y estación de la recolección. Consecuentemente, la actividad de los componentes no podría presentar el mismo comportamiento.

Los EEP 10% y 30% empleados en el presente estudio evidencian el potencial de uso del EEP en la estomatología. Sin embargo, una de las limitaciones del propóleo es su variabilidad en composición y acción como consecuencia de variaciones en la flora de la región donde es producido, pero de acuerdo con Bankova et al. (2002) (3), la acción antibacteriana siempre estará presente porque es de vital importancia como agente antimicrobiano de las abejas, independientemente de la región donde el propóleo es producido. Sin embargo, según Sforcin et al. (22), en un reciente estudio, no encontró efectos diferentes debido a la estación de recolección en el propóleo. Otra de las posibles limitaciones en el uso del EEP sería su toxicidad aunque no hay estudios que afirmen o refuten su biocompatibilidad en la Estomatología.

De esta manera, al contrastar los resultados obtenidos por los autores mencionados con los del presente trabajo de investigación se establece la acción antibacteriana del EEP, lo que confirma la hipótesis, encontrándose una relación significativa entre ambas. Por lo antes expuesto, el presente estudio

sirve como base para que posteriormente se continúe ampliando los conocimientos sobre el propóleo y su uso potencial en la prevención y tratamiento de ciertas patologías de la cavidad oral. Por lo tanto, la acción antibacteriana observada del EEP sugiere como importancia su uso como un complemento en el control de ciertos patógenos orales.

Agradecimientos

A la microbióloga Dra. Dora Maurtua por el incondicional apoyo en la parte experimental del trabajo de investigación y al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias (UPCH). Asimismo, a la Dra. Carmen García por su apoyo y al Dr. Alexis Evangelista por su colaboración en el análisis estadístico del presente trabajo de investigación.

Referencias bibliográficas

1. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El própolis y la salud. Ars Pharmaceutica. 2004; 45(1):21-43.
2. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. Caries Res. 1999; 33(5):393-400.
3. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. Z Naturforsch C. 2002; 57(5-6):530-3.
4. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica. 2002; 43(1-

- 2):187-204.
5. Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *JR Soc Med*. 1990; 83(3):159-160.
6. Elaine C, Gebara E, Luiz A, Marcia PA. Atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontopatogênicas. *Braz J Microbiol*. 2002; 33(4). Citado en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822002000400018&script=sci_arttext
7. Soares D, Oliveira C, Cinira L, Ramos M, Nascimento P. Susceptibilidade in vitro de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. *Revista Odonto Ciência*. 2006;2(53). Citado en <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/article/viewFile/1101/873>
8. Eguizábal M, Moromi H. Actividad in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Rev Odontol Sanmarquina*. 2007; 10(2):18-20.
9. Muli E, Maingi J. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *J Venom Anim Toxins incl Trop*. 2007; 13(3):655-663.
10. Fernandes A, Cristina E, Cristina J, De Oliveira R, Ribeiro de Souza M, Cezar A. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(5). Citado en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762005000500018&script=sci_arttext
11. Cihangir N, Sorkun K, Salih B. Chemical composition and antibacterial activities of propolis collected from different regions of turkey. *Hacettepe J Bio Chem*. 2005;(34) 59-67.
12. Agra da Silva R, Evangelista A, Marcucci M, Ramalho A, Domingues N, Pereira W. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Cienc Rural*. 2006; 36(6):1842-48.
13. Gonsales G, Orsi R, Fernandes A, Rodrigues P, Funari S. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop*. 2006; 12(2). Citado en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1678-91992006000200009&script=sci_arttext
14. Fernandes A, Milanda M, Colombari V, Marinho C, Passarelli E. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil. *Cienc Rural*. 2006; 36(1):294-97.
15. Alencar S, Oldoni T, Castro M, Cabral I, Costa-Neto C, Cury J, Rosalen P, Ikegakid M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol*. 2007; 113(2):278-83.
16. Packer J, Da Luz M. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacog*. 2007;17(1):102-07.
17. Yaghoubi SMJ, Ghorbani GR, Soleimanian Zad S, Satari R. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *DARU*. 2007; 15(1):45-8.
18. Yi H, Li W, Ming C, Chun Ch. Antibacterial activity of propolis ethanol extract against *Streptococcus mutans* as influenced by concentration, temperature, pH and cell age. *J Food Drug Análisis*. 2007; 15(1):75-81.
19. Moreno Z, Martínez P, Figueroa J. Efecto antimicrobiano in vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubanos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Rev Nova*. 2007; 5(7):70-5.
20. Eguizábal M, Moromi H. Actividad in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Sterptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Rev Odontol Sanmarquina*. 2007; 10(2):18-20.
21. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*. 2005;12(3):221-8.
22. Sforcin JM, Fernandes A, Lopes C, Funari S, Bankova V. Seasonal effect of brazilian propolis on *candida albicans* and *candida tropicalis*. *J Venom Anim toxins*. 2001; 7(1). Citado en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-79302001000100009&script=sci_arttext