

Caracterización preliminar de la jalea de propóleos al 10 % para uso estomatológico

Preliminary Characterization of Propoleos Jelly 10 % for Stomatological Use

MSc. Lourdes Padró-Rodríguez, MSc. Idelsys Chil-Núñez
lpadro@cnt.uo.edu.cu



Facultad Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

● Resumen

El propóleos constituye la base de muchas formulaciones farmacéuticas. El presente trabajo propone la caracterización preliminar de una jalea de propóleos para el tratamiento de la gingivitis. Se realizó un estudio en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Oriente en el periodo marzo-mayo 2013; por medio del empleo del método de incorporación se procedió a la elaboración de la jalea, a la cual se le evaluaron los parámetros de calidad establecidos. Los mismos mostraron una formulación de color pardo tenue, olor típico del propóleos, homogéneo, con brillo, sin grumos ni arenosidad, pH entre 6,26 y 6,28, viscosidad de 0,366 0 Pa.s, área de extendibilidad de 89,80 cm² se observó un flujo pseudoplástico tixotrópico, no hubo crecimiento de microorganismos patógenos. La concentración real media de polifenoles determinada por el método Folin Ciocalteau fue de 8,779 mg/mL. Estos resultados permiten caracterizar, de forma preliminar, la nueva propuesta de formulación.

Palabras clave: propóleos, semisólidos, jaleas, control de calidad.

● Abstract

Propoleos constitutes the base of a lot of pharmaceutical formulations. The present research proposes the preliminary characterization of propoleos jelly for the treatment of the gingivitis. An experimental study was carried out in the pharmaceutical technology laboratory of the Orient University in the months of March to May 2013, the elaboration of the jelly a propoleos jelly was formulated using the incorporating method, and the jelly quality parameters were evaluated. The results revealed a light brownish – gray color, with a typical propoleos smell, homogeneous, sparkly neither non-lumpy nor sandy formulation. The pH oscillated between 6,26 and 6,28, viscosity of 0,366 0 Pa.s, and an extendibility area of 89,80 cm², a thixotropic pseudoplastic flow was observed. No pathogenic microorganism growth was observed. The real concentration of poly-phenols was determined, using the Folin Ciocalteau method, obtaining concentration of 8,779 mg/mL. These results allow the preliminary characterization of the new formulation proposal of.

Keywords: propoleos, semisolids, jellies, quality control.

● Introducción

El empleo de productos naturales en la práctica médica ha tomado un auge vertiginoso en la actualidad. Basado en las ventajas que ofrecen los productos naturales respecto a la aparición de reacciones adversas, y cuestiones económicas, existe la posibilidad de disminuir las problemáticas causadas

por el déficit de medicamentos mediante el empleo de productos como el propóleos.

Este producto natural es muy utilizado en la estomatología por la versatilidad farmacológica que posee. Es ampliamente usado en el tratamiento de enfermedades periodontales, tales como la gingivitis, aftas bucales, estomatitis aftosas, cirugía bucal,

periodontitis, bolsas periodontales, entre otras /1-3/, mostrándose en todos resultados clínicos favorables. Se plantea que puede ser empleado como antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, antioxidante, hepatoprotector, antiulceroso, antitumoral, antisoriásico, analgésico e inmunoestimulante/4,5/.

Hoy en día se han empleado diversos preparados farmacéuticos a base de propóleos en diversas patologías, por ejemplo: la tintura, las cremas, pastas y jaleas. Por ello, y para dar cumplimiento a lo establecido en el Programa Nacional de Medicina Tradicional/6/, el objetivo de la presente investigación es realizar la caracterización física, químico-física y química, de forma preliminar, de la jalea de propóleos al 10 % para uso estomatológico.

Fundamentación teórica

Dado al auge que ha cobrado la prevalencia de enfermedades periodontales, en específico la gingivitis, se hace necesaria la búsqueda de un medicamento de origen natural que ofrezca mayores ventajas en relación con los de origen sintético. En la presente investigación se tiene en cuenta la problemática sobre el uso y accesibilidad de los medicamentos con fines estomatológicos y se propone una nueva formulación. La propuesta de la jalea de propóleos al 10 % se acompaña de un sustento científico-investigativo que avala su utilización en la práctica médica.

● Materiales y métodos

Se realiza un estudio experimental en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica del Departamento de

Farmacia de la Universidad de Oriente, en el periodo comprendido entre los meses marzo y mayo de 2012.

Recolección y procesamiento del material de partida

Se parte de tres lotes de la tintura de propóleos al 30 % suministrada por el Laboratorio de Plantas Medicinales de Santiago de Cuba, identificados con números de lotes: 1001, 1002 y 1003, respectivamente. A los mismos se les realiza por triplicado los correspondientes ensayos de calidad establecidos en la Norma Ramal de la Agricultura para Extractos de Propóleos /7/.

Parámetros evaluados

1. Características organolépticas: color, olor, homogeneidad, transparencia
2. pH
3. Índice de refracción
4. Densidad relativa
5. Sólidos totales
6. Índice de oxidación
7. Análisis capilar
8. Determinación cualitativa de compuestos flavonoides (según la guía de tamizaje fitoquímico, a través de los ensayos con ácido sulfúrico concentrado y Shinoda)
9. Cuantificación de polifenoles totales (ver procedimiento en evaluación de los parámetros de calidad de la jalea)

EQUIPOS Y REACTIVOS UTILIZADOS

Equipo	País	Marca
Balanza técnica	Alemania	Nagema
Peachímetro	Alemania	HANNA PH 211
Balanza analítica	Alemania	SARTORIUS
Espectrofotómetro UV-V	Inglaterra	Ultrospec 1000

Reactivos	País	Marca	Calidad
Glicerina	Cuba	Grupo Empresarial Quimera	Calidad farmacéutica
Carboximetilcelulosa	Cuba	Grupo Empresarial Quimera	Calidad farmacéutica
Propilparabeno	Cuba	Grupo Empresarial Quimera	Calidad farmacéutica
Metilparabeno	Cuba	Grupo Empresarial Quimera	Calidad farmacéutica
Sacarina sódica	Cuba	Grupo Empresarial Quimera	Calidad farmacéutica

Elaboración de la jalea de propóleos

Se parte de estas tinturas para elaborar tres lotes de jaleas (identificados con la misma numeración); se emplea el método de incorporación /8, 9/. No se revelan las cantidades añadidas de los componentes de la crema por encontrarse la misma en proceso de registro.

Composición de la jalea de propóleos

La jalea de propóleos está compuesta por:

- Tintura de propóleos al 30 %
- Carboximetilcelulosa (CMC)
- Glicerina
- Propilparabeno
- Metilparabeno
- Sacarina sódica
- Agua destilada

Caracterización de la jalea de propóleos

Una vez elaborados los tres lotes de jalea se procede a determinar los parámetros de calidad establecidos para este tipo de formulación /9, 10/, con el objetivo de realizar una caracterización preliminar de la misma. Los ensayos se realizan por triplicado y son sometidos a un análisis estadístico empleando el programa Statgraphics versión 5.1 para Windows. Se utilizó un test de Comparación de Media, previa confirmación de que las distribuciones son iguales por el test Kolmogorov-Smirnov y que las desviaciones típicas de las muestras son iguales por el test F.

Parámetros de calidad evaluados a la jalea /9, 10/

1. Características organolépticas: color, olor, textura, aspecto
2. pH
3. Viscosidad
4. Área de extendibilidad
5. Comportamiento reológico
6. Calidad microbiológica
7. Cuantificación de polifenoles

Calidad microbiológica

La calidad microbiológica se realizó según lo establecido en la norma cubana para los medicamentos no estériles /11/, en el laboratorio de Microbiología del Hospital General Juan Bruno Zayas, de Santiago de Cuba.

Cuantificación de fenoles totales en la tintura y la jalea de propóleos

Determinación de fenoles totales

Para la cuantificación de polifenoles se empleó el método de Folin Ciocalteu, el cual es una solución de iones poliméricos complejos formada por los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico. Ellos oxidan los fenoles a fenolatos reduciéndose a un complejo molibdeno-wolframio azul que absorber radiación visible a 700 nm. Los fenolatos solo existen en soluciones alcalinas, pero al ser inestables en este medio tanto los reactivos como los productos de esta reacción, la técnica se desarrolla en un medio ligeramente alcalino, producido por carbonato de sodio y con un exceso de

reactivo de Folin Ciocalteu /12/, se utiliza un blanco reactivo.

Los resultados se expresan como ácido tánico a partir de una curva de calibración obtenida para dicho compuesto en el rango de 2 a 14 ppm (partes por

millón). Se empleó un espectrofotómetro ULTROSPEC 1000 de procedencia inglesa. La ecuación matemática empleada para el cálculo de la concentración de la muestra expresada como ácido tánico es:

$$\text{Conc. de la Muestra} = \text{Conc. de Ac. tánico}^* \times \text{Factor mat. de dilución} \quad (1)$$

* Se refiere al valor de la concentración de ácido tánico obtenida luego de la intrapolación en la curva de calibración del valor de absorbancia obtenido para la muestra.

Para la realización de dicho proceso de cuantificación se realizaron las siguientes operaciones:

Preparación de soluciones

Preparación del reactivo para fenoles (Folin Ciocalteu) /12/

Preparación de la sustancia de referencia (ácido tánico)

1. Tomar 25 g de ácido tánico y llevar a un peso constante en una estufa a 105 °C.

2. Preparación de la solución de ácido tánico al 0,25 mg/mL; pesar 25 mg de ácido tánico y trasvasarlo a un vaso de precipitado de 25 mL. Trasvasar la pesada anterior con ayuda de agua destilada a un frasco volumétrico de color ámbar de 100 mL y enrasar. Homogenizar, rotular y conservar a resguardo de la luz.

3. Preparación de la solución patrón de ácido tánico a 0,05 mg/mL. De la disolución patrón 0,25 mg/mL anterior; tomar con pipeta 20 mL y trasvasar a un volumétrico de color ámbar de 100 mL. Enrasar con agua destilada, homogeneizar, rotular y conservar a resguardo de la luz.

4. Preparación de las soluciones de ácido tánico para la construcción de la curva de calibración. Añadir 2 mL de agua destilada a cada volumétrico de 25 mL y luego las cantidades prefijadas: 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL, 600 µL, 700 µL de la solución de ácido tánico 0,05 mg/mL; agregar 2 mL de solución reactivo para polifenoles y agitar moderadamente; dejar reposar 5 min, añadir 1 mL de la solución de carbonato de sodio al 20 % y remover; se observa una coloración verde violeta, enrasar con agua destilada,

homogenizar, dejar reposar 5 min. Se repite este procedimiento para una solución blanca a la que no se le añade ácido tánico.

Preparación de las muestras de ensayo de la tintura, jalea de propóleos y la base de la jalea

Preparación de las muestras para la tintura de propóleos. Se tomó 0,15 mL de tintura de propóleos y se diluyó en 50 mL de etanol al 96 %, el volumen se completó con agua destilada en un volumétrico de 100 mL. Esta solución se filtra y se enrasa el volumétrico nuevamente a 100 mL.

Preparación de las muestras de la jalea de propóleos. Se tomó 1 g de la jalea (el equivalente a 0,15 mL de la tintura) y se disolvió en 50 mL de etanol al 96 % y se filtró al vacío. El filtrado se completa con agua destilada en un volumétrico de 100 mL y el residuo se desechó.

Preparación de las muestras de la base de la jalea. Se procedió de igual manera que la desarrollada para la jalea medicinal de propóleos.

Técnica operatoria

En un volumétrico de 25 mL se añaden:

- X mL de la muestra
- 2 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu; agitar y dejar reposar por 5 min.
- Añadir 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20 %, agitar y enrasar volumétrico con agua.

Esperar 5 min y realizar medición contra blanco de reactivos a 700 çm.

Los volúmenes X para cada muestra corresponden a 3 mL para las soluciones preparadas para la tintura y la jalea de propóleos, y 10 mL para la solución preparada para la base de la jalea.

Determinación de las concentraciones de fenoles totales en la tintura, jalea y base de la jalea

Las absorbancias de las muestras preparadas se miden a 700 nm en un espectrofotómetro marca ULTROSPEC 1000 de procedencia inglesa, su concentración se calcula por el empleo de la ecuación 1.

La concentración equivalente a ácido tánico se obtiene por intrapolación en la curva de calibración de la absorbancia medida en cada caso. El factor matemático de dilución hace referencia al número de veces que la muestra debió ser diluida para que sus valores de absorbancia cayeran en el rango de la curva de calibración.

Sobre la base de que la jalea de propóleos está constituida por la base de la jalea y la tintura de propóleos, entonces se considera que la concentración real de fenoles totales del propóleos en la jalea (CRFTP) es igual a la diferencia entre la concentración obtenida para la misma (CFCM) y la obtenida para la base de la jalea (CFEB), tal y como se expone en la siguiente ecuación:

$$CRFTP = CFCM - CFEB \quad (2)$$

Con los resultados obtenidos en la anterior ecuación se determina el porcentaje de recuperación del principio activo (tintura de propóleos) en la jalea, empleando como criterio base el hecho de que en el gramo de la jalea usado para la determinación de los fenoles totales se debe encontrar la misma concentración que la obtenida para la tintura. Este porcentaje de recuperación se calcula empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de recuperación} = CRFTP / CFEB * 100 \quad (3)$$

donde:

CRFTP corresponde a la concentración real de fenoles totales del propóleos en la jalea.

CFEB corresponde a la concentración de fenoles totales en la jalea.

● Resultados y discusión

Evaluación de la calidad de las tinturas de propóleos

Los resultados de los parámetros de calidad evaluados a los tres lotes de tintura se muestran en la tabla 1. Los parámetros evaluados cumplen con lo establecido en la norma /7/. El color y el olor observados son propios del propóleos.

Al analizar los valores de pH obtenidos para cada tintura se puede ver que oscilan desde 5,6 hasta 5,9; lo que estadísticamente no denota diferencias significativas. Estos valores indican el carácter ácido débil de la tintura, atribuible a la presencia de compuestos acídicos en el propóleos /13/, principalmente del tipo fenólicos, lo que se corresponde con los valores reportados en la norma (4,16 a 5,16) /7/. Estos resultados demuestran que la tintura puede ser utilizada en la preparación de formulaciones para uso estomatológico /2, 3/, ya que los mismos se acercan al pH de la cavidad bucal, el cual oscila entre 5,8 y 7,6 /14/.

Atendiendo a los valores de índice de refracción se plantea que los mismos indican la presencia de sustancias en el medio, como producto del método de extracción aplicado para la obtención de las tinturas, y superan los valores reportados en la norma (1,366) /7/, lo que puede atribuirse a la diferencia en cuanto a composición del propóleos bruto (materia prima), que puede variar por diferentes factores, como la zona de recolección, la época del año, etcétera /6/.

La densidad relativa obtenida oscila desde 0,855 hasta 0,860 g/cm³, estos valores se encuentran en el rango de los valores reportados en la norma (0,831 a 0,889) /7/, lo que permite inferir que la tintura cumple con este parámetro, el cual indica la cantidad de sólidos presentes en un determinado volumen. Los valores de sólidos totales (3,2 a 3,5 %) confirman la

presencia de sólidos en la solución, los cuales pueden ser metabolitos activos o no, lo que indica, a su vez, que el método de extracción es adecuado; dichos

valores se encuentran dentro de los límites establecidos en la norma (2,8-3,8 %) /7/ para los tres lotes analizados.

TABLA 1. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD EVALUADOS EN LAS TINTURAS

Parámetros de calidad evaluados	Resultados obtenidos		
	Lote I	Lote II	Lote III
Características organolépticas	En los tres lotes se observó un líquido transparente homogéneo, de color ámbar y olor característico propio del propóleo		
pH	5,9 ± 0,002 1	5,8 ± 0,001 7	5,6 ± 0,001 5
Índice de refracción	1,385 ± 0,013	1,380 ± 0,022	1,384 ± 0,001 1
Densidad relativa (g/cm ³)	0,859 ± 0,001 6	0,855 ± 0,001 8	0,860 ± 0,000 9
Sólidos totales (%)	3,5 ± 0,002 5	3,2 ± 0,003 1	3,4 ± 0,002 9
Índice de oxidación (s)	13 ± 0,001 0	12 ± 0,001 2	12 ± 0,001 6
Análisis capilar	Se aprecia zona regularmente dentada en la franja, con coloración pardo rojizo que se decolora en la sub.-franja a color hueso, en la banda se observa color pardo en la zona central que se decolora en sus bordes a rojo-verdoso y se decolora a color hueso más intenso en la sub.-banda		
Determinación cualitativa de compuestos flavonoides	Acido sulfúrico: (evidencia positiva) Shinoda: (evidencia positiva)		

El índice de oxidación calculado como el tiempo que demora en decolorar una solución de permanganato de potasio oscila entre 12 y 13 s, o sea, se encuentra por debajo del límite establecido en la norma (22 s) /7/, lo que pudiera atribuirse a la mayor cantidad de impurezas presentes en el propóleo bruto y la efectiva extracción de los compuestos antioxidantes presentes, resultados que corroboran la calidad de la tintura elaborada. Los resultados del análisis capilar fueron los mismos para los tres lotes de tinturas, se observa una zona regularmente dentada en la franja, con coloración pardo-rojiza que se decolora en la sub-franja a color hueso. En la banda se observa color pardo en la

zona central que se decolora en sus bordes a rojo-verdoso, y se decolora a color hueso más intenso en la sub-banda.

En cuanto a la determinación cualitativa de compuestos flavonoides, se obtuvo respuesta positiva en los dos ensayos realizados, se coincide con numerosos autores que plantean que este tipo de compuesto está presente en algunos propóleos en pequeñas cantidades, y depende de la zona geográfica de donde el mismo provenga /15-17/. La presencia de estos compuestos en el propóleo es de gran importancia por sus propiedades antioxidantes, antisépticas, antimicrobianas y antiinflamatorias /17/.

TABLA 2. RESULTADOS DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD EVALUADOS EN LA JALEA DE PROPÓLEOS AL 10 %

Parámetros de calidad evaluados	Resultados obtenidos		
	Lote I	Lote II	Lote III
Características organolépticas	Color pardo tenue, olor típico del propóleo, homogéneo, con brillo, sin grumos ni arenosidad		
pH	6,28	6,26	6,27
Viscosidad (Pa.s)	0,366 0	0,365 8	0,366 0
Área de extendibilidad (cm ²)	89,80	89,80	89,81
Comportamiento reológico	Se observó un flujo pseudoplástico tixotrópico		
Calidad microbiológica	No existió crecimiento de microorganismos patógenos		

Los resultados obtenidos en la determinación de los parámetros de calidad de la jalea de propóleos (tabla 2) no pueden ser comparados, pues no existe una norma, de ahí que sean considerados como punto de partida para estudios posteriores, y se tomen como valores preliminares.

Los resultados de la evaluación de las características organolépticas son los mismos para los tres lotes analizados. Se obtuvo una jalea de color pardo tenue, de olor típico, correspondiente a la tintura de propóleos empleada en su elaboración, de aspecto homogéneo, con brillo, sin grumos ni arenosidad. Estos resultados denotan una formulación que cumple con dicho requisito y, por ende, es aceptada para su uso.

Toda formulación debe presentar un pH de acuerdo con el pH fisiológico de la zona donde será aplicada /10/. Teniendo esto en cuenta, se puede decir que los valores de pH obtenidos (6,26–6,28) para la jalea, reflejan un valor óptimo

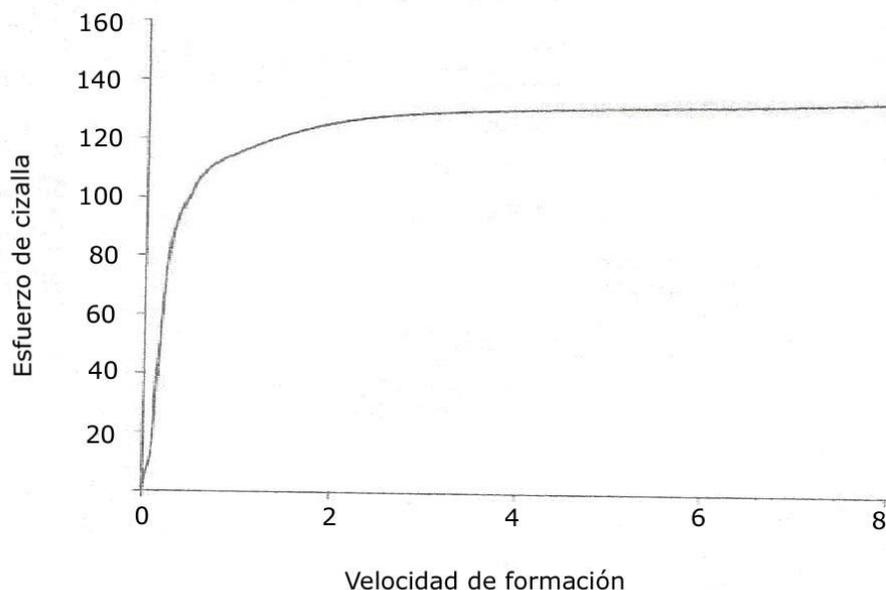
para el sitio de acción según el uso previsto (cavidad bucal 5,8 hasta 7,6) /14/. Dicho valor es atribuible a la composición química de la tintura, la cual le infiere las características ácidas observadas en la misma. La viscosidad y área de extendibilidad son parámetros determinantes para este tipo de formulación /8-10/; los valores mostrados permiten aceptar la formulación para su uso estomatológico.

Para la viscosidad se reportan valores desde 0,365 8 hasta 0,366 0 Pa.s, acordes con lo reportado en la bibliografía /8-10/.

En cuanto al área de extendibilidad se obtuvo un valor de 89,80–89,81 cm². Este valor se considera óptimo para la formulación según lo reportado en la bibliografía /8-10/.

Por otra parte, se plantea que la formulación cumple con la calidad microbiológica para productos no estériles, puesto que se observa que en la misma no existió crecimiento de microorganismos patógenos según lo establecido en la norma /7/.

A continuación se muestra el reograma obtenido:



Cuantificación de fenoles totales

La curva de calibración con ácido tánico desarrollada para la determinación de esta variable se realizó con los valores de absorbancia que aparecen recogidos en la tabla 3.

TABLA 3. RESULTADOS DE LOS VALORES DE ABSORBANCIA PARA EL ÁCIDO TÁNICO

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4
Valores de absorbancia	0,175	0,265	0,352	0,454	0,528	0,622
	0,180	0,267	0,354	0,458	0,530	0,624
	0,181	0,269	0,356	0,459	0,532	0,627

La recta y los parámetros estadísticos que la describen son los siguientes:

$$\text{Abs.} = -0,007\ 352\ 38 + 0,044\ 576\ 2 * \text{Conc} \quad (4)$$

$$r^2 = 99,871\ 5 \quad F = 124\ 37,93 \quad p = 0,000\ 0 \quad p. \text{ intercepto} = 0,074\ 1$$

Como reflejan los estadígrafos de la recta, la curva de calibración obtenida cumple con los principales requisitos de aceptación, expresa un 99,871 5 % de la variabilidad y exhibe un intercepto que contiene el cero con un 95 % de confianza (-0,015 509 0,000 804 199).

TABLA 4. VALORES DE ABSORBANCIA, CONCENTRACIÓN EQUIVALENTE $\mu\text{G}/\text{ML}$ Y CONCENTRACIÓN TOTAL MG/ML DE LA TINTURA DE PROPÓLEOS

Lotes	Absorbancia	Concentración equivalente	Concentración total
Lote 1	0,468	1,066 4	8,887
Lote 2	0,466	1,061 9	8,849
Lote 3	0,471	1,073 1	8,942

Para la base de la jalea se obtuvo una absorbancia igual a cero, lo que indica que ninguno de sus componentes reacciona con el reactivo de Folin Ciocalteu. Los valores de

absorbancia, concentración equivalente $\mu\text{g}/\text{mL}$ y concentración total mg/mL para la tintura y jalea de propóleos se muestran en las tablas 4 y 5 respectivamente.

TABLA 5. VALORES DE ABSORBANCIA, CONCENTRACIÓN EQUIVALENTE $\mu\text{G}/\text{ML}$ Y CONCENTRACIÓN TOTAL MG/ML DE LA JALEA DE PROPÓLEOS

Lote 1			Lote 2			Lote 3		
Abs	[Eq.]	[Tot]	Abs	[Eq.]	[Tot]	Abs	[Eq.]	[Tot]
0,447	1,093	8,494	0,445	1,014	8,457	0,439	1,023	8,532

Como criterio final y sobre la base de considerar el hecho de que, de ser esta una jalea homogénea, en 1 g de la misma existirá un equivalente a 0,15 mL de la tintura, se realiza un análisis de la marcha separativa considerando que la concentración de propóleos que se debe obtener en la jalea preparada ha de ser la misma que la obtenida para la tintura. El valor medio de la concentración de la tintura obtenido es de 8,893 mg/mL que se emplea en el cálculo del porcentaje de recuperación: ecuación 3 descrita en el capítulo de materiales y métodos, se obtiene una concentración real media de 8,779 mg/mL para un 98,72 % de recuperación, este valor se considera aceptable para un proceso de separación y cuantificación química en formulaciones farmacéuticas.

Atendiendo a los resultados obtenidos en cada parámetro evaluado, se plantea que los mismos permiten caracterizar de forma preliminar la nueva propuesta de formulación;

no constituyen resultados concluyentes, sin embargo representan un punto de partida para posteriores investigaciones.



Conclusiones

Se realizó la caracterización, de forma preliminar, de la jalea de propóleos al 10 % para uso estomatológico.



Bibliografía

1. QUINTANA DÍAZ, J. C. "El uso de la propolina al 8 % en el tratamiento de la alveolitis". *Revista Cubana de Estomatología*. 1992, 2, p. 93-97.
2. MARTÍNEZ, G.; ALFONSO, E.; ORTEGA, L.; GOU GODOY, A. "Efectos curativos de una solución hidroalcohólica del propóleo cubano en la terapéutica paradontal". *Revista Cubana de Estomatología*. 1992, 1, p. 14-19.
3. LEÓN GARCÍA, C.; GARCÍA, E. "Efectos del propóleos en el tratamiento de aftas bucales". *Revista Cubana Med. Milit.* 1993, 22, p. 42-45.

4. GEBARA, E. C., *et al.* "Propolis Extract as an Adjuvant to Periodontal Treatment". *Oral Health Prev Dent.* 2003, 1, p. 29-35.
5. SAMET, N., *et al.* "The Effect of Bee Propolis on Recurrent Aphthous Stomatitis: a Pilot Study". *Clin Oral Investig.* 2011, 11, p. 143-146.
6. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA: "Área de docencia e investigación". En: *Guías metodológicas para la investigación en Plantas Medicinales.* La Habana: Dirección de Ciencia y Técnica, 1997. p. 10-15.
7. MINISTERIO DE LA AGRICULTURA. *Norma Ramal de Agricultura.* Extractos de Propóleos. Especificaciones. NRAG 1129. La Habana, Ministerio de la Agricultura, 1994.
8. UGARTE REYNA, R. *Tecnología de la producción de preparados farmacéuticos semisólidos.* La Habana: Editorial Científico Técnica, 1985.
9. IRAIZOZ COLARTE, A.; BILBAO REVOREDO, O.; BARRIOS ÁLVAREZ, M. A. "Cap II". En: *Conferencias de Tecnología Farmacéutica II.* La Habana: MES, 1990. p. 58-59.
10. VILAJATO, J.L. *Fundamentos de Tecnología Farmacéutica.* Madrid: Editorial Síntesis, 2001.
11. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. *Medicamentos. Medicamentos no estériles. Determinaciones microbiológicas.* NC 26-121. 1993.
12. British Pharmacopeia Commission. *British Pharmacopeia CD ROM.* London, May 2000. ISBN 0 11 322320 X.
13. LEA, A. *The Wittenham Hill Cider Portal.* Tannin in Cider Apples. [abril 2012]. Disponible en: <<http://www.cider.org.uk/tannin.html>>.
14. SWARBRICK, J. *Drug Delivery to the Oral Cavity.* North Carolina: Ed. Taylor & Francis Group, LLC, 2011.
15. VARGAS, M. "El propóleos. Antibiótico natural". *Rev. La Guía.* 2012, 4, 2, p. 129-136.
16. DÍAZ, N. "Estudios preliminares de la composición química del propóleos de Holguín: fracción A₁". Tesis de Diploma. IFAL. Universidad de La Habana, La Habana, 2012.
17. SELFERT, M.; HASLINGER, E. "Constituyentes del propóleos". *Liebigs Annalen der Chemie.* 2011, 27, p. 93-97.