

Uso odontológico de propóleos de origen costarricense

Dental usage of Costa Rican propolis

Basado en la investigación: “Determinación del nivel de efectividad antimicrobiana, in vitro, de propóleos altos en compuestos fenólicos de origen costarricense sobre las especies streptococcus sanguinis y streptococcus mutans en la Universidad Latina de Costa Rica durante enero y agosto del año 2012”

Based on research: “Determining the level of in vitro antimicrobial effectiveness of propolis high in phenolic compounds from Costa Rica on the species streptococcus mutans and streptococcus sanguinis in the Universidad Latina de Costa Rica in January and August 2012.”

José Gabriel Fernández Montero, Universidad Latina de Costa Rica; Costa Rica; dr.fernandez@live.com

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue determinar el nivel de efectividad antimicrobiana in vitro de propóleos altos en compuestos fenólicos de origen costarricense sobre las especies streptococcus sanguinis y streptococcus mutans.

Se midió la acción bacteriostática o bactericida del propóleo en una concentración al 50%, 70% y 80%, comparando su efecto contra el digluconato de clorhexidina al 0,12%.

El análisis evidenció que el propóleo ejerce una acción bactericida sobre la especie streptococcus sanguinis independientemente de su concentración, y por otra parte sobre la bacteria streptococcus mutans las concentraciones del propóleo al 50% y 70% resultaron en acción bacteriostática.

De forma tal se concluye que los tres extractos del propóleo generaron un efecto antimicrobiano sobre las especies S. mutans y S. sanguinis. Se obtuvieron efectos bactericidas de los extractos del propóleo similares al gluconato de clorhexidina al 0,12%, y esto justifica que puede ser empleado como herramienta para la prevención o coadyuvante del tratamiento de la enfermedad periodontal y reducción del riesgo de caries.

PALABRAS CLAVE

Propóleo, caries, enfermedad periodontal, streptococcus mutans, streptococcus sanguinis, medicina natural.

ABSTRACT

The aim of the research was to determine the In Vitro level of antimicrobial effectiveness of Costa Rican propolis high in phenolic compounds on the species Streptococcus Mutans and Streptococcus Sanguinis.

It was measured the bacteriostatic and / or bactericidal action of propolis in 50%, 70% and 80% concentration, comparing their effect against chlorhexidine 0.12%.

The analysis showed that propolis proved a bactericidal effect on the species Streptococcus Sanguinis regardless of their concentration; on the other hand on the propolis concentrations of 50% and 70% on the bacterium Streptococcus mutans resulted in bacteriostatic action.

It is concluded that the three extracts of propolis generated an antimicrobial effect on the species S. mutans and S. Sanguinis. Antibacterial effects from extracts of propolis were similar to chlorhexidine 0.12%, this justifies that can be used as a tool for prevention and / or adjunctive treatment of periodontal disease and reduction of tooth decay risk.

KEYWORDS

Propolis, bee glue, tooth decay, periodontal disease, streptococcus mutans, streptococcus sanguinis, natural medicine.

Recibido: 15 octubre, 2015.

Aceptado para publicar: 30 noviembre, 2015.

INTRODUCCIÓN

A escala global Costa Rica es un país que es reconocido por su diversidad biológica, a esto se suma el auge que ha tenido la medicina alternativa por medio de productos naturales; en este caso: el propóleo, producido por las abejas (*Apis mellifera*) presenta propiedades antimicrobianas, antioxidantes, acelera la curación de heridas, entre otras. Dicha sustancia recientemente ha empezado a ser investigada a fondo en otros países del orbe, y ha tenido resultados positivos en la mayoría de ellos.

Debido a que el uso odontológico es en este caso el campo de estudio, se analizaron todas las propiedades del propóleo, y la actividad antimicrobiana es la de mayor interés, dado que esta ya ha sido investigada en bacterias de tipo anaeróbicas en otras latitudes, por lo que se consideró relevante realizar un análisis a escala local, aunque sumado a esto no existen estudios sobre la acción que puedan ejercer sobre bacterias, específicamente *streptococcus sanguinis* y *streptococcus mutans*, que junto con otras bacterias son las causantes de la colonización primaria de la placa bacteriana y caries dental respectivamente. Si este efecto se comprueba, este podría sentar las bases para utilizarlo como un producto alternativo para la prevención o tratamiento coadyuvante de la enfermedad periodontal y reducción del riesgo de caries, mediante enjuagues, geles o cremas.

El estudio se realiza con propóleos de una composición química ya analizada con anterioridad, para tener certeza de la cantidad de elementos presentes en el extracto, y asegurarse de cuál elemento específicamente generará el efecto antimicrobiano, el cual se estudiará en cultivos *in vitro* de las bacterias citadas.

Por lo tanto si se lograra encontrar asociación directa con la inhibición bacteriana, este estudio sería de alta relevancia científica, ya que la enfermedad periodontal y el riesgo de caries son problemas de salud pública.

MÉTODO

El enfoque de esta investigación es cuantitativo, la recolección de los datos se basa en la medición del efecto del propóleo sobre las bacterias mencionadas, en dicha recolección se utilizan procedimientos estandarizados y aceptados por la comunidad científica. Los datos obtenidos producto de las mediciones se representarán en números y serán analizados por medio de métodos estadísticos.

Es de paradigma positivista por la verificación del conocimiento mediante predicciones, plantearse una serie de hipótesis como predecir que algo va a suceder y luego verificarlo o comprobarlo. El positivismo acepta como único conocimiento válido al conocimiento verificable y mensurable, visible. Pero no la pertinencia de otras perspectivas, de otros procedimientos metodológicos y otros tipos de conocimientos de interpretación de la realidad; lo que importa para el positivista es la cuantificación y medir una serie de repeticiones que llegan a plantear nuevas hipótesis y a construir teorías, todo fundamentado en el conocimiento cuantitativo. La estadística es una manera de cuantificarlo todo mediante muestras, se encontró la metodología más idónea y coherente para el paradigma positivista, para poder explicar, controlar y predecir (Ballina, 2004).

El diseño de la investigación correlacional; mide dos o más variables que se pretende ver si están o no relacionadas en los mismos sujetos y después se analiza la correlación.

La utilidad y el propósito principal es saber cómo se puede comportar un concepto o variable conociendo el comportamiento de otra u otras variables relacionadas. Los estudios correlacionales evalúan el grado de relación entre dos variables, y pueden incluir varios pares de evaluaciones de esta naturaleza en una única investigación (Hernández, Fernández, Baptista, 2006).

El tipo de estudio es experimental prospectivo transeccional. El análisis es prospectivo debido a que no se ha realizado antes en el país y se piensa experimentar con bacterias específicas de la cavidad oral; cabe destacar que en estudios realizados en otras partes del mundo han analizado esta relación pero utilizando tanto otras especies bacterianas como otro tipo de propóleos procedentes de distintas especies botánicas.

El diseño de experimentación puro se justifica mediante la manipulación intencional de una o más variables independientes. En este caso los propóleos son altos en compuestos fenólicos, y es la que se considera como supuesta causa en una relación entre variables, y al efecto provocado por dicha causa sobre las bacterias se denomina variable dependiente. (Hernández, Fernández, Baptista, 2006).

Causa efecto: Se lleva a cabo para analizar si una o más variables independientes afectan a una o más variables dependientes y por qué las perturban. La variable independiente resulta de interés porque es la que hipotéticamente será una de las causas que producen el efecto supuesto. Para obtener evidencia de esta relación causal supuesta, el investigador manipula la variable independiente para ver su efecto sobre la dependiente. Es decir, hace variar a la independiente y observa si la dependiente varía o no. Manipular es sinónimo de

hacer variar o dar distintos valores a la variable independiente. (Hernández *et ál.*, 2006).

Presencia-ausencia: Implica que un grupo se expone a la presencia de la variable independiente y el otro no. Luego los dos grupos son comparados para ver si el grupo que se expuso a la variable independiente difiere del grupo no expuesto a ésta. Al grupo que se expone a la presencia de la variable independiente se le conoce como "grupo experimental" y al grupo en el cual está ausente dicha variable, se le denomina "grupo de control".
Más de dos grados: Se puede hacer variar o manipular la variable independiente en cantidades o grados. Manipular la variable independiente en varios niveles tiene la ventaja de que no sólo se puede determinar si la presencia de la variable independiente o tratamiento experimental tiene un efecto, sino también se puede determinar si distintos niveles de la variable independiente tienen diferentes efectos. Es decir, si la magnitud del efecto depende de la intensidad del estímulo. Cuantos más niveles, mayor información (Hernández *et ál.*, 2006).

Para este estudio los grados de manipulación sobre la variable independiente implican:

- Utilización de diferentes concentraciones de los propóleos altos en compuestos fenólicos de origen costarricense al 50%, 70% y 80%.
- Empleo de un grupo de control o *Gold Standard* mediante la aplicación de gluconato de clorhexidina al 0,12%.

Obtención del propóleo:

Una vez seleccionada la colmena, se colectan 20g de propóleo raspado con espátula y se colocan en un recipiente de plástico, para ser al-

macenados en un congelador. Posteriormente se trituran en un mortero hasta quedar pulverizados.

Preparación de los extractos:

Se prepararon dos extractos, uno utilizando 1000mg de propóleo a los que se les colocaron 20ml de propilenglicol; seguidamente esta solución se colocó en baño ultrasónico durante 15 minutos y, posteriormente, en la centrifuga a 3500 RPM durante 10 minutos, de manera que se obtuvo un extracto con una concentración de 50mg/ml.

En el segundo extracto se utilizaron 1400mg de propóleo y 20ml de propilenglicol y se preparó de la misma forma antes mencionada; por lo tanto, se obtuvo un extracto con una concentración de 70mg/ml.

El propilenglicol es un compuesto orgánico (un alcohol, más precisamente un diol) incoloro, insípido e inodoro. Es un líquido aceitoso claro, higroscópico y miscible con agua, acetona y cloroformo. Se obtiene por hidratación del óxido de propileno. Cumple diversas funciones en diferentes entornos sirve como un disolvente, conecta y estabiliza los líquidos insolubles (emulsionante), ayuda a unir y transportar otras sustancias (excipiente), sostiene y disuelve los ingredientes activos en un medio, atrae / retiene el agua / humedad (higroscópico), reduce el punto de congelación, aumenta el punto de ebullición, ofrece una estabilidad excepcional. Es químicamente neutro, es decir, que por lo general no reacciona con otras sustancias (Carrasco, 2009).

Para el tercer extracto se utilizaron 1600mg de propóleo y 20ml de etanol al 95% y se preparó de la misma forma antes mencionada; por lo tanto, se obtuvo un extracto con una concentración de 80mg/ml.

Las bacterias serán cultivadas utilizando Agar Trypticasa Soya en

tubos de ensayo durante 24 horas (aproximadamente 35 grados centígrados), posteriormente de ese cultivo se realizan dos cultivos de la misma cepa, a uno se le agrega agua peptonada (10mL) y al otro el propóleo (10mL) y se deja actuar durante 5 minutos, después de estos 5 minutos se vierte un inactivador en este caso 9mL de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) para evitar el efecto continuo de las soluciones, y se incuban por 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación, se realiza el recuento, este número de colonias es estadísticamente representativo, puede ser contada toda la placa o por cuadrantes, cuando la carga bacteriana es alta, se toma en cuenta un cuadrante con carga alta, otro con carga media y un tercero con carga baja. Se realiza la sumatoria de los tres cuadrantes y se saca el promedio. Finalmente el promedio se multiplica por 65. La fórmula aplicada para el cálculo de U.F.C (unidad formadora de colonias) es el siguiente: $\text{No. Colonias} = (\text{CA} + \text{CM} + \text{CB} / 3) * 65$, este resultado se compara con el blanco (Bacteria con agua peptonada) y de esta manera se obtiene el tipo de efecto antimicrobiano.

Este mismo procedimiento se hará utilizando las diferentes concentraciones del propóleo sobre las bacterias en cuestión. Al emplear un grupo de control *Gold Standard* aplicando gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre las distintas bacterias, con esto se medirá el efecto antimicrobiano del propóleo comparado con una sustancia ya reconocida para ese mismo efecto. El otro grado de manipulación por utilizar es el uso de propóleo pero con una menor cantidad de compuestos fenólicos (concentraciones al 50%, 70% y 80%) para confirmar su acción antimicrobiana.

Descripción de Instrumentos

Debido a que es un estudio in vitro sobre la acción que genera el pro-

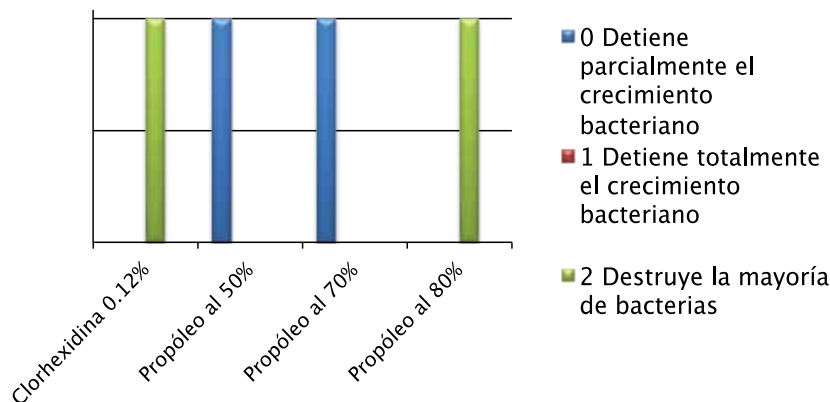
póleo a diferentes concentraciones (50%, 70%, 80%) y los grupos de control (propilenglicol, etanol 95%, clorhexidina al 0,12%) sobre las bacterias *streptococcus sanguinis* y la *streptococcus mutans* el método de recolección de datos será por medio de un único instrumento de medición por concentración utilizada; luego, por medio de la observación macroscópica se procederá a marcar la casilla respectiva, que consta de cuatro criterios por escoger, dependiendo del efecto que generó el propóleo sobre la bacteria, donde los criterios son representados por: 0 (Detiene parcialmente el crecimiento microbiano), 1 (Detiene totalmente el crecimiento bacteriano), 2 (Destruye la mayoría de bacterias) y 3 (Destruye todas las bacterias).

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Las pruebas realizadas en esta investigación revelaron que los tres extractos del propóleo altos en compuestos fenólicos generaron un efecto antimicrobiano sobre las especies bacterianas *streptococcus mutans* y *streptococcus sanguinis*. Según los criterios de efectividad propuestos, el propóleo ejerce una acción bactericida sobre la bacteria *streptococcus sanguinis*, independientemente de su concentración, esto podría deberse a la necesidad de interacción con la bacteria *actinomyces viscosus*, que posee estructuras proteínicas fibrosas llamadas fimbrias, que se fijan a proteínas específicas localizadas en la placa dental como mecanismo para colonizar superficies.

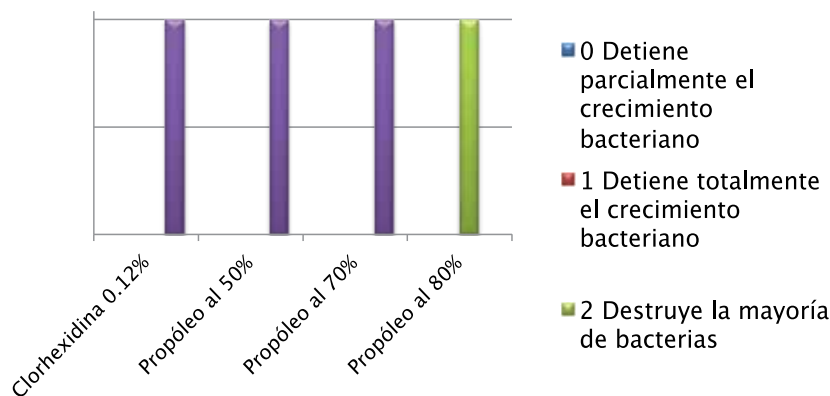
Por otra parte las concentraciones del propóleo al 50% y 70% sobre la bacteria *streptococcus mutans* resultaron acción bacteriostática, podría explicarse este fenómeno por la capacidad de colonizar por sí misma en fosas y fisuras de los dientes, zona de fácil acceso a la higiene oral y, por ende, necesitan

Gráfico 1
Distribución de frecuencias según criterios del efecto antimicrobiano de las concentraciones del propóleo alto en compuestos fenólicos comparado la clorhexidina al 0,12% sobre la bacteria *streptococcus mutans*.



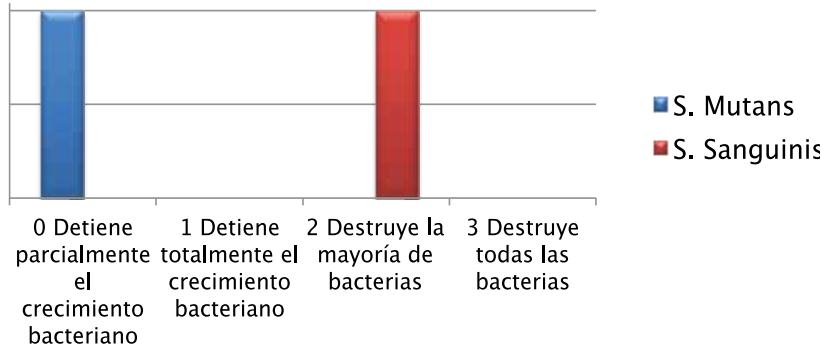
Fuente: Gráfico #6 de la investigación “Determinación del nivel de eficacia antimicrobiana *in vitro* de propóleos altos en compuestos fenólicos de origen costarricense sobre las especies *streptococcus sanguinis* y *streptococcus mutans* en la Universidad Latina de Costa Rica durante enero y agosto del año 2012”.

Gráfico 2
Distribución de frecuencias según criterios del efecto antimicrobiano de las concentraciones del propóleo alto en compuestos fenólicos comparado a la Clorhexidina al 0,12% sobre la bacteria *streptococcus sanguinis*.



Fuente: Gráfico #7 de la investigación “Determinación del nivel de efectividad antimicrobiana *in vitro* de propóleos altos en compuestos fenólicos de origen costarricense sobre las especies *streptococcus sanguinis* y *streptococcus mutans* en la Universidad Latina de Costa Rica durante enero y agosto del año 2012”.

Gráfico 3
Distribución de frecuencias según criterios del efecto antimicrobiano del propilenglicol sobre las bacterias *streptococcus mutans* y *streptococcus sanguinis*.



Fuente: Gráfico #3 de la investigación “Determinación del nivel de efectividad antimicrobiana *in vitro* de propóleos altos en compuestos fenólicos de origen costarricense sobre las especies *streptococcus sanguinis* y *streptococcus mutans* en la Universidad Latina de Costa Rica durante enero y agosto del año 2012”.

Gráfico 4
Distribución de frecuencias según criterios del efecto antimicrobiano del etanol a 95% sobre las bacterias *streptococcus mutans* y *streptococcus sanguinis*.



Fuente: Gráfico #4 de la investigación “Determinación del nivel de efectividad antimicrobiana *in vitro* de propóleos altos en compuestos fenólicos de origen costarricense sobre las especies *streptococcus sanguinis* y *streptococcus mutans* en la Universidad Latina de Costa Rica durante enero y agosto del año 2012”.

un mayor grado de resistencia para sobrevivir. Este principio también explicaría que utilizando etanol al 95% y propilenglicol sobre esta bacteria, genera un efecto bacteriostático y sobre la bacteria *streptococcus sanguinis* un resultado bactericida.

El gluconato clorhexidina al 0,12% cumplió el efecto bactericida esperado tanto en la bacteria *streptococcus mutans* como con *streptococcus sanguinis*, ya que se ha comprobado este efecto con anterioridad y por ello su uso como sustancia de control (Gold Standard).

El uso de etanol al 95% para crear el extracto del propóleo al 80%, pudo potenciar su efecto bactericida, hecho más notable sobre la bacteria *streptococcus mutans*, ya que los extractos de propóleo al 50% y 70% que fueron creados en propilenglicol tuvieron una acción bacteriostática sobre esta bacteria.

Con respecto al tiempo en el cual se midieron los efectos antimicrobianos de los distintos extractos del propóleo altos en compuestos fenólicos sobre las bacterias mencionadas, el cual fue de 5 minutos, se puede apreciar un efecto bactericida de los tres extractos de propóleos altos en compuestos fenólicos sobre la bacteria *streptococcus sanguinis*, pero no así sobre la otra bacteria *Streptococcus Mutans*; tal vez se podría llegar a un efecto bactericida del propóleo con un mayor tiempo de exposición sobre esta segunda bacteria.

La bacteria *streptococcus sanguinis* mostró que con la menor concentración de propóleo alto en compuestos fenólicos (al 50%), ejerce efecto bactericida sobre ella; sin embargo, la bacteria *streptococcus mutans* mostró el mismo efecto sólo con el extracto más potente (concentración al 80%).

Se obtuvieron efectos bactericidas de los extractos del propóleo altos en compuestos fenólicos similares al gluconato de clorhexidina al 0,12%; esto justifica que puede ser empleado como herramienta para la prevención o coadyuvante del tratamiento de la enfermedad periodontal y reducción del riesgo de caries.

RECOMENDACIONES

El uso de los propóleos de origen costarricense puede llegar a ser un nuevo tratamiento natural de uso regular en Odontología.

De acuerdo con los resultados se podría emplear el propóleo de origen costarricense para la creación

de enjuagues, pastas o geles a base propóleos con propiedades antimicrobianas.

Hay que promocionar el uso de productos de origen natural como tratamientos alternativos en Odontología, ya que se pueden tener los mismos beneficios que un producto químico.

Se puede incentivar la investigación entre los colegas odontólogos y no basarse solo en estudios del extranjero, ya que los propóleos costarricenses poseen características distintas, tanto químicas como organolépticas.

Esta investigación podría beneficiar a la población costarricense en

la prevención de la enfermedad periodontal o como una herramienta eficaz para su tratamiento.

Por lo tanto, es importante investigar más a fondo la concentración mínima de propóleo requerida para lograr un efecto bactericida, así como llevar a cabo estudios *in vitro* que reafirmen los resultados de esta investigación. ■■■



Fig. 1y 2 Elaboración de extractos de propóleo.

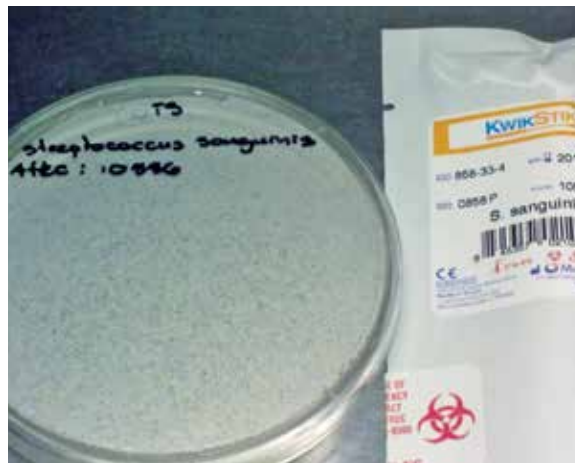
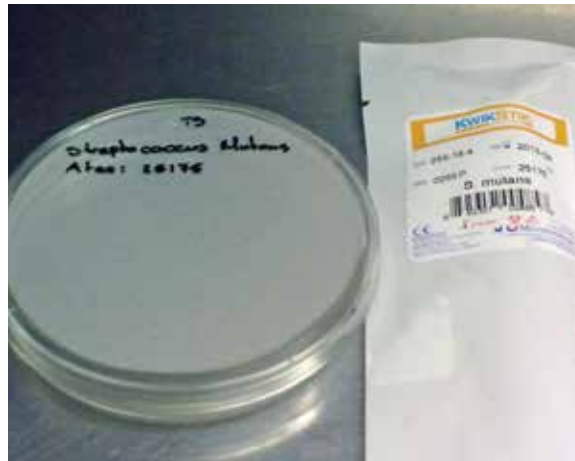


Fig. 3 y 4 Montaje de cepas bacterianas.



Fig. 5 Montaje de extractos a utilizar sobre bacterias.

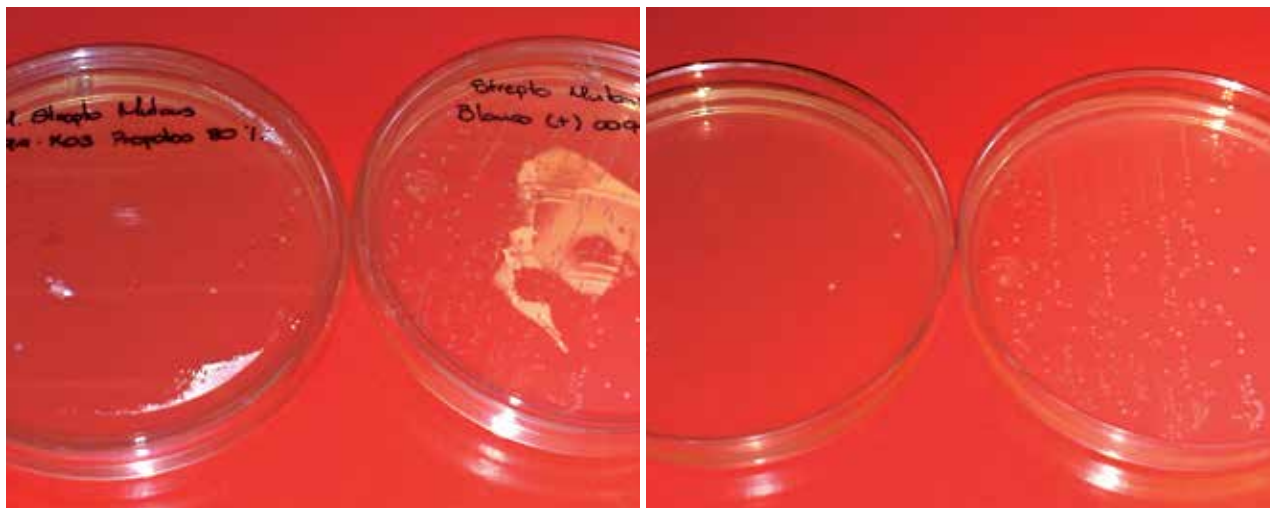


Fig. 6 y 7 Acción del extracto de propóleo al 80% vr blanco sobre S. Mutans

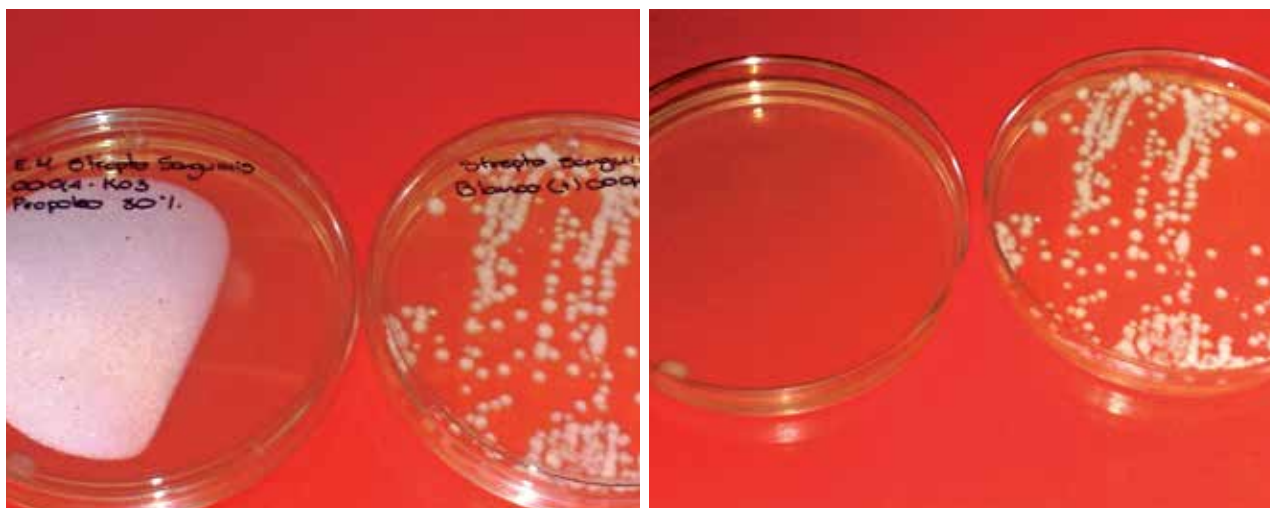


Fig. 8 y 9 Acción del extracto de propóleo al 80% vr blanco sobre S. Sanguinis

BIBLIOGRAFÍA

- Alencar, S., Oldoni, T., Castro, M., Cabral, I., Costa, C., Cury, J., Rosalem, P., Ikegaki, M. (2008). *Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 278-283.
- Amoros M., Simoes C., Girre L. (1992). *Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis*. *J Of Natural Products*; 1992;55(12):1732-40.
- Bravo A., Díaz L., Armas L. (2009). *Tratamiento de la alveolitis dental con tintura de propóleos al 5 %*. *Clínica Estomatológica "José Martí" del municipio Consolación del Sur*.
- Bretz W., Chiego J., Marcucci M., et ál. (1998). *Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp*. *Ziitschrift fur Naturforschung. Section C. J Biosciences* 1998; 53(11-12): 1045-8.
- Carranza, F., Newman, M., Takei, H. (2002). *Periodontología clínica*. Novena Edición. Trad. por Dra. Marina B González y Octavio A. Giovanniello. México D. F: McGraw-Hill Interamericana, 2002.
- Caufield, P., Dasanayake A., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J., Hardin, M. (2000). *Natural History of Streptococcus sanguinis in the Oral Cavity of Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity*. *Infection and immunity*, July, p. 4018-4023 Vol. 68, No. 7
- Contardo, M., Díaz, N., Lobos, O., Padilla, C., Giacaman, R. (2011). *Oral colonization by Streptococcus mutans and its association with the severity of periodontal disease in adults*. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* Vol. 4(1); 9-12.
- De Soete, M., Dekeyser, C., Pauwels, M., Teughels, W., van Steenberghe, D., Quirynen, M., (2005). *Increase in cariogenic bacteria after initial periodontal therapy*. *J Dent Res*. Jan;84(1):48-53.
- Doron, S., Galit, K., Itzhak, G. (1996). *Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria*. *Am J Dentistry*; 9(6): 236-9.
- Eguizábal, M., Moromi, H. (2007). *Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre Streptococcus mutans y Lactobacillus casei*, *Odontol. Sanmarquina*; 10(2): 18-20.
- Gamboa, Y. (2011). *Determinación de la capacidad antioxidante de propóleos de Costa Rica de acuerdo al contenido de flavonoides*. Tesis, Universidad Nacional de Costa Rica, Costa Rica.
- Gutiérrez, S., Romero, C., Hidalgo, C., Pérez de Corcho O., Díaz B. (1999). *Acción antibacteriana de la tintura hidroalcohólica de propóleos al 4% en gérmenes de origen endodóntico*. *Revista Electrónica "Archivo Médico de Camagüey"* ; 3(4) ISSN 1025-0255.
- Haffajee, A., Teles, R., Patel, M., Song, X., Yaskell, T., Socransky, S. (2009). *Factors affecting supragingival biofilm composition. II. Tooth Position* *J Periodontal Res*. 2009 August ; 44(4): 520-528. doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01155.x.
- Ikeno, K., Miyazawa, C. (1991). *Effects of propolis on dental caries in rats*. *Caries Res* 1991; 25: 347-51.
- Kajiya, M., Giro, G., Taubman, M., Han, X., Mayer, M., Kawai, T. (2010). *Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease* *Journal of Oral Microbiology* 2: 5532 - DOI: 10.3402/jom.v2i0.5532.
- Karaa, C., Demira, T., Tezela, A., Zihnia, M. (2007). *Aggressive Periodontitis with Streptococcal Gingivitis: A Case Report*, *European Journal of Dentistry*, October - Vol.1 p251-255.

Lei, C., Xiuchun, G., Yuetan, D., Xiaojing, W., Jenishkumar R., Ping, X. (2011). Identification of hydrogen peroxide production related genes in *Streptococcus sanguinis* and their functional relationship with pyruvate oxidase. *Microbiology* (2011), 157, p.13–20, DOI 10.1099/mic.0.039669-0.

Montenegro, G., Avila, G., Peña, R. (2001). Botanical origin and seasonal production of propolis in hives of Central Chile. *Bol. Bot. Univ. Sao Paulo* 19:1 6.

Nagy, M., Grancai, D. (1996). Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie* 51:100-10

Neychev H, and col. (1988) Immunomodulatory action of propolis. *Acta Microbiol-Bulg.*1988;23:58-61.

Nogueira N. (1964). The spread of a fierce African bee in Brazil. *Bee World* 1964;45:119-121.

Rojas N y col. (1988). Acción antibacteriana de un preparado a base de propóleos. In: Asís M. editors. *Investigaciones Cubanas sobre el propóleos. Proceedings of 1º simposio sobre los efectos del propóleos en la salud humana y animal.* Varadero, Cuba; 1988:78-82.

Rosales, A. (1981). Bosquejo de regionalización y subregionalización geográfica climática de Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Instituto Meteorológico Nacional. San José, Costa Rica (Sin publicar).

Samara, N., Benítez, N., Cabezas, F (2011). Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca, ISSN - 1692-356. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* Vol. 9 No. 1 p6-8.

Samper, H., Pérez, H. El propóleos al 3% como coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis leve. Disponible en : <http://www.medicentro.sld.cu/pdf/Sumariol.../propoleoal3completo.pdf>

Sanz, I., Bascones, A. (2008). Otras enfermedades periodontales. I: Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas. *Av Periodon Implantol.* 2008; 20, 1: 59-66.

Senty, L., Das, S., Kanamoto, T., Munro, C., Kitten, T. (2009). Development of genetic tools for in vivo virulence analysis of *Streptococcus Sanguinis*. *Microbiology* (2009), 155, p.2573–2582 DOI 10.1099/mic.0.024513-0.

Xu, P, Alves, J., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L., Manque, P, Ge, X., Serrano, M., Puiu, D., Hendricks, S., Wang, Y., Chaplin, M., Akan, D., Paik, S., Peterson, D., Macrina, F, Buck, G. (2007). Genome of the Opportunistic Pathogen *Streptococcus Sanguinis*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Apr. 2007, p. 3166–3175 Vol. 189, No. 8, doi:10.1128/JB.01808-06.