Vol. 2 No.2 2000
ISSN: 1608-1862

DETERMINACIÓN DE LA CMI DE PROPÓLEOS CUBANOS A PARTIR DE DOS TÉCNICAS DIFERENTES.

Autores: Daimy Díaz Mena, Joel D. Gil Rodríguez y Gisela Valdés González.

Estación Experimental Apícola (EEA)

Resumen

El propóleos es un producto apícola natural que presenta propiedades biológicas diversas, entre las que se encuentran sus propiedades antimicrobianas.

En nuestro trabajo nos proponemos como objetivo: evaluar el efecto antibacteriano del propóleos a través de la determinación comparativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI), utilizando la técnica de los discos de celulosa y la técnica de difusión en doble capa de agar.

Al aplicar el procesamiento estadístico se encontró que no hay diferencias significativas entre las técnicas aplicadas para un nivel de significación de 95%, es decir los 2 métodos empleados en este trabajo para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de propóleos y los valores de CMI tienen el mismo comportamiento.

Todos los extractos de propóleos presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas utilizadas; siendo mayor frente a las bacterias gram+ : *S. aureus* y *Bacillus subtilis*, con valores de CMI entre 0.05 mg/mL y 45 mg/mL, que frente a las bacterias gram– : *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* y *E. coli,* con valores de CMI entre 10 mg/mL y 50 mg/mL ;con excepción de la bacteria gram– : *K. pneumoniae* que se comportó de forma similar a las bacterias gram+ cuyos valores de CMI estuvieron entre 0.05 mg/mL y 15 mg/mL.

Se encontraron diferencias significativas entre los propóleos, así como en la interacción propóleos y microorganismos en los valores obtenidos de los halos de inhibición.

Introduccion

Los productos naturales aún hoy en día donde prima la alta tecnología en el desarrollo de medicamentos, han ido desplazando a los fármacos, debido a que estos, en el decursar de los años, han dejado muchas secuelas provocadas por sus efectos secundarios impredecibles y por su uso indiscriminado, por estas razones los productos que nos brinda la sabia naturaleza han ido ganando poco a poco un lugar entre los seres que habitamos nuestro planeta.

El propóleos es un producto apícola natural que presenta propiedades biológicas diversas. Entre las

que se encuentran sus propiedades antimicrobianas, estas han sido corroboradas en diferentes países del mundo. En Cuba con el desarrollo de la Especialidad en Microbiología, a los investigadores relacionados con esta sustancia, se hace cada vez más interesante su estudio.

Es una sustancia de color pardo rojizo o amarillo verdoso producido por las abejas a partir de resinas vegetales; contiene fundamentalmente ceras y aceites esenciales, es una sustancia compleja soluble en alcohol y otros solventes. (Ghisalberti, 1978; Asis, 1989; Brown, 1989; Bankova, 1995; Stangaciu, 1998;Yanucci, 1998).

Dentro de las propiedades biológicas enunciadas mundialmente se encuentran: antibacterianas, antiparasitarias, antitóxicas, antialérgicas, epitelizantes, estimulantes de inmunogénesis entre otras. (Debuyser, 1983; Lejeune, 1988; Ponce, 1988; Goetz, 1990;Vaar Foeda, 1992; Menezes y cols, 1997; Matsuno 1997; Stangaciu, 1998; Park y cols, 1998; Park y cols, 1998a; Park y cols 2000)

Si tenemos en cuenta que la composición química del propóleos comprende compuestos biológicamente activos con propiedades antimicrobianas, se puede llegar a afirmar que este bálsamo es una compilación de sustancias antibióticas muy útiles en la Medicina Humana. (Havsteen, 1980; Damyanliev et al, 1982; Machín, 1983; Giral y cols, 1988; Guerra y Uribe, 1988; Miyares, 1988; Cueto,1989; Stojko, 1993; Stark, 1993; Hoffman y cols, 1998).

El tratamiento de las infecciones bacterianas graves depende del diagnóstico rápido y preciso. Una condición para el uso adecuado de los antibióticos es el estudio previo de la sensibilidad de los microorganismos a los antibacterianos, lo que se puede realizar a través de la determinación de la Concentración Mínimo Inhibitoria mediante técnicas establecidas.

Entre las técnicas utilizadas se encuentran la Técnica de doble difusión en capa de agar (Grove y Randall, 1955) y la Técnica de los discos de celulosa (Kirby y Bauer, 1960).

Materiales y metodos

PROPÓLEOS CUBANOS EMPLEADOS:
1- Pinar del Río, recolectado en enero de 1997.
2- Pinar del Río, Mcpio. Minas, UBPC ´´Jalea Minas´´ recolectado en enero de 1997.
3- Pinar del Río, Mcpio. Viñales, recolectado en enero de 1997.
4- Guantánamo, recolectado en 1996.
5- Guantánamo, recolectado en 1997.
6- Guantánamo, Mcpio. Baracoa, UBPC ´´Antero Regalado´´ recolectado en marzo de 1997
7- Camagüey, Mcpio. Camarote, Apiario Carmen, recolectado en abril de 1997.
8- Habana, Mcpio. Artemisa, recolectado en 1992.
9- Santiago de Cuba, recolectado en 1997.

10- Santiago de Cuba, Mcpio. Guamá, recolectado en 1997.
11- Santiago de Cuba, Mcpio. La Maya, recolectado en 1997.
12- Santiago de Cuba, recolectado en noviembre de 1997.
13- Habana, Mcpio. Bauta, recolectado en 1998.
14- Matanzas, recolectado en enero de 1998.
15- Matanzas, recolectado en febrero de 1998.
16- Matanzas, recolectado en marzo de 1998.
17- Cienfuegos, recolectado en enero de 1998.
18- Cienfuegos, recolectado en febrero de 1998.
19- Cienfuegos, recolectado en marzo de 1998.
20- Pinar del Río, Mcpio. Minas, recolectado en 1998.

Resultados y discusion

Los valores obtenidos de las concentraciones de los diferentes extractos alcohólicos de propóleos oscilaron entre 51.5 mg/mL y 79.075 mg/mL.

Los porcientos de rendimientos estuvieron entre 27.84 y 82.46, semejantes a los valores reportados por Ferrás, 1995. La variedad de los valores pudiera ser justificada por la calidad de la materia prima que es diferente en cada muestra.

En la determinación del tipo de propóleos fueron clasificados en rojos, naranja, verde y otros que estuvieron fuera de clasificación debido a mostrar manchas no definidas; según Alvarez y cols, 1989 existen manchas cuya ocurrencia pueden tener varios orígenes: pueden ser mezclas de distintas resinas, transformaciones debido a la actividad enzimática de las secreciones mandibulares de las abejas como consecuencia de factores ambientales.

Para el caso del propóleos se hace necesario establecer la técnica más eficiente para la determinación de la CMI frente a determinados microorganismos.

MICROORGANISMOS EMPLEADOS:

Staphylococcus aureus ATCC 25923.
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P.
Bacillus subtilis ATCC 6633.
Bacillus subtilis ATCC 6636.
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.
Escherichia coli ATCC 25922.
Salmonella typhimurium ATCC 14028.
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031.

En la preparación de los extractos alcohólicos (96°A) de propóleos se realizó una doble extracción seguidas cada una de procesos de filtración, Humberto Yanucci en 1998 describió un procedimiento similar a este, finalmente las concentraciones que se prepararon estuvieron entre los valores de 0.01 mg/mL y 50 mg/mL.

Las muestras se sometieron a un proceso de determinación del tipo de propóleos mediante el método de Cromatografía en Capa Delgada, descrito por Alvarez y col en 1989.

Las técnicas desarrolladas para la determinación de las CMI fueron: Técnica de los discos de celulosa (Kirby y Bauer, 1960; Gil y col, 1996) y la Técnica de difusión en doble capa de agar (Grove y Randall, 1955).

El inóculo bacteriano se preparó a partir de cultivos puros, lo que fue convertido en una suspensión bacteriana; esta fue inoculada en enlermeyers, incubada y centrifugada. El pellet fue resuspendido en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar una densidad óptica de 0.1 a 560 nm.

Para la técnica de los discos de celulosa se encontró, que todos los extractos de propóleos probados presentaron acción antibacteriana, con valores de halos de inhibición variables frente a los microorganismos. Otros autores han reportado esta acción antibacteriana empleando esta técnica. (Brumfitt y cols, 1990; Gil y cols, 1996; Gil y cols. 1996ª; Park y cols ‘ 1998; Park y cols, 2000)

Los propóleos 1, 3, 8, 11, 13, y 18 fueron los extractos donde se encontraron los valores máximos de halos de inhibición del crecimiento bacteriano para los diferentes microorganismos. Por otra parte los propóleos 14, 15, 17 y 20 fueron los extractos donde se encontraron valores mínimos para algunos microorganismos (Tabla 1). Esto indica la diversidad de actividad antibacteriana de los propóleos. Muchos autores han encontrado gran variabilidad de diámetros de halos de inhibición (Rojas y cols, 1988ª; Park y cols, 2000)

Con respecto a la técnica de difusión en doble capa de agar encontramos que a través de este procedimiento se puede determinar que todos los extractos de propóleos presentan actividad antibacteriana. Valdés y cols en 1985 encontraron actividad antibacteriana de extractos alcohólicos de propóleos frente a cepas de *Bacillus* subtilis, S*taphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa por este método*, más tarde en 1988 Rojas y cols reportaron actividad antibacteriana de un biopreparado a base de propóleos cubanos.

Así encontramos a través de este método que los propóleos 2, 3,11,16, 17, 18 y 20 fueron los extractos en los cuales se encontraron los valores máximos frente a algunos microorganismos con excepción del 7 y 14 donde también se encontró valores mínimos de halos de inhibición (Tabla 2).

En cuanto a la susceptibilidad de los microorganismos por la técnica de los discos de celulosa

encontramos una gran variabilidad entre los mismos, donde frente a las bacterias gram + se manifestaron valores mínimos de CMI entre 0.05 y 0.25 mg/mL, similares a los reportados por Aga y cols en 1992 y en 1994; mientras que frente a las bacterias gram- se manifestaron valores entre 0.25 y 40 mg/mL; en cuanto a los valores máximos manifestados, el comportamiento fue similar, frente a las bacterias gram+ los valores oscilaron entre 0.05 y 35 mg/mL y para las bacterias gram- los valores oscilaron entre 0.05 y 50 mg/mL. Estos resultados demostraron que se necesita mayor concentración para inhibir el crecimiento de las bacterias gram- que frente a las bacterias gram+ utilizadas, Gil y cols en 1996 describieron un comportamiento similar frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Tabla 3).

Con relación a los resultados arrojados por la técnica de difusión en doble capa de agar se determinó que todas las cepas resultaron sensibles al propóleos, aunque los valores mínimos de CMI fueron en general más bajos que en la técnica de los discos de celulosa.

La susceptibilidad de las cepas fue también en este caso variada, donde frente las bacterias gram+ se manifestaron valores mínimos entre 0.025 y 0.1 mg/mL mientras que en las bacterias gram- se observaron valores entre 0.05 y 50 mg/mL; para los valores máximos en las bacterias gram+ oscilaron entre 0.05 y 1 mg/mL, para las bacterias gram- estuvieron entre 0.1 y 50 mg/mL (Tabla 4), Kroll en 1993 encontró valores similares a los mostrados frente a *Staphylococcus aureus* , en 1997 Menezes y cols encontraron actividad inhibitoria de extractos alcohólicos de propóleos provenientes de *E. Pinus* y *E. Eucalyptus* frente a bacterias gram+, los valores de CMI resultaron similares a los descritos en este trabajo.

Al aplicar el análisis estadístico (Tabla 5), se comprobó que existen diferencias significativas entre las cepas bacterianas para $p<0.001$, donde los resultados del Test de rangos múltiples de Duncan para un nivel de significación de un 95% (Tabla 7), arrojó que las cepas de ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538P, ***Bacillus subtilis*** ATCC 6636, ***Bacillus subtilis*** ATCC 6633 y ***Klebsiella pneumoniae*** ATCC 10031, no difieren significativamente entre ellas, a las que correspondieron los menores valores, pero si difieren del resto de las cepas. Por otro lado ***Escherichia coli*** y ***Pseudomonas aeruginosa***, no difieren entre sí, y por último ***Salmonella typhimurium*** resultó ser el microorganismo menos sensible a los extractos de propóleos, sin embargo la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 difiere de todas, en 1997 Fernandez y cols reportaron un comportamiento similar en cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Estos resultados demuestran que para los microorganismos gram+ se requirieron menores concentraciones de propóleos para inhibir el crecimiento bacteriano, mientras que los gram- **,**resultaron ser los microorganismos más resistentes, al necesitar una mayor concentración, para lograr el mismo efecto, con excepción de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 que se comportó similar a las bacterias gram+, lo que coincide con lo reportado por Ayuso y cols en 1991, aunque otros han reportado la ausencia parcial o total de sensibilidad de esta cepa a este producto como Grange y cols en 1990 y Dimov y cols en 1992.

Al aplicar el procesamiento estadístico se encontró (Tabla 6) que no hay diferencias significativas entre las técnicas aplicadas para un nivel de significación de 95%, es decir ambos métodos, pueden ser empleados para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos alcohólicos de propóleos y los valores de CMI.

Es evidente la gran variabilidad de sensibilidad al propóleos entre las cepas estudiadas en este trabajo que resultó estadísticamente significativo para un nivel de significación del 99.9% (Tabla 6).

Conclusiones

Todos los extractos de propóleos presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas utilizadas.
Se corrobora la existencia de la variabilidad del efecto antibacteriano del propóleos.
Para determinar CMI de extractos alcohólicos de propóleos pueden ser empleadas indistintamente una u otra técnica.
Los propóleos probados presentaron un efecto marcadamente mayor frente a bacterias Gram +, con valores de CMI entre 0.025 y 10 mg/mL.
Se determinó la existencia de una gran sensibilidad de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 a los extractos de propóleos, obteniéndose CMI de valores entre 0.05 mg/mL y 0.2 mg/mL.
Se encontró efectos antibacterianos de los extractos de propóleos frente a las cepas Gram- *Salmonella typhimurium, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con valores de CMI entre 10 mg/mL y 50 mg/mL, para ambas técnicas.
Existen diferencias significativas de variabilidad en la sensibilidad de los microorganismos empleados.

Tabla 1. Valores mínimos y máximos de los diámetros de los halos de inhibición correspondientes a los propóleos más significativos obtenidos en la Técnica de los Discos de Celulosa.

Propóleos	***Diámetros de los halos (mm)***	
14(F.C)	6	
15(R)	6 - 6.3	V. mín
17(R)	6	
20(R)	6	
1(N)	15.6	
3(R)	1 8 - 22.6	***V. máx***
8(N)	15.6 - 18.6	
11(N)	17 - 18	
13(N)	18	

18(R)	17.3 - 24.6	

Leyenda:V-verde,N-naranja,R-rojo,F.C-fuera clasificación.

Tabla 2. Valores mínimos y máximos de los halos de inhibición correspondientes a los propóleos más significativos, obtenidos en la Técnica de doble difusión en capa de agar.

Propóleos	***Diámetros de halos (mm)***	
7(V)	6-6.3	V. mín
14(F.C)	6-6.3	
2(N)	18.6	
3(R)	22.6 - 24.6	***V. máx***
11(N)	17.3 - 21.6	
16(N)	17.3	
17(R)	26.3 - 28.3	
18(R)	19.3 - 27	
20(R)	18.3 - 26.3	

Tabla 3. Valores mínimos y máximos de Concentración Mínimo Inhibitoria(CMI) correspondientes a los propóleos más significativos obtenidos en la Técnica de los Discos de Celulosa.

CMI(mg/mL)	*TECNICA*	*DISCOS*	*DE*	*CELULOSA*
	Pp	**GRAM +**	**EPP**	**GRAM -**
V. mín	**4**	**0.1 – 0.25**	**2**	**0.25 – 45**
	17	**0.05 – 0.25**	**8**	**0.1 – 45**
	19	**0.05 – 0.25**	**11**	**10 – 35**
	20	**0.05 – 0.1**	**12**	**0.05 – 40**
			18	**0.05 – 40**
V. máx	**7**	**1 – 35**	**6**	**0.25 – 50**
	10	**0.1 – 25**	**9**	**2.5 – 45**
	11	**0.05 – 10**	**10**	**10 – 50**
	13	**0.1 – 20**	**17**	**0.05 – 50**
			20	**0.1 – 50**

EPP – extractos propóleos

Tabla 4. Valores mínimos y máximos de Concentración Mínimo Inhibitoria(CMI) correspondientes a los propóleos más significativos, obtenidos en la Técnica de doble difusión en capa de agar.

CMI	*TECNICA*	*DOBLE*	*DIFUSION*	*EN CAPA*
	Pp	**GRAM +**	**Pp**	**GRAM -**
V. mín	**4**	**0.05 – 0.1**	**5**	**0.1 – 50**
	11	**0.025 – 0.05**	**7**	**0.25 – 45**
	13	**0.1 – 0.5**	**8**	**0.05 – 45**
	17	**0.05 – 0.1**	**13**	**1 – 45**
	18	**0.025 – 0.05**	**17**	**0.05 – 50**
	19	**0.05 – 0.1**		
V. máx	**1**	**0.1 – 0.25**	**2**	**0.1 – 50**
	4	**0.1 – 0.05**	**4**	**0.1 – 50**
	7	**0.1 – 1**	**9**	**0.1 – 50**
	10	**0.5 – 1**	**12**	**0.1 – 50**
	12	**0.05 – 0.5**	**20**	**0.05 – 50**
	14	**0.25 – 1**		

Tabla 5. Resultados obtenidos al aplicarle a os datos de halos de inhibición un Anova Trifactorial.
Factor A: Técnicas empleadas.
Factor B: Microorganismos.
Factor C: Propóleos.

F. de variación	***F***
(A)	7.630 ***
(B)	45.049 ***
(C)	23534 ***

(AXB)	14.980 ***
(AXC)	1.468 n.s.
(BXC)	39.607 ***
(AXBXC)	3.279 ***

Tabla 6. Resultados obtenidos al aplicarle a los datos de concentración mínima inhibitoria (CMI) un Anova Bifactorial.

Factor A: Técnicas empleadas.
Factor B: Propóleos.

F. de variación	***F***
(A)	0.001 n.s.
(B)	1.707 *
(AXB)	1.237 n.s.

Tabla 7. Resultados obtenidos al aplicarle a los microorganismos empleados el Test de Duncan, concentración mínima inhibitoria (CMI).

Microorganismos	***Medias***
Salmonella typhimurium ATCC 14028	42^{a}
Escherichia coli ATCC 25922	40875^{ab}
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	38.5^{b}
Staphylococcus aureus ATCC 25923	4.968119^{c}
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P	1.46896^{d}
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	1.01^{d}
Bacillus subtilis ATCC 6633	0.8166666^{d}
Bacillus subtilis ATCC 6636	0.6231247^{d}

Leyenda: Letras diferentes difieren significativamente para $p < 0.05$.

Bibliografía

- Aga H., T. Orio,K. Maruta , T. Shibuya , M. Yoneyama , T. Sugimoto. and M. Kurimoto. "Antimicrobial activity of Brazilian propolis". Medicine and Biology 124(5).—p205-209, 1992.
- Aga H., T. Shibuya, T. Sugimoto, M. Kurimoto and S. Nakajima. "Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis".Biosci. Biotech. Biochem.; 58 (5), --p 945-946, 1994.
- Alvarez J. D., J Granadillo y Caridad Tabío. "La cromatografía en capa delgada como método para la clasificación del propóleos cubanos". Cienc. Tec. Agric. Apicultura V(5).--p51-60, 1989.
- Asís M. "Propóleos:El oro púrpura de las abejas".CIDA 67, 1989.
- Ayuso M. J., M. Reyes y M. V. Toro. Estudio dela actividad antimicrobiana de compuestos triterpénicos aislados de Erica andevalensis Cabezudo-Ribera". Anales de la Real Academia de Farmacia. 57 (3): --p 419-423, 1991.
- Bankova V., R. Christov, A. Kugumgiov, M. **C.** Marcucci and S. Popov. "Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis". Z. Naturforsch, 50C, --p 167-172, 1995.
- Brown R. "Hive products: pollen, propolis and royal jelly". Bee Wld 70.—p109-117, 1989.
- Brumfitt, w., J.M.T. Hamilton-Miller and I. Franklin. "Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis". Microbios. 62:--p. 19-22,1990.
- Cueto D. J. "Experiencia clínica de los medicamentos elaborados con propóleos en investigaciones cubanas sobre propóleos". Cuba. --p 259-262, 1989.
- Damyanliev R. Folia Medica 24(2)--p24-26,1982.
- Debuyser E. "La propolis". Docteur en Pharmacie Thesis. Universite de Nantes. France.—p82, 1983.
- Dimov V., N. Ivanovska, V. Bankova and S. Popov. "Immunomodulatory action of propolis IV. Prophylactic activity against Gram- infections and adyuvant effect of the water-soluble derivative". Vaccine; Vol. 10, Issue 12, --p 817-823, 1992.
- Fernandes, A.J.R; Lopes, CAM;Sforcin, JM;Funori, SRC.(1997) Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Journal of Venomous Animals and Toxins. 3 (2) p 287 – 294.
- Ferráz B. I. "Estudio químico preliminar y microbiológico del propóleos rojo de la región de Nueva Paz. Fracción B1". Trabajo de Diploma, 1995.
- Ghisalbereti E., P. R. Jeffenes, R. Lanteri and J. Matisons "Constituens of propolis". Experimentia 34.—p157-158, 1978.
- Gil J. D., G. Valdés, O. Cuesta, A. Cuéllar, J. Agüero, D. Valdés, L. Oliva y A. Meriño. "Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de propóleos cubanos del Escambray y Los Palos". 1V Simposio de Propóleos y 111 de Apiterapia. LaHabana. Cuba, 1996a
- Gil J. D., M. Kagana, G. Valdés, O. Cuesta, A. Cuellar, A. Vázquez, B. I. Ferras, L. Oliva y A. Meriño. "Actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de propóleos rojos cubanos de Nueva Paz y Melena del Sur. 1V Simposio de Propóleos y 111 de Apiterapia. La Habana. Cuba,

1996b.
- Giral T., V. Menéndez, L. Rodríguez, R. Raiumont, M. López y M. Ruiz. "Ensayo terapéutico del propóleos en las micosis
- superficiales y las úlceras de los miembros inferiores". 1er Simposio sobre los efectos del propóleos en la salud humana y animal. Varadero: 160, 1988.
- Goetz P. "Monographies medicalisses de phytotherapie: propolis". Phytotherapie 3.--p29-30, 1990.
- Grange J. M. and R. W. Davey. "Antibacterial properties of propolis (bee glue)". J. R. Soc. Med. 83, --p 159-160, 1990.
- Guerra M. y A. I. Uribe. "Uso del propóleos en Medicina Humana(Revisión Bibliográfica)". Investigaciones cubanas sobre el propóleos.--p196-198, 1988.
- Havsteen B. Apiacta 15(3).—p104-107, 1980.
- Hoffman, FL; García – Cruz, CH; Carmello, MT; Dutra, Al; Vinturim, TM. (1998) Determination of the "in vitro" antimicrobial activity of three propolis-based pharmaceutical products. Higiene Animal 12 (53) p 57 – 60.
- Kroll V., S. Scheller, J. Shani, G. Pietsz and Z. Czuba. "Synergist Effect of Ethanolic Extract of Propolis and Antibiotics on the Growth of Staphylococcus aureus". ECV. EDITIO CANTOR VERLAG. Arzneim.- Forsch./Drug Res. 43 (1), 5, --p 607-609, 1993.
- Lejeune B., A. Pourrat and H. Dehmouche "Propolis: Utilization en dermocosmetologie". Part Cosmet Arom 82.—p73-77, 1988.
- Machín L. C. "Evaluar el uso del propóleos en el tratamiento de las úlceras flebostáticas". Ciudad de la Habana: Facultad de Medicina, 1993.Trabajo para optar por el Título de especialista de !er Grado en Medicina General Integral, 1993.
- Matsuno, T; Chen, C; Basnet, P. (1997). A tumouricidal and antioxidant compound isolated from an asqueos extract of propolis. Medical Science Research. 25(9)p 583 – 584.
- Menezes, H; Bacci, M; Oliveira, S.D and Pagnocca, F.C.(1997). Antibacterial properties of propolis and products containing propolis form Brazil. Apidologie (France) V. 8 (2)p. 71 – 76.
- Miyares C., I. Hallards, C. Castaneda et al. "Therapeutic trials with the propolis-based product Propalisina in human giardiasis". Acta Gastroent. Latinoam 18. --p 195-202, 1988.
- Park Y.K; M. Ibegaki. (1998. Preparation of water and etanolic extract of propolis and evaluation of the preparation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (11), 2230 – 2232.
- Park Y.K; M. Ibegaki; M. H Koo; J. A Cury; P.L Rosalen and J.A.S.(1998ª). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganims. Cur. Microbiol.V.34, p. 24 – 28.
- Park Y.K; M. Ibegaki; S. Matias de Alencar; H. K Wong; K. Bastow; M. Cosentino y K. H Lee.(2000). Determinación de actividades citotóxica y anti HIV de dos extractos etanólicos de propóleos colectados en diferentes regiones del Brasil. Mensajem DOCE. N0 56. p 3 – 6.
- Ponce de León R. y P. G. Benítez. "Estudio morfológico comparativo del efecto de la propolina, el alcohol y el bálsamo de chotaskovski como agentes cicatrizantes". 1er Simposio sobre los efectos del propóleos en la salud humana y animal. Varadero: 157, 1988.
- Rojas N., A. G. Chaumont, B. M. González and N. Vázquez "Acción antibacteriana de un biopreparado a base de propóleos". Investigaciones cubanas sobre el propóleos. --p 78-82, 1988.

- Rojas N., S. Lugo y E. Collazo. "Acción antimicobacteriana del extracto alcohólico de propóleos". Investigaciones cubanas sobre el propóleos. --p 82-88, 1988a.
- S. Stangaciu. (1998). Composición y propiedades del propóleos. Apiacta □ □ □III, 71 – 77.
- Stark J. A. y Z. Glinski. "El efecto antibacteriano del propóleos". Proc. 33rd Int. Congr. Apiculture Beijing. China. Apimondia. Bucharest. Romania. --p 142, 1993.
- Stojko R. y A. Stojko. "Uso de preparados apiterapéuticos en la ginecología". Proc. 33rd Congr. Apiculture Beijing. China. Apimondia. Bucharest. Romania. --p 142-143, 1993.
- Vaar Foeda. (1992). Propolis - a study of inmunological properties and safety. N. G Ilbaeck. 44 (8) p 375- 384.
- Valdés G. , N. M. Rojas y C. Morales. " Estudio comparativo de la acción antimicrobiana del propóleos con antibióticos desinfectantes convenciales ". Cienc. Tec. Agric. Apicultura, V-1 agosto 1985, p 23 – 33.
- Yanucci H. Producción de propóleos. Gestión Apícola. Revista del Sector Apícola para latinoamérica, junio/julio 1998 Año 2. N^0 8. p 39 – 42.