
**CARACTERIZACIÓN ANTIMICROBIANA Y FISICOQUÍMICA
DE PROPÓLEOS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)
DE LA REGIÓN ANDINA COLOMBIANA**

**Antimicrobial and Physico-Chemical Characterization of Propolis of
Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) from the Colombian Andes**

ESTHER MARGARIDA ALVES FERREIRA BASTOS¹, B.Sc., Ph. D.;
DAVID GUZMÁN², Médico Veterinario; JUDITH FIGUEROA²,
Microbióloga, M.Sc.; JORGE TELLO², Zootecnista, Ph. D.;
DENISE DE OLIVEIRA SCOARIS¹, Microbióloga, M.Sc.

¹ Laboratorio de Recursos Vegetales y Opoterapéuticos/Director de
Investigación y Desarrollo/Fundación Ezequiel Dias, Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brasil. embastos@funed.mg.gov.br

² Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

Presentado 21 de abril de 2009, revisión noviembre 2 de 2009, aceptado 5 de mayo de 2010, correcciones 8 de julio de 2010.

RESUMEN

El propóleo es un material resinoso producido por las abejas a partir de diversos materiales vegetales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar muestras de propóleos de *Apis mellifera* provenientes de la región Andina colombiana respecto a su perfil antimicrobiano y fisicoquímico. Fueron empleados extractos etanólicos de propóleos por la técnica de disco-difusión, frente a las especies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Para la caracterización fisicoquímica se evaluaron el porcentaje de extracto seco, contenido de cera, índice de oxidación y determinación cuantitativa de compuestos fenólicos y flavonoides. Todas las muestras presentaron actividad antibacteriana, con halos de inhibición comprendidos entre 8 y 12 mm para *E. coli* y entre 8,3 y 23,5 mm para *S. aureus*. No se observó ninguna actividad contra *C. albicans*. Los parámetros fisicoquímicos citados anteriormente presentaron una variación de 2,72 a 9,17%, 0 a 2%, 3 a 51s, 0,1 a 0,5 (p/p) y 0,02 a 0,95 (p/p), respectivamente. El perfil antimicrobiano observado, relacionado al fisicoquímico, sugiere la necesidad de nuevos estudios para la determinación del origen botánico y geográfico de las muestras estudiadas.

Palabras clave: propóleo, perfil antimicrobiano, perfil fisicoquímico.

ABSTRACT

Propolis is a resinous material produced by bees from various plant sources. The objective of this study was to characterize propolis samples of *Apis mellifera* from the Colombian Andean region, regarding the antimicrobial and physicochemical profiles. We used the technique of disk diffusion with ethanol extracts of propolis against *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus and *Candida albicans*. The physicochemical characterization included percentage of solids content, wax, oxidation index and quantitative determination of phenolic and flavonoids compounds. All samples showed antibacterial activity, with inhibition zones between 8,0 and 12,0 mm for *E. coli* and between 8,3 and 23,5 mm for *S. aureus*. We did not observe any activity against *C. albicans*. The physical and chemical parameters cited above showed a variation from 2.72 to 9.17%, 0 to 2%, 3 to 51 s, 0.1 to 0.5 (w/w) and 0.02 to 0.95 (p/p), respectively. The antimicrobial profile observed, related to the physicochemical profile, suggests the need for further studies to determine the geographical and botanical origin of the samples studied.

Key words: Propolis, antimicrobial profile, physical-chemical profile.

INTRODUCCIÓN

Gran parte de las civilizaciones antiguas, como la Inca, China, Tibetana, Egipcia y Grecoromana empleaban los productos de abejas en sus terapias milenarias, como recursos medicinales valiosos en la cura o prevención de enfermedades. Historias de estas civilizaciones contienen innumerables menciones a estos productos, destacándose el propóleo, utilizado por su actividad antimicrobiana reconocida como antiséptico bucal y cicatrizante (Ghisalberti, 1979).

Este producto resinoso es producido por abejas a partir de diversas partes de plantas como brotes, botones florales, corteza y exudados resinosos. Estos constituyentes son biotransformados por la adición de cera y por acción de la enzima 1,3-glicosidasa, producida en las glándulas salivares de abejas (Ghisalberti, 1979; Park *et al.*, 1997). Las abejas depositan propóleo en las colmenas, donde tiene papel importante para cerrar rendijas, mantener la temperatura interna estable, recubrir el cuerpo de animales muertos dentro de la colmena y en la protección contra la proliferación de microorganismos (Ghisalberti, 1979).

La composición exacta del propóleo puro varía de acuerdo con la región, planta proveedora de resina y especie de abeja recolectora, reflejando la diversidad de actividades biológicas que este producto presenta (Ghisalberti, 1979). La constitución química básica es una mezcla de ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales y polen, destacándose la presencia de compuestos bioactivos tales como ácido cinámico, compuestos fenólicos y flavonoides (Ghisalberti, 1979; Bankova *et al.*, 1987; Arvouet-Grand, 1993), terpenos, ácidos aromáticos, derivados del ácido cafeico, ácidos grasos y aminoácidos (Pereira *et al.*, 2002).

Las actividades biológicas para este producto natural incluyen actividad hepatoprotectora (Banskota *et al.*, 2001), antitumoral (Scheller *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1992), inmunomoduladora (Ivanovska *et al.*, 1995), regenerativa, cicatrizante (Scheller *et al.*, 1977; Arvouet-Grand, 1993), anestésica (Prokopovich *et al.*, 1956; Ghisalberti, 1979), antioxidante (Banskota *et al.*, 2001) y antimicrobiana (Brumfitt *et al.*, 1990; Aga *et al.*, 1994). La actividad antimicrobiana está relacionada con la presencia de compuestos flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres (Marcucci, 1995), evidenciada *in vitro* frente a varios linajes de bacterias Gram positivas y negativas (Marcucci, 1996), y también frente a hongos filamentosos (Burdock, 1998) y levaduras (Martins, 2002; Metzner *et al.*, 1977).

El interés global en las investigaciones con propóleo sobreviene por su gama amplia de actividades biológicas y potencial terapéutico. En América Latina los estudios con este valioso producto apícola se han concentrado en muestras de origen brasilero, aunque diversos países latinos lo producen y comercializan. Hay, sin embargo, algunos estudios con muestras de propóleos provenientes de Argentina (Chaillou *et al.*, 2004; Chaillou y Nazareno, 2006; Chaillou y Nazareno, 2009a; Chaillou y Nazareno, 2009b) y algunas investigaciones realizadas con muestras de propóleo colombiano (Moreno *et al.*, 2007), demostraron actividad antibacteriana positiva de las muestras de propóleos argentinos, colombianos y cubanos frente a *Streptococcus mutans*. Salamanca *et al.*, 2001, analizaron la composición fisicoquímica de 18 muestras de propóleo de diferentes regiones colombianas sin relacionarla con la actividad biológica de las muestras. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las muestras de propóleo provenientes de la región Andina colombiana respecto a su perfil antimicrobiano y físico-químico.

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN Y RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEO

En el periodo de enero del 2001 a agosto del 2002 fueron recolectadas 16 muestras de propóleos obtenidas por raspado de la parte interior de las colmenas, en cantidades variables, de los siguientes departamentos de la región Andina colombiana: Valle del Cauca (seis muestras), Risaralda (1), Cundinamarca (1), Boyacá (2), Huila (2), Santander (2) y Quindío (2). Todas las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas con cierre hermético, identificadas y enviadas para análisis en el laboratorio de recursos vegetales y opoterapéuticos, Dirección de Investigación y Desarrollo, Fundación Ezequiel Dias, MG, Brasil. Todas las muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el inicio de los análisis de laboratorio.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROPÓLEO

Los ensayos microbiológicos y físico-químicos fueron realizados con extractos etanólicos de propóleo. Alícuotas de 30 g de propóleo bruto fueron adicionadas a 100 mL de alcohol 70% PA, siendo mantenidas en maceración, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, al abrigo de luz, por 14 días. Después de este periodo, las muestras fueron filtradas con papel filtro cualitativo y almacenadas en frascos de color ámbar, a temperatura ambiente (Sforcin, 1996).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Microorganismos. La actividad antimicrobiana de las muestras de propóleos fue evaluada frente a los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Candida albicans* ATCC 36802, cepas patrón, provenientes del laboratorio de microorganismos de referencia del Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud-INCQS-FIOCRUZ, Brasil. Las cepas bacterianas fueron mantenidas en tubos de agar Mueller Hinton (AMH) y la levadura, en tubos de agar Sabouraud (AS), ambos inclinados, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, con subcultivos (repiques) periódicos cada 20 días.

Actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar. Después de la activación de las bacterias en caldo Mueller Hinton y de la levadura en caldo Sabouraud, se establecieron las concentraciones estándar de las suspensiones bacterianas a $1-2 \times 10^8$

UFC/mL y la fúngica, a $1-2 \times 10^6$ UFC/mL, en solución salina estéril, correspondiente a turbidez 0,5 de la escala de MacFarland. A continuación se realizaron dos diluciones seriadas 1:10, obteniéndose así las suspensiones de trabajo bacterianas con 1×10^6 UFC/mL y la fúngica con 1×10^4 UFC/mL.

Las suspensiones de trabajo fueron inoculadas en placas de AMH (para bacterias) y AS (para levadura), en tres direcciones, descrito por el CLSI M27-A6, 2003 y CLSI M27-A2, 2003, con modificaciones. Después de absorción completa del inóculo por el agar, este fue perforado con asa estéril invertida, obteniéndose orificios. A los orificios fueron adicionados discos de papel (*blank disc*), y sobre estos, 40 μ L de los extractos. Las placas fueron dejadas en reposo, hasta absorción completa del extracto por el agar, en seguida, las mismas fueron incubadas de forma invertida, a 37 °C, por 24 y 48 horas, para bacterias y levadura, respectivamente. El experimento fue realizado por triplicado y la actividad antimicrobiana fue considerada positiva, cuando se detectó el desarrollo de un halo de inhibición circundando el orificio en las diferentes muestras de extractos de propóleo. Los halos fueron medidos en milímetros, con paquímetro.

INDICADORES DE CALIDAD FISICOQUÍMICAS

Para realizar la caracterización fisicoquímica de las muestras de propóleos, fueron evaluados los siguientes parámetros: determinación de extracto seco, contenido de cera, índice de oxidación y determinación cuantitativa de compuestos fenólicos y flavonoides, según la metodología descrita por Asís, 1989, Bastos; 2001 y MAPA, 2001. Los resultados fueron evaluados de acuerdo con las normas brasileñas que regulan la identidad y calidad de propóleos, ya que no hay una legislación colombiana para estos parámetros. Con el objetivo de verificar si los parámetros estaban correlacionados entre sí, se consideraron en conjunto todos los datos referentes a actividad antimicrobiana y caracterización fisicoquímica de las muestras. Se utilizó el test de correlación de Pearson al nivel de significancia de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las muestras de propóleos evaluadas presentaron actividad antibacteriana positiva frente a *S. aureus*, con halos de inhibición comprendidos entre 8,3 y 23,5 mm (Tabla 1). El 81,25 % de las muestras presentaron halos de inhibición mayores o iguales a 12 mm.

Datos semejantes fueron encontrados por Kujumgiev *et al.*, 1999, en un estudio de la actividad antimicrobiana del propóleo de diferentes países, donde se encontraron halos de inhibición entre 11 y 29 mm para *S. aureus*. Marcucci *et al.*, 2001, en un trabajo sobre la actividad farmacológica de diferentes fracciones de extracto metanólico de propóleo brasileiro, observaron halos de inhibición mayores a 12 mm para el mismo microorganismo. En investigaciones anteriores sobre la actividad antibacteriana de propóleo contra a *E. coli* se han encontrado halos entre 8 y 12 mm (Marcucci *et al.*, 2001) o bien, ninguna actividad (Kujumgiev *et al.*, 1999). En el presente estudio fue posible demostrar actividad antibacteriana en el 75% de las muestras de propóleo frente a *E. coli*, con halos de inhibición entre 10,5 y 18,5 mm (Tabla 1). El 83,34% de las muestras tenían halos de inhibición mayores o iguales a 12 mm, indicando el potencial antibacteriano frente

Muestras de Propóleo	Porcentaje de Extracto seco (%)	Índice de Oxidación (s)	Porcentaje de Cera (%)	Índice de Fenólicos (p/p)	Índice de Flavonoides (p/p)	Actividad <i>S. aureus</i>	Actividad Antimicrobiana <i>E. coli</i>	Actividad Antimicrobiana (mm) <i>C. albicans</i>
1	4,27	3,00	0	0,10	0,04	12,4	12,0	0
2	5,28	3,00	0	0,20	0,12	17,0	14,0	0
3	5,02	30,0	0	0,20	0,10	20,0	14,5	0
4	4,53	2,00	0	0,20	0,14	13,0	14,0	0
5	3,24	28,0	0	0,20	0,02	8,30	0	0
6	5,25	40,0	0	0,20	0,08	17,3	15,0	0
7	2,72	19,0	0	0,10	0,02	10,3	0	0
8	4,36	22,0	0	0,20	0,06	14,0	10,5	0
9	5,44	6,00	0	0,30	0,06	12,0	0	0
10	9,17	51,0	1,00	0,20	0,09	21,4	15,0	0
11	6,31	9,00	2,00	0,20	0,14	14,7	12,0	0
12	5,00	23,0	0	0,20	0,14	14,0	10,5	0
13	4,04	20,0	0	0,50	0,95	18,4	14,5	0
14	6,37	3,00	0	0,40	0,32	21,7	16,5	0
15	3,10	40,0	0	0,10	0,02	10,0	0	0
16	3,52	20,0	0	0,20	0,08	23,5	18,5	0
Desviación Estándar	1,57	15,16	0,54	0,10	0,23	4,57	6,54	0
Legislación brasileña*	Mínimo de 11%	Máximo de 22 s	Máximo de 1% ES	Mínimo de 0,5 %	Mínimo de 0,25 %	-	-	-

Tabla 1. Indicadores de calidad fisicoquímica y actividad antimicrobiana de muestras de propóleo de la región Andina colombiana. * Parámetros establecidos por la legislación brasileña: Ministerio de Agricultura y Abastecimiento, Instrucción Normativa n.º 3, del 19 de enero de 2001.

a Gram-negativos del propóleo producido en Colombia. A diferencia del propóleo colombiano, el propóleo verde brasileiro, ampliamente estudiado respecto a sus características fisicoquímicas y microbiológicas, no presentó actividad antibacteriana frente a *E. coli* (Marcucci *et al.*, 2001, Bankova *et al.*, 1999). Aunque las muestras de propóleo colombianas presentaron actividad antibacteriana interesante, eliminando bacterias Gram positivas y negativas, no se detectó ninguna actividad frente a la levadura *C. albicans*. Las diferentes actividades biológicas observadas en este trabajo, en comparación con otros propóleos, probablemente se deban a variabilidad en la composición química de las muestras, en función de su origen geográfico y botánico (Bankova *et al.*, 2000), sugiriendo que las muestras evaluadas pueden presentar otras clases de compuestos químicos responsables por la actividad demostrada. Probablemente, el mecanismo de acción selectiva demostrado por estas muestras de propóleo frente a bacterias explica la inactividad frente a levaduras.

La actividad antimicrobiana de propóleo está íntimamente relacionada a los compuestos químicos que lo constituyen (Aga *et al.*, 1994), siendo atribuida a la presencia de compuestos flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, así como aldehídos fenólicos y cetonas (Marcucci, 1996; Castaldo y Capasso, 2002), a través de inhibición de la enzima RNA polimerasa (Bosio *et al.*, 2000) o actividad sobre la estructura química de la pared celular (Marcucci *et al.*, 2001). A pesar de existir numerosos antecedentes de correlación entre actividad biológica de propóleo y composición química, en el presente estudio no se encontró una correlación positiva entre la actividad antibacteriana y el índice de compuestos fenólicos y flavonoides, al nivel de significancia de 5% ($p < 0,05$). Además de la actividad antimicrobiana, a los compuestos fenólicos y flavonoides se les atribuye el potencial antioxidante del extracto, vinculado a un manejo adecuado del producto, es decir, propóleos con altos índices de compuestos fenólicos y flavonoides y un buen manejo presentan bajos índices de oxidación, mientras que propóleos almacenados inadecuadamente, con altas temperaturas, presentan altos índices de oxidación. Los índices de oxidación determinados en las muestras analizadas variaron de 2 a 51 segundos, con el 37,5% de las muestras presentando índices mayores a 22 segundos (Tabla 1), valor establecido por la legislación brasileira como límite para propóleo verde (MAPA, 2001).

El porcentaje máximo de cera en propóleo verde, definido por el Ministerio de Agricultura, es de 1% (p/p; MAPA, 2001). La gran mayoría de muestras evaluadas no presentó cera, probablemente debido a la fuente de resina utilizada por las abejas (Tabla 1), lo que indica una diferencia con otros propóleos estudiados (Bastos, 2001; Pardo, 2007; Silva *et al.*, 2006). El extracto seco de las muestras evaluadas varió de 2,72 a 9,17 %, valores bajos comparados con extractos de propóleo verde de Brasil, que presentan valores mayores o iguales a 11% (Bastos, 2001; Pardo, 2007). Fue posible evidenciar correlación positiva significativa entre el porcentaje de extracto seco y la actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, correlación no observada en la actividad antibacteriana frente a *E. coli*.

CONCLUSIÓN

Propóleos producidos en la región Andina colombiana presentaron actividad antimicrobiana significativa contra *S. aureus* y *E. coli*, pero no se detectó ninguna actividad

frente a *C. albicans*. El perfil antimicrobiano relacionado al fisicoquímico de las muestras evaluadas sugiere la necesidad de nuevos estudios para la determinación de su composición química y origen botánico. Propóleos colombianos tiene potencial para su uso en el desarrollo de nuevos productos terapéuticos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a tres evaluadores anónimos por los comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- AGA H, SHIBUYA T, SUGIMOTO T, KURIMOTO M, NAKAJIMA S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994;58(5):945-946.
- ARVOUET-GRAND A. Extrait de propolis: II. Etude de cicatrization de plaies chez le lapin et chez le rat. *J Pharm Belg.* 1993;48(3):171-178.
- ASÍS M. Propoleo, el oro purpura de las abejas: Norma Ramal Cubana sobre Especificaciones de Calidad del Propoleo. Centro de Información y Documentación Agropecuario, Havana, Cuba; 1989. p. 127-162.
- BANKOVA V, POPOVS, MAREKOV NL. High performance liquid chromatographic analysis of flavonoides from propolis. *J Chromatogr.* 1987;242:135-143.
- BANKOVA V, CASTRO S MARCUCCI MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 2000;31:3-15.
- BANKOVA V, BOUDOUROVA-KRASTEVA G, SFORCIN JM, FRETE X, KUJUMGIEV A, MAIMONI-RODELLA R, POPOV S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazillian propolis from São Paulo state. *Z Naturforsch C.* 1999;54(c):401-405.
- BANSKOTA AH, TEZUKA Y, ADNYANA IK, ISHII E, MIDORIKAWA K, MATSUSHIGE K, KADOTA S. Hepatoprotective and anti-helicobacter pylori activities of constituents from Brazillian propolis. *Phytomedicine.* 2001;8(1):16-23.
- BASTOS EMAF. Origem Botânica e Indicadores de Qualidade da Própolis Verde Produzida em Minas Gerais. (Tesis Doctoral). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2001.
- BOSIO K, AVANZINI C, D'AVOLIO A, OZINO, O e SAVOIA D. *in vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 2000;31:174-177.
- BRUMFITT W, HAMILTON-MILLER JMT, FRANKLIN I. Antibiotic activity of natural products. *Microbios.* 1990;62:19-22.
- BURDOCK GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998;36:347-363.
- CASTALDO S, CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 2002;73(1):S1-S6.
- CHAILLOU L, NAZARENO M. A New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J Agric Food Chem.* 2006;54:8397-8402.
- CHAILLOU L, HERRERA H, MAIDANA J. Estudio del propoleos de Santiago del Estero, Argentina. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2004;24(1):11-15.

CHAILLOU L, NAZARENO M. Chemical variability in propolis composition related to the arboreal environment as the sources of resins. *J Sci Food Agric*. 2009(a);89:978-983.

CHAILLOU L, NAZARENO M. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related with the variability in their chemical composition. *J Food Sci*. 2009(b);42:1422-1427.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Método de Referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica; norma aprovada – segunda edição. NCCLS document M27-A2; 2003.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: norma aprovada–sexta edição. NCCLS document M27-A6; 2003.

GHISALBERTI EL. Propolis: a review. *Bee world*. 1979;60(2):59-84.

IVANOVSKA ND, DIMOV VB, BANKOVA VS, POPOV SS. Immunomodulatory action of propolis IV: Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo. *J Ethnopharmacol*. 1995;47(3):145-147.

KUJUMGIEV A, TSVETKOVA I, SERKEDJIEVA Yu, BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999;64:235-240.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, BRASIL. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001, Anexo VII: Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis; 2001.

MARCUCCI MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidology*. 1995;26:83-99.

MARCUCCI MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim Nova*. 1996;19(5):529-535.

MARCUCCI MC, FERRERES F, GARCÍA-VIGUERA C, BANKOVA VS, CASTRO SL, DANTAS AP, PHM VALENTE, PAULINO N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with phasmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2001;74:105-112.

MARTINS RS. Effect of commercial ethanol propolis extract on *in vitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV – seropositive and HIV – seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci*. 2002;44(1):41-48.

METZNER J, SCHNEIWINN EM, FRIEDERICH E. Effect of propolis and pinocembrin on fungi. *Pharmazie*. 1977;32(11):730-732.

MORENO ZH, MARTÍNEZ PA, FIQUEROA J. Efecto antimicrobiano de propóleos argentinos, colombianos y cubanos sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Nova*. 2007;70-75.

PARDO MLA. Comparação entre a atividade antimicrobiana de própolis de abelhas indígenas sem ferrão e de própolis verde de *Apis mellifera*. (Tesis de Maestria). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2007,108 p.

PARK YK, KOO MK, IKEGAKI M, CONTADO JL. Comparasion of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions. *Arq Biol Tecnol*. 1997;40(1):97-106.

PEREIRA AS, SEIXAS FRMS, NETO FRA. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova*. 2002;25(2):321-326.

PROKOPOVICH NN, FLIS ZA, FRANKOVSKAYA ZI, KOP'EVA EP. An anaesthetizing substance for use in stomatology. Vrach Delo. 1956;1:41-44.

RAO CV, DESAI D, KAUL B, AMIN S, REDDY BS. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. Chem Biol Interact. 1992;84(3):277-290.

SALAMANCA gs, ramírez c, pubian ll. Composición mineral de algunas muestras de propóleo colombiano colectados por *Apis mellifera scutellata*. Apiservice. 2001 [beekeeping.com].

SCHELLER S, SZAFIARSKI J, TUSTANOWSKI J, NOLEWAJKA E, STOJKO A. Biological properties and clinical application of propolis: some physico-chemical properties of propolis. Arzneimittel Forschung. 1977;27:889-890.

SCHELLER S, WILCZOKS T, IMIELSKI S, KROL W, GABRYS J, SAANI J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. Int J Radiat Biol 1990;57:461-465.

SFORCIN JM. Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladora e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico de ratos [Tesis Doctoral]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP; 1996.

SILVA RA, RODRIGUES AE, RIBEIRO MCM, CUSTÓDIO AR, ANDRADE NED, PEREIRA WE. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extrato de própolis da Paraíba, Brasil Ciencia Rural. 2006;36(6):1842-1848.