

# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE UN PROPÓLEO DE SANTANDER SOBRE *Enterococcus faecalis*

<sup>1</sup>Laura Viviana Herrera Sandoval, <sup>2</sup>Marcos Humberto Piscioti Ortega, <sup>2</sup>Otoniel Ramos Monsalve, <sup>3</sup>Laura Fernanda Neira Fuentes, <sup>4</sup>Julio Roberto Pinzón Joya, <sup>2</sup>Adriana Victoria Herrera Becerra, <sup>2</sup>José Antonio Soto Salcedo

<sup>1</sup>Bacterióloga y Laboratorista Clínico U. Industrial de Santander, Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas U. Industrial de Santander, Docente U. Santo Tomás, Colombia.

<sup>2</sup>Estudiante de II año Especialización en Endodoncia U. Santo Tomás, Colombia, <sup>3</sup>Bacterióloga y Laboratorista Clínico U. Industrial de Santander, Colombia.

<sup>4</sup>PhD. en Química Orgánica, Docente U. Santo Tomás, Colombia.

Autor responsable de correspondencia: Laura Viviana Herrera Sandoval  
Correo electrónico: lvivianaherrera@gmail.com

## RESUMEN

**Objetivo:** evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto etanólico de propóleo de Santander sobre *Enterococcus faecalis*.

**Materiales y métodos:** se realizó un estudio experimental *In vitro*. A partir de un propóleo crudo del municipio de Lebrija (Santander), se obtuvo un extracto etanólico a través del método Soxhlet. La actividad antimicrobiana se determinó con una prueba de macrodilución en tubo y recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL luego de 48 horas. Se evaluaron concentraciones de propóleo desde 100 hasta 0,19 mg/mL, como control se incluyeron diluciones del disolvente (etanol 96%) y se usó como medicamento de referencia la norfloxacin.

**Resultados:** se determinó que concentraciones de propóleo de 100 mg/mL y 50 mg/mL inhibieron 100% de crecimiento de *E. faecalis*. El extracto de propóleo mostró Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de 1,19 mg/mL y Concentración Inhibitoria 90 (CI<sub>90</sub>) de 7,92 mg/mL. Mientras que la norfloxacin fue más efectiva con CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub> de 0,06 y 2,39 µg/mL. El etanol no mostró efecto antimicrobiano a las concentraciones presentes en el extracto.

**Conclusión:** con el apoyo de estudios complementarios, es posible proponer al propóleo santandereano como una alternativa de irrigación y medicación en endodoncia, dado el potente efecto frente a *E. faecalis* siendo este el patógeno endodóntico más frecuente en infecciones persistentes. [Herrera LV, Piscioti MH, Ramos O, Neira LF, Pinzón JR, Herrera AV, Soto JA. Actividad antimicrobiana *In Vitro* de un propóleo de Santander sobre *Enterococcus faecalis*. Ustasalud 2012; 11: 73 - 78]

**Palabras clave:** Actividad bactericida, Endodoncia, *Enterococcus faecalis*

## IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETANOLIC PROPOLIS EXTRACTS FROM SANTANDER AGAINST *Enterococcus faecalis*

### ABSTRACT

**Objective:** to evaluate the antimicrobial activity of an ethanolic propolis extract from Santander province against *Enterococcus faecalis*.

**Methods:** an experimental *In vitro* study was made. Starting from pristine propolis collected in the city of Lebrija (Santander), an ethanolic extract was obtained using a Soxhlet apparatus. The antimicrobial activity was measured using the macro dilution tube technique by counting the Colony Forming Units (CFU) per mL after 48 hours. Propolis solutions with concentrations in the range from 100 to 0.19 mg/mL were evaluated. Tubes containing dilutions of the antibiotic norfloxacin and solvent (96% ethanol) were used as reference and control.

**Results:** the propolis solutions within the range from 100 mg/mL to 50 mg/mL inhibited 100% growing of *E. faecalis*. Propolis extract showed an inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>) of 1.19 mg/mL and an inhibitory concentration 90 (IC<sub>90</sub>) of 7.92 mg/mL respectively. Norfloxacin on the other hand was more effective with IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> of 0.06 and 2.39 µg/mL respectively. Ethanol showed non-antimicrobial activity at the concentration present within the extracts.

**Conclusion:** with further studies support it would be possible to suggest the use of propolis from Santander as an alternative of irrigation and medication in endodontics because of its powerful effect against *E. faecalis* considering it is the most frequent pathogen found in persistent infections.

**Key words:** Propolis, Antibacterial agents, *Enterococcus faecalis*

Recibido para publicación: octubre 12 de 2012. Aceptado para publicación: diciembre 12 de 2012.

## INTRODUCCIÓN

El origen de la mayoría de las infecciones periapicales y endodónticas es polimicrobiano. Sin embargo, numerosos estudios establecen a *Enterococcus faecalis* como el patógeno endodóntico con mayor frecuencia en lesiones persistentes;<sup>1-3</sup> este coco Gram positivo pertenece a la biota intestinal de mamíferos y está asociado a múltiples procesos infecciosos en el hombre. Como patógeno tiene la capacidad de adherirse a los tejidos del huésped entre ellos la dentina e incluso penetrar los túbulos dentinales, forma biopelículas difíciles de eliminar que le permiten sobrevivir por periodos de tiempo prolongados en ambientes con limitación de nutrientes. Este aspecto ha sido considerado su principal mecanismo de patogenicidad en el canal radicular.<sup>4,5</sup>

Desde el campo de la endodoncia, la solución a las infecciones del sistema de conductos radiculares consiste en eliminar los microorganismos que estén albergados en éste. Para lograrlo, se ha propuesto la acción mecánica de las limas endodónticas y la acción química de la irrigación con varias sustancias. Así mismo, un medicamento con acción antibacteriana puede ser también necesario para optimizar esta desinfección con el fin de obtener éxito en la terapia pulpar.<sup>6</sup> No obstante, se ha demostrado que *E. faecalis* es uno de los microorganismos más resistentes a la terapia endodóntica, dado que su crecimiento se ve poco afectado por las sustancias irrigantes y medicaciones intracanal.<sup>6,7</sup> Estudios previos sugieren que para lograr la erradicación de *E. faecalis* del sistema de conductos radiculares debe estar en contacto directo con hipoclorito de sodio al 5,25% durante al menos cinco minutos, este compuesto es el irrigante por excelencia.<sup>6</sup> Otros autores refieren que si bien, la clorhexidina lo logra inhibir efectivamente *In vitro*, sólo lo hace en concentraciones de 2%, presentación no comercializada regularmente en Colombia.<sup>7-9</sup> Adicionalmente, presenta resistencia a los efectos antimicrobianos del hidróxido de calcio, uno de los medicamentos intracanal más usados en endodoncia.<sup>10-13</sup>

Hoy en día existe un creciente interés por el uso de productos o mezclas naturales en la eliminación de microorganismos. El propóleo es una sustancia de origen vegetal, fabricada por las abejas, con funciones biológicas de sostén y protección de las colmenas; ha sido ampliamente usado en la medicina tradicional para infecciones de piel, mucosas y sistema respiratorio.<sup>14</sup> Su composición química varía según el origen geográfico, pero en términos generales incluye compuestos orgánicos principalmente del tipo fenoles, ésteres, flavonoides y ter-

penos, entre otros.<sup>15</sup> Por lo anterior, propóleos de diversas regiones son objeto de investigación en odontología por sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, anestésicas y cicatrizantes.<sup>16,17</sup> En endodoncia ya ha sido usado para irrigación y limpieza del conducto radicular, su actividad es comparada con el hidróxido de calcio al mostrar efectos similares en el mejoramiento del curso clínico de las infecciones y la regeneración de la pulpa dental con baja toxicidad.<sup>8,18,19</sup>

El efecto de propóleos colombianos ha sido evaluado frente a algunos agentes cariogénicos<sup>20</sup> pero aún no existen estudios en patógenos endodónticos. Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto etanólico de propóleo de Santander sobre *Enterococcus faecalis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental *In vitro* en el que se evaluó la capacidad de un extracto de propóleo de Santander obtenido en el laboratorio por el método *Soxhlet* para inhibir el crecimiento de una cepa de *E. faecalis*.

### Materiales:

- *Propóleo*: se obtuvo de los apiarios de la finca Santa Teresa, ubicada en el Km 15 vía a Cúcuta Vereda Agua Blanca, en el departamento de Santander a 1773,19 metros sobre el nivel del mar. Se recolectó a partir de las trampas de cajón de las colmenas del apiario, a las que se les hizo de manera aséptica un raspado con espátula que se depositó en bolsas estériles, posteriormente se pasó el contenido por un tamiz estéril para retirar restos vegetales e insectos de gran tamaño que pudieran afectar la extracción. El propóleo crudo se depositó en frascos de vidrio ámbar estériles debidamente rotulados.<sup>21</sup>
- *Compuesto de referencia*: como antimicrobiano de referencia se utilizó Norfloxacin comercial de 400 mg, obtenida de Industria Colombiana de Medicamentos y para su uso en los experimentos fue purificada por métodos estándar de laboratorio.
- *Microorganismo*: se utilizó una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 que se obtuvo liofilizada KWIK-STIK de laboratorios MICROBIOLOGICS®, adquirida por el laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Santo Tomás. Esta cepa fue reconstituida por siembra masiva en agar sangre (Oxoid®), se incubó a 37°C por 48 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub>; su creci-

miento se verificó en agar *Enterococcus* (BD®) a través de la aparición de colonias negras. Los cultivos usados en los experimentos de la presente investigación correspondían al pase dos de recuperación.

- **Obtención del extracto:** una vez obtenida la muestra, se desengrasó con n-hexano (JT.Baker®) en un equipo Soxhlet. Los extractos fueron obtenidos al aplicar el método Soxhlet con etanol anhidro (Carlo Erba®). El extracto resultante se concentró por destilación simple hasta que se removió completamente el solvente.<sup>22</sup>
- **Actividad antimicrobiana:** se evaluó a través de una prueba de macrodilución en tubo.<sup>23</sup> Para la preparación del inóculo del microorganismo se usaron subcultivos de 24 horas en agar sangre, se tomaron colonias y se preparó una solución estándar de *E. faecalis* en caldo tripticosa soya (Merck®) con turbidez de 3,0 en la escala McFarland.

A partir del extracto de propóleo se preparó una solución de trabajo de 200 mg/mL en etanol 96%. Posteriormente, en tubos de ensayo se realizaron diluciones seriadas 1:2 desde 100 hasta 0,19 mg/mL. Para el caso del medicamento de referencia (Norfloxacina) se evaluaron concentraciones desde 0,10 hasta  $5,1 \times 10^6$  mg/mL.<sup>24</sup> A cada tubo de ensayo se agregaron 100  $\mu$ l de la solución estándar de *E. faecalis* ATCC 29212. Se incluyeron dos grupos controles uno con solución salina como control de crecimiento y otro con diluciones seriadas de etanol desde 96% a 0,18% para descartar el posible efecto del solvente. Los tubos se llevaron a incubación a 37°C por 48 horas en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL), a través de la técnica de recuento en placa, para el conteo se procedió a realizar diluciones seriadas en solución salina hasta 10<sup>6</sup> de los tubos que contenían el compuesto evaluado y el microorganismo. Luego se sembraron 0,1 mL de cada dilución en cajas de Petri con Agar Plate Count (Merck®). Finalmente, se llevaron a incubar 24 horas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> y se hizo el recuento con ayuda de una cámara de luz. Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

#### Análisis estadístico

Los resultados de los recuentos de UFC/mL se validaron y el análisis univariado para variables cuantitativas se realizó con el software SPSS versión 15,0 (SPSS Inc®). Los recuentos de UFC/mL presentaron una distribución no normal de acuerdo con la prueba Shapiro – Wilk. Se calculó el porcentaje de Inhibición (PI) para cada una de las concentraciones evaluadas a través de la fórmula:

$$\frac{(\text{UFC/mL promedio control} - \text{UFC/mL promedio concentración})}{(\text{UFC/mL promedio control})} \times 100$$

Por medio del software XLfit® (IDBS) se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) y la concentración inhibitoria 90 (IC<sub>90</sub>) del extracto frente a *E. faecalis*.

#### RESULTADOS

A partir de la prueba de actividad antimicrobiana por dilución en tubo se estableció el efecto de las diferentes concentraciones de propóleo. Los resultados se presentan en tablas, en términos de UFC/mL de *E. faecalis* para cada concentración. Para facilitar la comprensión de los resultados se muestran los porcentajes de Inhibición (PI) de cada concentración evaluada.

Se determinó que las concentraciones de 100 mg/mL y 50 mg/mL del extracto inhibieron el 100% del crecimiento de *E. faecalis* con recuentos de cero UFC/mL. Así mismo, se evidenció que la concentración inhibitoria mínima (MIC) fue de 50 mg/mL. Los PI obtenidos mostraron que todas las concentraciones evaluadas del extracto de propóleo inhibieron el crecimiento del microorganismo de interés con porcentajes desde 100% hasta 22,26%. Por otra parte, la inhibición de 50% del crecimiento se presentó entre concentraciones tan bajas como 1,56 y 0,78 mg/mL. El menor porcentaje de inhibición fue 22,26% a concentración de 0,195 mg/mL (Tabla 1). Se estableció que la actividad del diluyente (etanol) de los extractos sobre *E. faecalis* no fue significativa en las concentraciones evaluadas, es decir, 48% a 0,09% (datos no mostrados).

La norfloxacina como medicamento de referencia, mostró actividad a todas las concentraciones evaluadas. La inhibición de 100% del crecimiento del microorganismo de interés se demostró en concentraciones tan bajas como 0,01 mg/mL; así mismo, a la mínima concentración evaluada  $5,1 \times 10^6$  mg/mL la norfloxacina inhibió en 20,87% a *E. faecalis*. Fue posible establecer que la MIC para este medicamento en la cepa evaluada fue de 0,01 mg/mL (Tabla 2). Al comparar las actividades de las sustancias evaluadas, la norfloxacina fue 1000 veces más efectiva que el extracto natural estudiado.

Dada la actividad antimicrobiana que mostraron los compuestos fue posible calcular la CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub>. Para el caso del extracto de propóleo la actividad correspondió a 1,19 mg/mL y 7,92 mg/mL, y la norfloxacina mostró ser mucho más efectiva con CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub> de  $6 \times 10^5$  y  $2,39 \times 10^3$  mg/mL, respectivamente.

**Tabla 1.** Actividad de extracto etanólico de propóleo frente a *E. faecalis*

Concentración (mg/mL)	UfC/mL (Me)	PI (%)
100	0	100
50	0	100
25	0	99,99
12,50	$1,05 \times 10^6$	99,50
6,25	$2,20 \times 10^7$	71,42
3,12	$2,42 \times 10^7$	86,53
1,56	$7,40 \times 10^7$	60,74
0,78	$3,30 \times 10^8$	33,57
0,39	$14,10 \times 10^8$	27,58
0,19	$7,20 \times 10^9$	22,26
Control	$23,80 \times 10^9$	NA

Me: Mediana. PI: Porcentaje de Inhibición. NA: No aplica.

**Tabla 2.** Actividad de Norfloxacin frente a *E. faecalis*

Concentración (mg/mL)	UfC/mL (Me)	PI (%)
0,10	0	100
0,03	0	100
0,01	0	100
$3,70 \times 10^3$	0	99,99
$1,23 \times 10^3$	0	99,99
$4,10 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	86,38
$1,30 \times 10^4$	$2,38 \times 10^8$	48,72
$4,50 \times 10^5$	$3,43 \times 10^8$	44,57
$1,52 \times 10^5$	$2,84 \times 10^8$	39,80
$5,10 \times 10^6$	$3,98 \times 10^8$	20,87
Control	$4,82 \times 10^8$	NA

Me: Mediana. PI: Porcentaje de Inhibición. NA: No aplica.

## DISCUSIÓN

La terapia endodóntica tiene como objetivo principal eliminar o disminuir los microorganismos presentes en el sistema de conductos radiculares a través de un tratamiento químico-mecánico.<sup>11,12</sup> Hoy en día se buscan sustancias químicas que representen verdaderas alternativas para la irrigación y medicación intraconducto, dado que las de mayor uso como el hipoclorito de sodio y el hidróxido de calcio refieren alguna toxicidad y su efectividad es reducida frente a patógenos endodónticos.<sup>6,10</sup> El presente estudio demostró el efecto

antimicrobiano *In vitro* de un extracto de propóleo de origen santandereano frente a *E. faecalis*, este es un patógeno endodóntico relevante, asociado con mayor frecuencia en lesiones refractarias o persistentes.<sup>4,5,25,26</sup>

A través del método de contacto directo y macrodilución en tubo se demostró la actividad antimicrobiana del extracto de propóleo proveniente de Santander en concentraciones de 100 mg/mL a 0.195 mg/mL frente a *E. faecalis*. Estos hallazgos coinciden con estudios *In vitro* previos realizados por Cortés y colaboradores (2010) quienes demostraron a través del método de difusión en agar que un extracto de propóleo de Cundinamarca tenía actividad frente a *E. faecalis* hasta concentraciones de 3,1 mg/mL.<sup>27</sup> Así mismo, Ferreira y colaboradores (2007) evaluaron el efecto de un extracto etanólico de propóleo al 10% (100 mg/mL) por el método de macrodilución en tubo y lo compararon con medicaciones intraconducto como hidróxido de calcio, paramonoclorofenol alcanforado y formocresol; de esta forma, encontraron una efectividad similar de todas las sustancias frente a patógenos endodónticos como *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens* y con menor actividad hacia *Enterococcus faecalis*.<sup>28</sup> Sin embargo, Lima y colaboradores (2007) reportaron resultados contradictorios al evaluar un extracto chileno de propóleo al 50% (50 mg/mL) y establecer que no poseía actividad significativa *In vitro* frente a *E. faecalis* entre otros microorganismos comparado con la clorhexidina y el hidróxido de calcio.<sup>29</sup>

El extracto etanólico de propóleo de Santander inhibió el crecimiento de *E. faecalis* desde 100% hasta 22,6%. La capacidad de este preparado natural para afectar el crecimiento de bacterias demostrada en esta investigación, podría estar relacionada con aspectos como: la metodología usada al ser el método de macrodilución una técnica que permite un mejor contacto directo del microorganismo y la sustancia, comparada con la técnica de difusión en agar, esta última la de mayor uso en los estudios previos.<sup>23</sup> Por otra parte, la literatura atribuye las propiedades antimicrobianas a su alto contenido de flavonoides, lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, ésteres de ácido caféico y a una flavona conocida como galangina; adicionalmente, se ha demostrado que estos componentes probablemente afectan el ADN bacteriano a través de la RNA polimerasa.<sup>21,30,31</sup> Sin embargo, los resultados de las investigaciones sobre propóleo deben ser cuidadosamente interpretados puesto que estas mezclas presentan alta variabilidad en su composición de acuerdo al origen geográfico y las épocas de recolección.<sup>20</sup>

En este estudio se demostró que el extracto de propóleo fue menos efectivo frente a *E. faecalis* respecto a la norfloxacina como medicamento de referencia. Estas diferencias, pueden interpretarse como resultado no sólo de la naturaleza de los compuestos, también de las complejas interacciones químicas involucradas en los efectos biológicos de un producto natural y que se pueden presentar en una mezcla de sustancias como lo es el propóleo.<sup>32</sup> La norfloxacina es un medicamento de estructura química conocida cuyo mecanismo de acción ha sido ampliamente estudiado y que fue purificado para su uso en esta investigación.<sup>24</sup>

Las evidencias experimentales presentan la posibilidad de aplicación y uso del propóleo en diversas especialidades de la odontología y coinciden en resaltar los amplios beneficios que podría tener su uso terapéutico en la cavidad bucal. Todo esto soportado en el hecho de ser una sustancia natural a la que se le atribuyen efectos antimicrobianos, analgésicos, antiinflamatorios y cicatrizantes.<sup>17</sup> Cabe destacar el rápido avance de los estudios sobre propóleos en modelos endodónticos durante los últimos años. Kayaoglu y colaboradores (2011) y Jahromi y colaboradores (2012) determinaron que como medicación intraconducto y luego de siete días, extractos de propóleo mostraron actividad similar al hidróxido de calcio en la eliminación de *E. faecalis* de túbulos dentinales infectados.<sup>26,33</sup> Del mismo modo, Awawdeh y colaboradores (2009) demostraron en modelos de discos de dentina infectados que un propóleo comercial (3000 mg/mL) fue más efectivo que el hidróxido de calcio en la eliminación total de *E. faecalis* con solo 24 o 48 horas de medicación.<sup>25</sup> Recientemente, Madhubala y colaboradores (2011) reportaron que un propóleo comercial fue tan efectivo como la pasta triantibiótica (ciprofloxacina, minociclina y metronidazol) en la eliminación de *E. faecalis* en modelos de dientes, luego de tan sólo 48 horas de medicación.<sup>34</sup> De este modo, es posible proponer a este producto natural como un agente antimicrobiano de potente uso intra canal radicular.

Los resultados de este trabajo de investigación, el primero en la región, proponen al propóleo santanderiano como una alternativa de uso específicamente en el área de endodoncia, dado el potente efecto frente a *E. faecalis* que es uno de los patógenos más resistentes a los desinfectantes y medicaciones intraconducto utilizados en la terapia endodóntica. De forma complementaria, el propóleo presenta ventajas sobre las sustancias que actualmente son usadas en irrigación y medicación, que radican en propiedades antibacterianas, inmunoestimulantes, cicatrizantes y baja toxicidad.<sup>17</sup> Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios sobre

la composición química del propóleo estudiado así como establecer la ruta química para identificar los compuestos líderes presentes en esta mezcla.

A partir de los hallazgos *In vitro* presentados, resulta pertinente continuar con los estudios en modelos de dientes *In vitro* y posteriormente ensayos clínicos que demuestren las ventajas del propóleo comparados con otras sustancias irrigantes o medicaciones intraconducto en pacientes. Simultáneamente, es necesario investigar con diferentes metodologías la tensión superficial de las preparaciones del propóleo para sugerir que puedan tener alta capacidad de penetración en los sitios de difícil o imposible acceso en el sistema de conductos radiculares, túbulos dentinales, istmos y sacos, entre otros.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod 2006; 32 (2): 93 – 98.
2. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol 2005; 20 (5): 289 – 295.
3. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. Arch Oral Biol 2005; 50 (6): 575 – 583.
4. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15 (5): 308 – 320.
5. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod 2004; 30 (5): 315 – 320.
6. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments against microorganisms within root canals. Int Endod J 2004; 37 (5): 311 – 319.
7. Vahgela JD, Kandaswamy D, Venkateshabu N, Jamini N, et al. Disinfection of dentinal tubules with two different formulations of calcium hydroxide as compared to 2% chlorhexidine: As intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An *In vitro* study. J Conserv Dent 2011; 14 (2): 182 – 186.
8. Mattigatti S, Ratnakar P, Moturi S, Varma S, Rairam S. Antimicrobial effect of conventional root canal medications vs propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. J Contemp Dent Pract 2012; 13 (3): 305 – 309.
9. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFDA, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99 (6): 768 – 772.
10. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1985; 1 (5): 170 – 175.

11. Haapasalo M, Orstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66 (8): 1375 – 1379.
12. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6 (4): 142 – 149.
13. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28 (10): 689 – 693.
14. Farre R, Frassetto I, Sánchez A. Propolis and Human Health. *Ars pharmaceutica* 2004; 45 (1): 21 – 43.
15. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 2008; 73: 117 – 124.
16. Murray MC, Worthington HV, Blinkhorn AS. A study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 1997; 24 (11): 796 – 798.
17. Wieckiewicz W, Miernik M, Wieckiewicz M, and Morawiec T. Does propolis help to maintain Oral health? Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013 [en línea]. URL disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/351062>
18. Oncag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Gen Dent* 2006; 54 (5): 319 - 322.
19. Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod*. 2004; 30 (5): 359 – 361.
20. Moreno Z, Martínez P, Figueroa J. Efecto antimicrobiano *In vitro* de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Nova* 2007; 5 (7): 70 – 75.
21. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleo de campeche. *ARS Farmacéutica*. 2002; 43 (1): 187 – 204.
22. Campo M, Cuesta O, Rosado A, Montes R, Márquez I, Piccinelli, A Rastrelli, L. GC-MS Determination of Isoflavonoids in seven red cuban propolis samples. *J Agric Food Chem* 2008; 56 (21): 9927 – 9932.
23. Wikler M, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hecht DW, Hindler JF et al. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standard. Seventh Edition; 2006 [en línea] 20 (2). URL disponible en: <http://isoforlab.com/phocadownload/csli/M7-A7.pdf>
24. Quiñones D, Marrero D, Falero B, Tamargo I, Llop A, Kobayashi N, Del Campo R. Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2006; 60 (2): 123 – 129.
25. Awawdeh L, AL-Beitawi M, and 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: 52 – 58.
26. Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gencay Ö, Sorkun K, Salih B. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod*. 2011; 37 (3): 376 – 381.
27. Cortés D, Pachón M, Riaño S, Tovar E, Rojas S. Actividad antimicrobiana del propóleo colombiano en agua destilada, solución salina al 0,9% y etanol al 98% sobre *Enterococcus faecalis* [Trabajo de Grado]. Bogotá: Universidad Santo Tomás, 2010.
28. Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, García RB, Marcucci MC, Gómez BP. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104: 709 – 716.
29. Lima ME. Evaluación *In vitro* de la actividad del paramonoclorofenol alcanforado, clorhexidina al 2% y extracto de propolis al 50% sobre tres bacterias encontradas en el interior del canal radicular. *Revista de la Sociedad Chilena de Endodoncia* 2007; 15: 16 – 19.
30. Scazzacchia F, Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 2006; 161: 327 – 333.
31. Bankova V, Christov R, Kujungiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis (Bee Glue). *Z Naturforsch* 1995; 50: 167 – 172.
32. Catchpole O, Grey J, Mitchell K, Lan J. Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. *Journal of Supercritical Fluids* 2004 [en línea]; 29 :97–106. URL disponible en: <http://www.isasf.net/fileadmin/files/Docs/Versailles/Papers/PN52.pdf>
33. Jahromi M, Toubayani H, Rezaei M. Propolis: A new alternative for root canal disinfection. *Int Endod J* 2012; 7 (3): 127 – 133.
34. Awawdeh L, AL-Beitawi M, and 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: 52 – 58.

## Correos electrónicos de los autores:

Laura Viviana Herrera Sandoval: [lvivianaherrera@gmail.com](mailto:lvivianaherrera@gmail.com)  
 Marcos Humberto Piscioti Ortega: [marcospisciotti@hotmail.com](mailto:marcospisciotti@hotmail.com)  
 Otoniel Ramos Monsalve: [yeyoabel@hotmail.com](mailto:yeyoabel@hotmail.com)  
 Laura Fernanda Neira Fuentes: [laurafernandaneira@hotmail.com](mailto:laurafernandaneira@hotmail.com)  
 Julio Roberto Pinzón Joya: [juliopinzon@gmail.com](mailto:juliopinzon@gmail.com)  
 Adriana Victoria Herrera Becerra: [advichebe@hotmail.com](mailto:advichebe@hotmail.com)  
 José Antonio Soto Salcedo: [josesoto87@hotmail.com](mailto:josesoto87@hotmail.com)