

# Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*

Díaz-Suyo JA, Proaño-de Casalino D. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Rev Estomatol Herediana. 2011; 21(3):125-130.

Juan A. Díaz Suyo<sup>1</sup>  
Doris Proaño de Casalino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cirujano - Dentista.  
<sup>2</sup>Docente del Departamento Académico de Clínica Estomatológica. Facultad de Estomatología. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## Correspondencia

Juan Antonio Díaz Suyo  
Guillermo Biela 2044 Urb. El Pacífico - Lima 31, Perú.  
Teléfono: 5312289/996468837  
e-mail: kraken410@hotmail.com

Recibido : 13 de octubre de 2010

Aceptado : 15 de marzo de 2011

## Introducción

El propóleo es un compuesto balsámico, resinoso elaborado por las abejas a partir de los exudados de las plantas y es usado para proteger la colmena de los microorganismos (1-7). Este compuesto resinoso tiene una composición química compleja que depende de la biodiversidad de plantas de la zona geográfica de donde es recolectado. Además, las

propiedades biológicas del propóleo pueden variar de acuerdo a los diferentes tipos de plantas que lo componen (2,4,5,7-12,14-21).

Estas actividades biológicas son variadas tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias entre otras (2-4,6-12). Numerosos estudios han demostrado que el propóleo posee actividad antibacteriana contra bacterias

grampositivas y gramnegativas (7-18).

Koo et al. (16) evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico propóleo y de la Arnica montana sobre bacterias orales (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*). Determina-

## RESUMEN

En la presente investigación se buscó comparar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa, Perú, en concentraciones al 1%, 5% y 10% con gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. La actividad antibacteriana se determinó usando el método de difusión en el agar. Los halos de inhibición se midieron con un calibrador y fueron anotados en una ficha de registro. Los datos fueron analizados con la prueba t de student para muestras independientes y la prueba de U de Mann Whitney. Los resultados mostraron que no había diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo al 10% y gluconato de clorhexidina al 0,2% ( $p=0,63$ ) sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum*. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo al 5% y gluconato de clorhexidina al 0,2% ( $p=0,81$ ) sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*. Mientras que el extracto etanólico de propóleo al 10% presentó mayor actividad antibacteriana que el gluconato de clorhexidina al 0,2% ( $p=0,02$ ) sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*. En conclusión, el extracto etanólico de propóleo al 10% es el que presenta mejor efectividad antibacteriana sobre ambas cepas periodontopatógenas cuando se le compara con la gluconato de clorhexidina al 0,2%. El propóleo podría usarse a futuro como posible alternativa para el tratamiento de la enfermedad periodontal, se necesitan para ello más estudios con otras metodologías para confirmar esta posibilidad.

Palabras clave: PRÓPOLIS / CLORHEXIDINA / PORPHYROMONAS GINGIVALIS / FUSOBACTERIUM NUCLEATUM.

## In vitro antibacterial activity of ethanolic extract of propolis Oxapampa-Peru, on strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*

**ABSTRACT**  
The aim of this study was to compare the antibacterial activity of propolis ethanolic extract of Oxapampa, Peru, in concentrations of 1%, 5% y 10% against 0.2% clorhexidine over strains of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 and *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. The antibacterial activity was evaluated using the agar diffusion method. The inhibition haloes were measured using a calibrator and written out in a data collecting paper. The data were analyzed with the t student test and U Mann Whitney test. The results showed that there was not statistically significant difference between the averages of inhibition haloes of 10% propolis ethanolic extract compares to 0.2% clorhexidine for *Fusobacterium nucleatum* strains ( $p=0.63$ ). There was not statistically significant difference between the average of inhibition halo of 5% propolis ethanolic extract compared to 0.2% clorhexidine ( $p=0.81$ ) for *Porphyromonas gingivalis* strains. While 10% propolis ethanolic extract showed more antibacterial activity than 0.2% clorhexidine for *Porphyromonas gingivalis* strains ( $p=0.02$ ). In conclusion, 10% propolis ethanolic extract showed the best antibacterial activity over both periodontopathogenic strains when compared to 0.2% clorhexidine. The propolis could be used as a therapeutic alternative to treat the periodontal disease in the population. Further studies are needed to confirm these results.

Key words: PROPOLIS / CHLORHEXIDINE / PORPHYROMONAS GINGIVALIS / FUSOBACTERIUM NUCLEATUM.

ron que el extracto etanólico de propóleo al 10% fue efectivo contra todas las cepas. El extracto etanólico de *Arnica montana* no presentó actividad antibacteriana sobre ninguna de las cepas estudiadas.

Boyanova et al. (17) realizaron un estudio de la actividad antibacteriana del propóleo sobre bacterias periodontales usando el método de difusión en el agar; determinaron que el extracto etanólico de propóleo al 30% fue efectivo sobre *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Pocos estudios se han realizado sobre la actividad antibacteriana del propóleo sobre bacterias periodontopatógenas (16-18) y ninguno de estos estudios ha comparado la efectividad del propóleo con el gluconato de clorhexidina.

El presente estudio tuvo por objetivo comparar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa, Perú, en concentraciones al 1%, 5% y 10% con el gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

## Material y métodos

El presente estudio fue experimental *in vitro*. Se seleccionaron dos bacterias asociadas a periodontitis crónica: *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.

Las sustancias experimentales fueron el extracto etanólico de propóleo al 1%, 5%, 10% y los controles fueron la clorhexidina al 0,2% (control positivo), el alcohol etanólico al 70% (control negativo) y agua destilada (control negativo). Cada grupo experimental y control estuvo conformado por 20 discos de papel de Whatman 3 para la muestra definitiva.

El investigador principal fue capacitado y calibrado, el coeficiente de correlación intraclase fue 0,988. La muestra de propóleo fue recolectada en apiarios de Oxapampa (Pasco) y las soluciones experimentales fueron elaboradas en el laboratorio de química de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

La cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fue retirada del vial que la contenía y se colocó en medio tioglicolato con resazurina e incubada en anaerobiosis por cinco días a 37 °C para su reconstitución. Luego de este proceso, con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró una gota de la zona de crecimiento y se sembró asépticamente con un asa de siembra en una placa petri conteniendo agar Columbia con 5% de sangre de carnero desfibrinada, hemina y vitamina K.

El sembrado de la cepa se realizó usando un mechero Bunsen el cual brindó un halo de esterilización para evitar la contaminación de la placa de Petri conteniendo el agar. Luego se incubaron las placas por cinco días a 37 °C en anaerobiosis.

Una vez reactivada la cepa, se cosechó y se diluyó esta en un tubo de ensayo con 6 ml de suero fisiológico hasta obtener una dilución de Mc Farland 0,5 que es equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml (tamaño del inóculo). Luego se procedió a realizar la siembra de este inóculo en las placas de Petri conteniendo agar Columbia, hemina y vitamina K usando un hisopo, el cual se pasó de manera uniforme sobre la superficie del agar por cuatro veces.

En cada placa de Petri conteniendo el agar se colocaron los discos de papel de filtro que fueron embebidos con las soluciones experimentales y controles usando una micropipeta (Merck Co.). Se apli-

caron 10µl de cada solución experimental y control en cada disco. Las soluciones experimentales fueron los extractos etanólicos de propóleo (1%, 5% y 10%), los controles fueron gluconato de clorhexidina al 0,2%, el alcohol etanólico al 70%, y agua destilada. En total seis discos de papel de filtro Whatman 3 que por la cantidad fueron distribuidos en dos placas de Petri, en una placa de Petri conteniendo el agar se colocaron los extractos etanólicos de propóleo (1%, 5% y 10%) y en otra placa se colocaron los controles (gluconato de clorhexidina al 0,2%, alcohol etanólico al 70% y agua destilada).

Para cada ensayo se usaron ocho placas (cuatro placas para los controles y cuatro placas para los extractos etanólicos de propóleo). Se realizaron cinco ensayos para cada cepa estudiada. Se colocaron las placas de Petri en una jarra de anaerobiosis (marca Oxoid) con un sobre generador de anaerobiosis (marca Oxoid) y un sachet indicador de anaerobiosis (marca Oxoid). Luego la jarra se cerró herméticamente y se llevó a la incubadora a 37°C por cuatro días. La lectura de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano se realizó a los cuatro días. Todo el procedimiento anteriormente mencionado se realizó de la misma manera con la cepa de *Fusobacterium nucleatum*, con la diferencia que la lectura de los halos se hizo a los tres días. Los datos obtenidos fueron recolectados en una ficha.

Se usó el sistema API 20A para la identificación de bacterias anaerobias en el estudio una vez finalizada la fase experimental. Se realizó un análisis cualitativo para la identificación de los compuestos de la muestra de propóleo de Oxapampa a través de un análisis

de cromatografía de gases con espectrometría de masas.

El análisis de los datos se realizó usando el SPSS ver15,0. Se realizó un análisis bivariado para comparar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleo con gluconato de clorhexidina al 0,2% usando la prueba t de Student para muestras independientes y la prueba U de Mann Whitney.

## Resultados

Los halos de inhibición de los extractos etanólicos de propóleo al 1%, 5%, 10% y gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre ambas cepas bacterianas, presentaron distribución normal (prueba de Shapiro Wilk) y homogeneidad de varianzas, excepto los halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo al 5% sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum*. Se usó la prueba t para muestras independientes para la comparación de los extractos etanólicos de propóleo al 1%, 5% y 10% con gluconato de clorhexidina al 0,2% en ambas cepas bacterianas, excepto el grupo de halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo al 5% sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum* con gluconato de clorhexidina que fue analizado con la prueba U de Mann Whitney.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo al 10% con gluconato de clorhexidina al 0,2% ( $p=0,63$ ) sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum* (Tabla 1). Mientras que al comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo al 5% con la de 10% sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum* se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,00$ ), el extracto

etanólico de propóleo al 10% presentó mayor actividad antibacteriana (Tabla 2).

El extracto etanólico de propóleo al 5% presentó similar actividad antibacteriana que gluconato de clorhexidina ( $p=0,81$ ) sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*. Mientras que el extracto etanólico de propóleo al 10% presentó mayor actividad antibacteriana que gluconato de clorhexidina al 0,2% ( $p=0,02$ ) sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (Tabla 3). Además, al comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo al 5% con la

**Tabla 1.** Comparación de los extractos etanólicos de propóleo al 1%, 5% y 10% versus gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

Control positivo	EEP	valor p
Clorhexidina al 0,2% (18,17±0,96)	EEP 1% (11,96±0,93)	0,00*
	EEP 5% (17,06±0,74)	0,00**
	EEP 10% (18,00±1,16)	0,63*

EEP: extractos etanólicos de propoleo. \*Prueba t de student para muestras independientes. \*\*Prueba de U de Mann Whitney.

**Tabla 2.** Comparación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleo al 1%, 5% y 10% sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586.

EEP	valor p
EEP 1% (11,96±0,93) - EEP 5% (17,06±0,74)	0,00**
EEP 1% (11,96±0,93) - EEP 10% (18,00±1,16)	0,00*
EEP 5% (17,06±0,74) - EEP 10% (18,00±1,16)	0,00**

EEP: extractos etanólicos de propoleo. \*Prueba t de student para muestras independientes. \*\*Prueba de U de Mann Whitney.

**Tabla 3.** Comparación de los extractos etanólicos de propóleo al 1%, 5% y 10% versus gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Control positivo	EEP	valor p
Clorhexidina al 0,2% (20,90±1,25)	EEP 1% (12,80±1,07)	0,00*
	EEP 5% (20,80±1,34)	0,81*
	EEP 10% (21,93±1,35)	0,02*

EEP: extractos etanólicos de propoleo. \*Prueba t de student para muestras independientes.

**Tabla 4.** Comparación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleo al 1%, 5% y 10% sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

EEP	valor p
EEP 1% (12,80±1,07) - EEP 5% (20,80±1,34)	0,00*
EEP 1% (12,80±1,07) - EEP 10% (21,93±1,35)	0,00*
EEP 5% (20,80±1,34) - EEP 10% (21,93±1,35)	0,01*

EEP: extractos etanólicos de propoleo. \*Prueba t de student para muestras independientes.

de 10% sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis* se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,01$ ), el extracto etanólico de propóleo al 10% presentó mayor actividad antibacteriana (Tabla 4).

## Discusión

En el presente estudio de tipo experimental se buscó comparar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleo de Oxapampa al 1%, 5% y 10% con gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium*

etanólicos de propóleo al 1%, 5% y 10% versus gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre la cepa de *Fusobacterium*

*nucleatum*. Para determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de las soluciones experimentales y controles se usó el método de difusión de discos.

Koo et al. (16) determinaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico propóleo y de la Arnica montana sobre bacterias orales (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*). Determinaron que el extracto etanólico de propóleo al 10% fue efectivo contra todas las cepas. Las cepas de *Actinomyces naeslundii* y *Actinomyces viscosus* presentaron halos de inhibición del crecimiento bacteriano mayores ( $p < 0,05$ ) que halos de inhibición sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*.

Boyanova et al. (17) evaluaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo de Bulgaria al 30% sobre bacterias anaerobias. El promedio de halos de inhibición para *Fusobacterium sp.* fue 10,4 mm (rango de 9 a 12 mm) y para *Porphyromonas sp.* fue 11,7 mm (rango de 7 a 20 mm). Concluyeron que el propóleo de Bulgaria fue activo contra la mayoría de las cepas anaerobias.

De Paula et al. (18) investigaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo verde brasileño sobre bacterias orales. Se formaron halos de inhibición para *Porphyromonas gingivalis* (14,0±0,0 mm) y *Fusobacterium nucleatum* (15,2±0,26 mm).

Los halos de inhibición del crecimiento bacteriano del presente estudio fueron mayores cuando se les compara con los estudios de Boyanova et al. (17) y De Paula et al. (18). Este hallazgo demuestra que

el propóleo de Oxapampa posee una mayor actividad antibacteriana, teniendo en cuenta que las concentraciones usadas en la presente investigación son bajas (1%, 5% y 10%). Además, esta mayor actividad antibacteriana del propóleo de Oxapampa podría ser influenciada por la región de donde fue recolectado. Numerosos autores han mencionado la influencia de la zona geográfica sobre la composición química de los propóleos (9-13, 16-18, 20, 21).

Muli y Maingi (11) evaluaron la actividad antimicrobiana del propóleo de tres regiones de Kenia (Taita, Tana y Samburu) sobre *Pseudomona aeuroginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El extracto etanólico de propóleo al 10% de la región de Tana y Samburu tenían una mayor actividad antibacteriana que el extracto etanólico de propóleo al 10% de la región de Taita ( $p < 0,05$ ).

Gonsales et al. (12) evaluaron la actividad antimicrobiana del propóleo producido en tres regiones del Brasil (Sao Paulo, Goiás, Paraná) sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Encontraron que el extracto etanólico de propóleo al 30% de Sao Paulo presentó mayores halos de inhibición que el extracto etanólico de propóleo de la región de Goiás ( $p < 0,05$ ) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*. Mencionaron que la actividad biológica del propóleo podría estar relacionada a su origen botánico, reflejando diferencias en su composición química.

Los halos de inhibición de los extractos etanólicos de propóleo fueron mayores para la cepa de *Porphyromonas gingivalis* cuando se le comparó con los halos de inhibición de la cepa de *Fusobacterium nucleatum*, observándose una mayor sensibilidad de la cepa de

*Porphyromonas gingivalis*. Este hallazgo es muy importante, puesto que la *Porphyromonas gingivalis* es la bacteria más patógena de todas las bacterias periodontales, y es la bacteria que está en la mayoría de las enfermedades periodontales.

El presente estudio estableció que el extracto etanólico de propóleo al 10% fue mejor que gluconato de clorhexidina al 0,2% ( $p = 0,02$ ) cuando se evaluaba su actividad antibacteriana sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*. Mientras que el extracto etanólico de propóleo al 10% fue similar a gluconato de clorhexidina al 0,2% ( $p = 0,63$ ) cuando se evaluaba su actividad antibacteriana sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum*. El alcohol etanólico al 70% no formó halos de inhibición del crecimiento bacteriano, evidenciándose que la actividad antibacteriana sobre las cepas estudiadas se debe netamente al propóleo.

El análisis cualitativo por cromatografía de gases-espectrometría de masas para la identificación de los compuestos de la muestra de propóleo de Oxapampa mostró una composición química compleja caracterizada fundamentalmente por la presencia de ésteres, ácidos carboxílicos y terpenos (Tabla 5). Estos resultados coinciden con los hallazgos obtenidos durante el análisis de propóleos procedentes de otras latitudes (19-21).

El rigor metodológico del presente experimento *in vitro* y sus resultados nos evidencian las posibles ventajas del uso del extracto etanólico de propóleo como agente antibacteriano. Se recomienda realizar otros estudios con un mayor número de especies bacterianas periodontopatógenas. Además, se sugiere realizar estudios experimen-

**Tabla 5.** Análisis cualitativo de identificación de compuestos en la muestra de propóleo de Oxapampa (Pasco) mediante la cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (CG-EM).

pico	t <sub>R</sub> *	componente	pm**	familia***
01	8,74	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	144	Cetona
02	9,84	5-hidroximetil-2-furancarboxaldehído	126	Furano
03	10,15	n.i.	-	-
04	11,02	Ácido 3-metilbutanoico	102	Ácido carboxílico
05	11,15	6-hidroxihexanoato de metilo	146	Éster
06	11,24	1-pentanol (alcohol amílico)	88	Alcohol
07	11,42	n.i.	-	-
08	11,70	Eugenol	164	Fenol
09	11,96	Bergamoteno	204	Sesquiterpeno
10	12,04	(Z,E)- $\alpha$ -fameseno	204	Sesquiterpeno
11	12,80	Benzofuran-6-carboxaldehído	146	Benzofurano
12	12,86	2-8-8-trimetil-7-(2-propenil)-6-oxabicyclo-3-2-1-oct-2-ene	192	Cetona
13	13,06	2,3-dihidro-2-metil-benzofurano	134	Benzofurano
14	13,78	4-(2-hidroxi-2,6,6-trimetil-ciclohexil-3-buten-2-ona	175	Cetona
15	14,02	5,6,7,7A-tetrahidro-4,4,7A-trimetil-2(4H)-benzofuranona	180	Cetona
16	14,45	4- $\alpha$ -acetil-6,6-dimetil-3-oxabicyclo-3.1.0-hex-2-ona	168	Cetona
17	15,91	(E)-trans-bergamota-2,12-dien-14-ol	222	Alcohol sesquiterpénico
18	20,48	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol)	296	Diterpeno
19	20,76	11,14,17-icosatrienoato de metilo	320	Éster
20	20,96	Ácido (z)-9-octadecenoico (ácido oleico)	282	Ácido carboxílico
21	21,01	11,14,17-icosatrienoato de metilo	268	Éster
22	24,00	n-Nonadecano	268	Hidrocarburo
23	24,26	n.i.	-	-
24	24,82	n-Eicosano	282	Hidrocarburo
25	25,61	n-Heneicosano	296	Hidrocarburo
26	26,38	n-Docosano	310	Hidrocarburo
27	27,11	n-Tricosano	324	Hidrocarburo
28	27,89	n.i.	-	-
29	28,80	n.i.	-	-

\*Tiempos de retención de cada componente en el perfil cromatográfico, \*\* Peso molecular, \*\*\* Familia de compuestos orgánicos

tales en animales y posteriormente ensayos de campo o clínicos que permitan aclarar las ventajas de propóleo como agente antibacteriano para su posterior producción a nivel industrial como colutorio o pasta dental.

### Conclusión

El extracto etanólico de propóleo al 10% es el que presenta mejor efectividad antibacteriana sobre ambas cepas periodontopatógenas cuando se le compara con gluconato de clorhexidina al 0,2%.

### Agradecimientos

A la Dra. Dora Maurtua Torres por su ayuda en el desarrollo de la

fase experimental del presente estudio y su asesoría constante. Al Dr. Luis Arriola Guillén por su apoyo como tutor en el desarrollo de esta investigación.

### Referencias bibliográficas

- Almira J, Ubillus MM. Estandarización del propóleo del Valle de Oxapampa, Departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial [Tesis Bachiller] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004.
- Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995; 26(2):83-99.
- Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med*. 1990; 83(3):159-60.
- Walker P, Crane E. Constituents of propolis. *Apidologie*. 1987; 18(4):327-34.
- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001; 15(7):561-71.
- Ramírez ME, Villalobos Domínguez EI, Villafuerte García A, Andrade Flores F. Propóleo: ¿una alternativa en la terapéutica médica y odontológica? Primera parte. *Med Oral*. 2001;

- 3(2):91-4.
7. Tosi B, Donini A, Romagnoli C, Bruni A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother Res.* 1996; 10(4):335-6.
  8. Fernandes Jr A, Lopes CAM, Sforcin JM, Funari SRC. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Venom Anim Toxins.* 1997; 3(2):287-94.
  9. Stepanovi? S, Anti? N, Daki? I, Svabi?-Vlahovi? M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res.* 2003; 158(4):353-7.
  10. Awawdeh L, Al-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: a laboratory study. *Aust Endod J.* 2009; 35(2):52-8.
  11. Muli EM, Maingi JM. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *J Venom Anim Toxins.* 2007; 13(3):655-63.
  12. Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes Jr A, Rodrigues P, Funari SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J Venom Anim Toxins.* 2006; 12(2):276-84.
  13. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17(6):337-43.
  14. Eguizábal M, Moromi H. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei* [Tesis Bachiller]. Lima: Universidad Nacional Mayor San Marcos, 2007.
  15. Duailibe SA, Gonçalves AG, Ahid FJ. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. *J Appl Oral Sci.* 2007; 15(5):420-3.
  16. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(2):141-8.
  17. Boyanova L, Kolarov R, Gergova G, Mitov I. In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe.* 2006; 12(4):173-7.
  18. De Paula AM A, Gomes RT, Santiago WK, Dias RS, Cortes ME, Santos VR. Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. *Pharmacologyonline.* 2006; 3:467-73.
  19. Hegazi AG, Abd El Hady FK. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z Naturforsch C.* 2002; 57(3-4):395-402.
  20. Pereira AS, Bicalho B, de Aquino Neto FR. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie.* 2003; 34(3):291-8.
  21. Christov R, Trusheva B, Popova M, Bankova V, Bertrand M. Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res.* 2006; 20(6):531-6.