

Actividad antifúngica de propóleos obtenidos en tres provincias de Cuba sobre hongos contaminantes en cultivo de tejidos vegetales

Antifungal activity of propolis obtained at three Cuban provinces against fungal contaminants in plant tissue culture

René Dionisio Cupull-Santana*, Remigio Cortés-Rodríguez**, Ervelio Eliseo Olazábal-Manso**, Carlos Alberto Hernández-Medina***

RESUMEN

La investigación se realizó con el objetivo de evaluar las características fisicoquímicas y la actividad antifúngica de propóleos de *Apis mellifera*, provenientes de las provincias de Villa Clara, Cienfuegos y Sancti Spiritus, Cuba. Se utilizó el método de recolección por raspado y se estableció el contenido de cera, ceniza, material insoluble y resina de los propóleos crudos. Además, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a los hongos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Colletotrichum* sp. y *Monilia* sp.; los extractos presentaron alta actividad antifúngica en un amplio rango de concentraciones; además, los parámetros fisicoquímicos presentaron valores semejantes y dentro de los establecidos por regulaciones internacionales.

ABSTRACT

The present research was carried out with the objective of evaluating the physicochemical characteristics and the antifungal activity in propolis from *Apis mellifera*, coming from the Villa Clara, Cienfuegos and Sancti Spiritus counties in Cuba. Scraping harvesting methods were used to establish wax, ash, insoluble material and resin contents in raw propolis. In addition, *in vitro* antifungal activity of ethanolic extract of propolis was evaluated for fungi *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Colletotrichum* sp., and *Monilia* sp.: the extracts presented high antifungal activity in a wide range of concentrations; also, the physicochemical parameters presented similar values and inside the established ones for international regulations. This study provides information to select propolis according to the wanted applications.

INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. Las pérdidas causadas por microorganismos contaminantes, principalmente hongos y bacterias, son un serio problema a escala mundial en numerosos laboratorios (Bankova, 2009). Los microorganismos están comúnmente en las plantas *in vivo*, pero pueden provocar efectos devastadores en las plantas en condiciones *in vitro*. Existen muchas fuentes que pueden introducir contaminantes al cultivo *in vitro* de plantas, como el personal, el ambiente del laboratorio y el tejido vegetal a propagar.

Se han establecido numerosos procedimientos tecnológicos para controlar o disminuir la presencia de contaminantes. El empleo de productos químicos (fungicidas y antibióticos) ha constituido una vía rápida tanto para atenuar como para eliminar estos microorganismos (Carrazana, León, Herrera, Alvarado & Quiñones, 1997). El uso de fungicidas en el proceso de micropropagación de especies vegetales no ha tenido amplia difusión a

Recibido: 30 de marzo de 2013
Aceptado: 12 de noviembre de 2013

Palabras clave:

Antifúngicos; propóleos; hongos; características fisicoquímicas; Cuba.

Keywords:

Antifungals; propolis; fungi; physico-chemical characteristics; Cuba.

* Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km. 5 1/2, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, C.P. 54830.

** Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km. 5 1/2, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, C.P. 54830.

*** Centro Universitario Municipal Camajuani. Joaquín Paneca # 62-A, Camajuani, Villa Clara, Cuba, C.P. 52500. Correo electrónico: cahm862@uclv.edu.cu

escala masiva debido, quizás, a los riesgos de fitotoxicidad, a su elevado costo y a su alta especificidad. Por ello, el uso de productos naturales como el propóleo puede ser una solución alternativa de gran valor (Quiroga, Sampietro, Soberón, Sgariglia & Vattuone, 2006).

El propóleo es una sustancia resinosa que elaboran las abejas al mezclar resinas de árboles y arbustos con cera, enzimas salivares, entre otros, con el fin de taponar herméticamente la colmena e impedir que proliferen dentro de ella cualquier tipo de infección. Es una sustancia compleja, constituida por gran variedad de compuestos químicos; su composición es inestable y varía según la procedencia.

Producen propóleos las especies de abejas *Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. (Gil, Perelli, Alvarado, Arias & Blumenthal, 2012). Este material es una mezcla compleja de sustancias naturales y contiene gran variedad de compuestos químicos. Entre sus moléculas microbiológicamente activas se destacan flavonoides y ácidos fenólicos y sus ésteres (Kalogeropoulos, Konteles, Troullidou, Mourtzinou & Karathanos, 2009). En muestras provenientes del trópico, con actividad biológica similar, se han encontrado moléculas del tipo terpenoide, derivados prenilados de ácidos p-cumáricos, lignanos y benzofenonaspreniladas, lo cual sugiere que la actividad es debida a la combinación y a las sinergias de diferentes compuestos (Londoño, Puentes, García, Carrillo, Quintero & García, 2008).

La composición del propóleo depende en gran medida de su origen botánico (Bankova, 2009), de la especie de abeja (Londoño *et al.*, 2008), de la época y del método de recolección. Con respecto al último factor, existen varios métodos de recolección, pero se han utilizado principalmente el método tradicional de raspado y el empleo de mallas plásticas.

Por la diversidad en su composición química y por su empleo industrial, se ha hecho necesario el control de calidad y la normalización del propóleo crudo y sus productos. Con este fin, se han establecido metodologías de trabajo en diferentes normas internacionales, entre las que se incluye el *Reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos* del Ministerio de Agricultura de Brasil (2001).

Una de las propiedades más importantes del propóleo es su actividad antimicrobiana, que se atribuye fundamentalmente a la presencia de flavonoides (pinocembrina, galangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato), ésteres bencilicos del ácido p-cumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeico, entre otros.

Teniendo en cuenta que ya el propóleo demostró no tener efectos negativos en los medios de cultivo para las vitroplantas (Funari & Ferro, 2006; Quiroga *et al.*, 2006), y que su efecto antifúngico ya ha sido evaluado con anterioridad (Abramovic, Polar, Bertonec, Jamnik, Smole & Jersey, 2012), se propuso en esta investigación verificar su actividad sobre hongos contaminantes de los medios de cultivo, evaluando la composición química y la actividad antifúngica de los propóleos provenientes de las provincias cubanas de Villa Clara, Cienfuegos y Sancti Spiritus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y obtención de propóleos

Los propóleos se obtuvieron de diferentes apiarios de las provincias de Villa Clara, Cienfuegos y Sancti Spiritus. Las muestras se colectaron en época de primavera, durante los meses de mayo-junio de 2005, por el método de raspado, hasta obtener una muestra representativa del apiario y en cantidad suficiente para los análisis. Las especies *Pinus caribaea* L. y *Cupressus lusitánica* Millar., de las familias botánicas Pinaceae y Cupressaceae, eran la vegetación predominante cercana a los apiarios. El material se almacenó bajo refrigeración y en oscuridad, en el laboratorio de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central de Las Villas, Cuba. Previo al análisis, las muestras se trituraron y homogenizaron.

Preparación de los extractos etanólicos

Se pesaron 30 g de los propóleos crudos que se sometieron a extracción exhaustiva con etanol 96% (3 mL × 100 mL, en un agitador magnético, durante 48 h, a temperatura ambiente y en oscuridad). Luego, el material se filtró en un embudo con papel de filtro *Whatman* núm. 1. A los filtrados combinados se les eliminaron las ceras mediante precipitación y filtración, previa adición de 50 mL de agua destilada y refrigeración del extracto a -12 °C. Posteriormente, se evaporó el solvente de los filtrados por destilación al vacío en un rotoevaporador a presión reducida y temperatura de 40 °C. Los extractos etanólicos se almacenaron en viales ámbar refrigerados a -12 °C hasta su evaluación.

Propiedades fisicoquímicas del propóleo crudo

La extracción del propóleo crudo con etanol se realizó a temperatura ambiente y en la oscuridad con el fin de evitar alteraciones en los metabolitos secundarios presentes en el material. Mediante el enfria-

miento a -20 °C y centrifugación de la disolución etanólica se logró un refinamiento del extracto debido a la precipitación de las ceras, las cuales son insolubles en agua y en el solvente de extracción (etanol 96%) a bajas temperaturas. Los análisis se realizaron por triplicado. Los métodos utilizados fueron reportados en normas internacionales (Ministerio de Agricultura de Brasil, 2001), y se describen brevemente:

- Cenizas: una porción de muestra (100 g) fue calcinada en mufla a 500 °C, y llevada a peso constante. La norma brasileña fija un contenido máximo del 5%.
- Humedad: método termogravimétrico, consiste en secar una porción de muestra de 100 g en estufa a 105 °C ± 2 °C, hasta peso constante.
- Extractables en éter: la fracción de extractables con éter se llevó a cabo por gravimetría, para ello la mezcla se trató con 25 mL de éter de petróleo a 40 °C-60 °C, en un equipo Soxhlet durante 8 h. Posteriormente, el solvente fue destilado y secado el extracto en estufa a 105 °C hasta peso constante. La norma brasileña establece un contenido máximo del 40%.
- Extractables en etanol: por gravimetría de las resinas obtenidas mediante extracción con etanol 96% en equipo Soxhlet (residuo sólido obtenido en el dedal después de determinar el material extractable con éter de petróleo). Posteriormente, se destiló el alcohol a presión reducida, y la resina obtenida se secó en estufa a 105 °C hasta peso constante. Se define un contenido mínimo del 30%.
- Material insoluble: después de la extracción con etanol, el residuo remanente en el dedal se secó en estufa a 40 °C hasta peso constante. La norma define un máximo del 25%.
- Punto de fusión: se determinó en un fusiómetro Fischer Scientific.
- Índice de oxidación: el índice de oxidación se determinó de acuerdo con Salamanca & Correa (2007) con modificaciones. Se pesaron 0.2 g de propóleos en frasco ámbar con tapa; se adicionó 3 mL de etanol destilado 96% y se dio agitación por 48 h a 25 °C. La mezcla se filtró lentamente por un papel de filtro. Se tomó 1 mL del filtrado y se diluyó con agua destilada hasta 25 mL en un balón aforado. De esta disolución se vertieron 5 mL a un tubo de ensayo, se adicionó 0.5 mL de agua destilada y 1 mL de H₂SO₄

al 20% y se agitó por 1 minuto. Se añadió 50 µL de solución de KMnO₄ (0,1 N). El índice de oxidación se reportó como el tiempo de decoloración de la solución del KMnO₄ medido en segundos. Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente y por triplicado.

Actividad antifúngica *in vitro*

Método de la placa perforada. En cajas Petri estériles de 90 mm de diámetro se adicionaron 15 mL de medio de cultivo PDA esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Se perforó el medio de cultivo y se añadió 0.1 mL del extracto etanólico del propóleos disuelto en una mezcla etanol/tween (1 mL/0.5 g) a cinco niveles de concentración (1 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹, 200 mg L⁻¹ y 400 mg L⁻¹) y se dejó gelificar a temperatura ambiente. Seguidamente, se colocó el inóculo del hongo en discos de 6 mm de diámetro, en el punto medio de cada caja Petri. Las placas se incubaron seis días a 25 °C y se midió el diámetro micelial en milímetros. cada 24 h. Se realizaron los controles absoluto y solvente.

Las cepas de las seis especies de hongos utilizadas (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Colletotrichum* sp. y *Monilia* sp.) fueron donadas y caracterizadas morfológicamente por el laboratorio de Micología del Instituto de Biotecnología de las Plantas de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba.

Para el análisis de los datos se empleó el programa *STATGRAPHICS Centurión*® y se aplicó Análisis de Varianza (ANOVA) con tres factores (tiempo en días, tipo de hongo y tratamiento). Para los factores que resultaron significativos se analizaron las diferencias de los niveles con la prueba de comparaciones de Mínima Diferencia Significativa (LSD). Se utilizó un nivel de confianza del 95%, y un nivel de potencia para detectar diferencias significativas del 85% en el ANOVA. Los tratamientos se realizaron por triplicado (tabla 1).

Tabla 1.

Factores y niveles del diseño experimental empleados durante la actividad antifúngica *in vitro*.

Factores	Niveles
Tiempo (días)	7, 14
Hongos	<i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Monilia</i> sp.
Tratamiento (mg L ⁻¹)	1, 50, 100, 200, 400, Blanco absoluto, Blanco etanol/tween

Fuente: Elaboración propia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades fisicoquímicas del propóleo crudo

Las muestras de propóleos de Villa Clara, Cienfuegos y Sancti Spiritus presentaron bajos contenidos de humedad, 2.75%, 2.43% y 2.13%, respectivamente, comparado con valores establecidos por la norma del Ministerio de Agricultura de Brasil (2001). La humedad es un factor desfavorable porque crea condiciones propicias para el desarrollo de algunas especies de mohos y fermentaciones en el almacenamiento de muestras crudas.

El contenido de cenizas fue inferior al 5% para las muestras de Villa Clara (4.3), Cienfuegos y Sancti Spiritus (4.1 y 3.9), que es el máximo permitido por la norma internacional (Ministerio de Agricultura de Brasil, 2001). La determinación del contenido de cenizas es particularmente importante para las muestras crudas de propóleos, ya que indica la existencia de un alto contenido de impurezas mecánicas como madera, tierra, fragmentos vegetales o insectos, o una posible adulteración del material bruto por impurezas (Funari & Ferro, 2006).

El contenido de ceras en todas las muestras superó el límite establecido por la norma del Ministerio de Agricultura de Brasil (2001), que acepta un valor máximo de 40% (tabla 2). Un alto contenido de ceras, en muestras de propóleos crudo, es desfavorable porque en esta fracción no se encuentran presentes los compuestos fenólicos, que son los metabolitos secundarios a los cuales se asocia la actividad biológica (Ministerio de Agricultura de Brasil, 2001).

Además del contenido de ceras, otro parámetro que influye notablemente en la calidad del propóleos es el

contenido de resina soluble en etanol. Cuanto mayor sea el valor de esta fracción mejor será, en términos de rendimiento, la calidad del producto final, puesto que es allí donde se encuentran los compuestos con actividad biológica (Arrate, 2008).

En todas las muestras de propóleos evaluados se encontró que el contenido de sustancias extractables con etanol (resinas) tuvo un valor bajo comparado con la Norma de Ministerio de Agricultura de Brasil, (2001) (10.44±1.97). El bajo contenido de sustancias extractables en etanol puede estar asociado a que las especies vegetales circundantes a la colmena no sean muy ricas en resinas con sustancias fenólicas (Chaillou & Maidana, 2004), o bien, a que durante la recolección, especialmente por el método de raspado, se presente un manejo poscosecha inapropiado por parte del apicultor, mezclando el propóleos con ceras e impurezas mecánicas inherentes al proceso (Chaillou & Maidana, 2004).

Lo anterior concordó con los altos valores obtenidos de sustancias extractables en éter de petróleo en las muestras estudiadas y el mayor contenido de impurezas mecánicas en la muestra. Del mismo modo que ocurre con las ceras, las impurezas mecánicas no contienen principios activos, depreciando el valor biológico del producto. Valores superiores al 25% reflejan una baja pureza del propóleos de acuerdo con los estudios realizados por Arrate (2008). Sin embargo, a pesar del alto contenido de sustancias extractables en éter de petróleo y la baja proporción de resinas, el propóleos presentó un índice de oxidación inferior al valor máximo establecido en la norma (22 s). A partir de la información, se puede deducir que el propóleos posee una alta cantidad de compuestos oxidables. A

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los propóleos recolectados en diferentes provincias de Cuba.

Parámetros	Villa Clara x±DE	Cienfuegos x±DE	Sancti Spiritus x±DE	Límite calidad Norma Brasil
Cenizas (%)	0.68 ± 0.21	0.78 ± 0.19	0.87 ± 0.45	Máximo 5%
Humedad (%)	2.75 ± 0.17	2.43 ± 0.15	2.13 ± 0.06	Máximo 10%
Extractable Éter (%)	53.25 ± 0.67	51.21 ± 0.78	45.22 ± 1.51	Máximo 40%
Extractable EtOH(%)	15.34 ± 1.62	13.34 ± 1.97	12.82 ± 2.27	Mínimo 30%
Insolubles (%)	27.16 ± 1.66	28.21 ± 1.77	26.37 ± 1.37	Máximo 25%
Índice de oxidación (s)	16.85 ± 2.58	18.25 ± 2.49	30.23 ± 3.02	22 s
Rango de fusión (°C)	67-81	66-82	65-81	-

Leyenda: n = 3 DE = Desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia.

mayor concentración de este tipo de compuestos es menor el tiempo de decoloración y, por lo tanto, mejor la calidad del producto en aplicaciones como antifúngico. Por su parte, este indicador es un parámetro ampliamente utilizado para evaluar los propóleos, ya que se relaciona con algunas de sus actividades biológicas y con la presencia de compuestos fenólicos. Palomino, García, Gil, Rojano & Durango (2009) reportan una diferencia similar en el valor de muestras colectadas en el mismo apiario, la cual correlacionó positivamente con el contenido de fenoles y flavonoides totales, y la actividad inhibidora de radicales y antioxidante *in vitro*.

La presencia de diterpenos tipo labdano ha sido reportada recientemente en propóleos de Colombia (Meneses, Durango & García, 2009), Grecia (Popota, Chinou, Marekov & Bankova, 2009) e Italia los propóleos no tienen gentilicio (Trusheva, Popova, Bankova, Tsvetkova, Naydensky & Sabatini, 2003). Diferentes plantas de las familias Pinaceae y Cupressaceae son una posible fuente de los propóleos evaluados. Éstas se corresponden con la vegetación predominante en nuestro experimento (*Pinus caribaea* L. y *Cupressus lusitánica*) cerca de los apiarios de donde se colectó la muestra.

Actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de propóleos

La actividad del propóleos en el control de hongos fitopatógenos ha sido poco explorada. Los microorganismos utilizados en los bioensayos se seleccionaron según la incidencia y la importancia económica que presentan. El ANOVA para la actividad antifúngica de los propóleos obtenidos no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en la inhibición del crecimiento, en

la interacción tipo de hongo respecto del tratamiento aplicado. (1 - 400) (figura 1.) Los tres extractos de propóleos mostraron la mayor actividad antifúngica contra los hongos *Fusarium* sp. y *Aspergillus* sp., para todas las concentraciones y durante las 168 h de evaluación (tabla 3).

Los extractos etanólicos de los propóleos evaluados son relativamente más eficientes, en el control de hongos fitopatógenos, respecto a aquéllos de origen nigeriano reportados en la literatura, los cuales presentaron inhibiciones del crecimiento micelial del hongo *Colletotrichum lindemutianum* a concentraciones mayores al 5% (Obasa, Adeoti, Enikuomehin & Bodunde, 2007).

Para todos los microorganismos se determinó que los menores crecimientos fúngicos corresponden al tratamiento de mayor concentración de propóleos. Por tanto, se estableció que el crecimiento radial para todos los hongos es dependiente de la concentración del extracto. En una proporción inversa, un aumento en la concentración incrementa la inhibición del crecimiento micelial. Particularmente, el propóleos tiene el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos evaluados a los niveles de concentración empleados (tabla 4). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Curifuta, Vidal, Sánchez, Contreras, Salazar & Alvear (2012) al evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de un extracto comercial de propóleos chileno contra seis hongos de interés agrícola (tabla 4).

Las diferencias en la actividad antifúngica por efecto de concentración posiblemente estén asociadas a un mayor contenido de los metabolitos bioactivos del tipo diterpénico, flavonoide y fenólico presentes en el extracto (Markham *et. al.*, 1996).

Tabla 3.
Crecimiento micelial según el tipo de hongo y procedencia del propóleos.

Hongos	Crecimiento micelial (mm)		
	Villa Clara	Cienfuegos	Sancti Spiritus
<i>Penicillium</i> sp.	23.65 ± 0.15 ^a	22.45 ± 0.14 ^a	22.15 ± 0.14 ^a
<i>Aspergillus</i> sp.	23.92 ± 0.14 ^a	21.82 ± 0.13 ^a	23.32 ± 0.15 ^a
<i>Fusarium</i> sp.	23.25 ± 0.15 ^a	23.65 ± 0.15 ^a	21.22 ± 0.13 ^a
<i>Trichoderma</i> sp.	25.15 ± 0.15 ^b	23.10 ± 0.15 ^a	22.65 ± 0.15 ^a
<i>Colletotrichum</i> sp.	32.28 ± 0.15 ^c	31.18 ± 0.15 ^c	30.45 ± 0.15 ^c
<i>Monilia</i> sp.	36.79 ± 0.15 ^d	37.18 ± 0.16 ^d	37.19 ± 0.16 ^d

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de mínimas diferencias significativas (LSD).

Fuente: Elaboración propia.

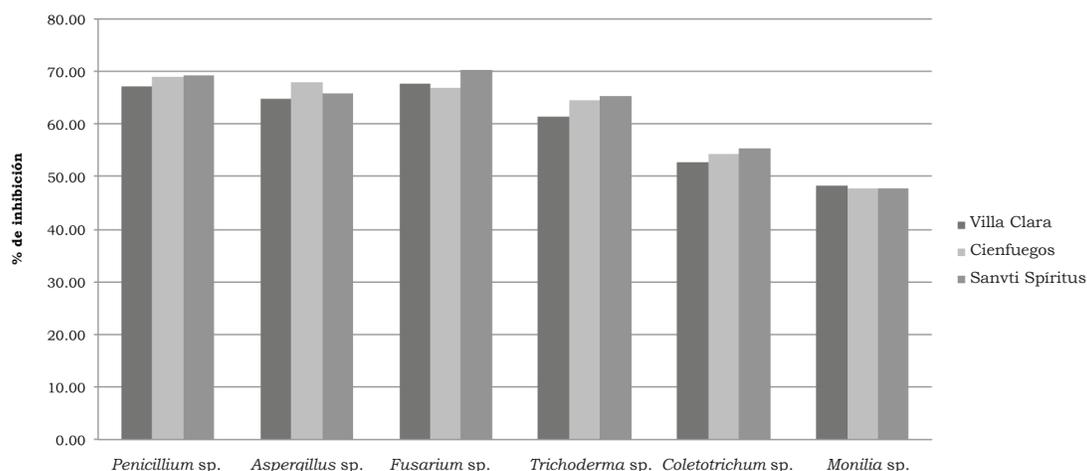


Figura 1. Inhibición del crecimiento fúngico por tipo de hongo y procedencia del propóleo.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.

Efecto de la concentración y la procedencia del propóleo sobre el crecimiento micelial de los hongos propóleos.

Tratamiento ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	Crecimiento micelial (mm.)		
	Villa Clara	Cienfuegos	Sancti Spiritus
400	24.71 \pm 0.25 ^a	23.21 \pm 0.25 ^a	23.11 \pm 0.25 ^a
200	25.25 \pm 0.25 ^a	24.15 \pm 0.25 ^a	25.11 \pm 0.25 ^a
100	26.13 \pm 0.25 ^b	27.15 \pm 0.25 ^b	26.65 \pm 0.25 ^b
50	27.47 \pm 0.25 ^b	27.38 \pm 0.25 ^b	27.25 \pm 0.25 ^b
Control solvente	31.86 \pm 0.25 ^c	31.76 \pm 0.25 ^c	31.65 \pm 0.25 ^c
Control absoluto	32.92 \pm 0.25 ^f	32.82 \pm 0.25 ^f	32.72 \pm 0.25 ^f

Letras diferentes indican diferencias significativas en la columna ($p < 0.05$) según la prueba de diferencias mínimas significativas (LS).

Fuente: Elaboración propia.

CONCLUSIONES

1. Las propiedades fisicoquímicas de los propóleos recolectados en las provincias de Villa Clara, Cienfuegos y Santis Spíritus no presentaron variaciones en las características evaluadas entre sí y respecto de las normas del Ministerio de Agricultura de Brasil (2001).
2. Los propóleos de Villa Clara, Cienfuegos y Santis Spiritus exhiben características fisicoquímicas y biológicas aceptables para su utilización como inhibidores del crecimiento de los hongos estudiados.

REFERENCIAS

- Abramovic, H., Polar, T., Bertoncelj, J., Jamnik, P., Smole, S. & Jersey, B. V. (2012). Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. *ChemBiodivers*, 9(8), 1545-1558.
- Arrate, L. (2008). Propóleos, el antibiótico natural de la colmena. *Sustrai: Revista Agropesquera* 13(85), 56-61.
- Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of Apiculture Product and Apiculture Medical Science*, 1(2), 23-28.
- Carrazana, D., León, A., Herrera, L., Alvarado, Y. & Quiñones, R. (1997). Efecto de diversos fungicidas comerciales sobre hongos contaminantes en biofábricas. *Centro Agrícola*, 24(1), 61-66.

- Chaillou, L. & Maidana, J. (2004). Estudio del propóleo de Santiago del Estero, Argentina. *Ciência e Tecnologia des Alimentos*, 24, 11-15.
- Curifuta, M., Vidal, J., Sánchez, J., Contreras, A., Salazar, L. & Alvear, M. (2012). Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de un extracto comercial de propóleo chileno contra seis hongos de interés agrícola. *Ciencia e Investigación Agraria*, 39(2), 347-359.
- Funari, C. & Ferro, V. (2006). Análisis de própolis. *Ciência Technology o Aliments*, 26, 171-178.
- Gil, M., Perelli, A., Alvarado, R., Arias, Y. & Blumenthal, E. (2012). Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleo sobre bacterias enteropatógenas. *Salus online*, 16(3), 29-37. Recuperado de http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/tintura_propoleos.pdf
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Troullidou, E., Mourtzinou, I. & Karathanos, V. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.
- Londoño, A., Punieres, J., García, C., Carrillo, L., Quintero, M. & García, S. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. *Tecnología en Marcha*, 21(1), 49-55.
- Markham, K., Mitchell, K., Wilkins, A., Daldy, J. & Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42(3), 205-211.
- Meneses, E., Durango, D. & García, C. (2009). Antifungal activity against postharvest fungi by extracts from Colombian propolis. *Quím Nova*, 2, 2011-2017.
- Ministerio de Agricultura de Brasil (2001). Instrução Normativa N° 3. Anexo VI. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Diário Oficial da Rep. Federat. do Brasil*. Brasília. Recuperado el 2 de enero de 2011 de <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/60/normas.htm>
- Obasa, K., Adeoti, A., Enikuomehin, O. & Bodunde, J. (2007). Efficacy of Bee-Propolis in control of *Colletotrichum lindemutianum* (Sacc. and Magn.) Brosi and Cav. in vitro. *Research Journal on Microbiology*, 15(2), 175-179.
- Palomino, L., García, C., Gil, J., Rojano, B. & Durango, D. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia Colombia. *Vital*, 16(3), 388-395.
- Popota, M., Chinou, I., Marekov, I. & Bankova, V. (2009). Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*, 70(4), 1262-1271.
- Quiroga, E., Sampietro, D., Soberón, J., Sgariglia, M. & Vattuone, M. (2006). Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 103-110.
- Salamanca, G. & Correa, I., (2007). Principal J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, 25(1), 95-102.
- Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Naydensky, C. & Sabatini, A. (2003). A new type of European propolis, containing bioactive labdanes. *Rivista Italiana EPPOS*, 36(2), 3-7.