

Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil

Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil

Walfrido Bispo Junior¹; Emilia Oliveira Miranda²; Valter Alvino³; Brancilene Araujo⁴; Denise Wanderlei Silva⁵; Zenaldo Porfirio⁶

Resumo

A própolis vermelha, como é conhecida popularmente, é uma própolis recentemente encontrada no Brasil e tem potente ação biológica. O presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das frações hexânica, clorofórmica e acetanólica da própolis proveniente de apiário do estado de Alagoas. As linhagens microbianas utilizadas foram: *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. O extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas gram-positivas (100%), gram-negativas (62,5%) e fúngicas (100%), com eficiência em 76,9% em todas as espécies testadas. A fração hexânica mostrou eficiência em 76,9% das espécies, semelhante ao extrato bruto; já a fração clorofórmica mostrou atividade frente a 92,3% das espécies analisadas, sendo *Klebsiella pneumoniae* a única espécie resistente. A fração acetanólica foi a fração que apresentou melhor atividade antimicrobiana com eficiência em 100% das espécies analisadas. Perante *Candida albicans*, observamos excelentes resultados, principalmente para a fração acetanólica, na qual a concentração inibitória mínima (CIM) se compara aos valores encontrados para as bactérias gram-positivas. Assim, as frações de própolis vermelha apresentaram excelente atividade antimicrobiana, principalmente frente a microrganismos gram-positivos e *Candida albicans*. Além disso, observamos que a fração acetanólica destacou-se como um promissor produto biotecnológico.

Palavras-chave: Própolis vermelha. Atividade antibacteriana. Atividade antifúngica. Frações.

Abstract

The red propolis is a new type of propolis founded in Brazil with large biological action. This study evaluated the antimicrobial activity of ethanol extract and fractions of hexane, chloroform and acetanolic of propolis from the apiary of the state of Alagoas. The microbial strains used were: *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*,

¹ Universidade Federal de Alagoas, Doutorando da Rede Nordeste de Biotecnologia, Contato principal para correspondência: walfridobispojr@hotmail.com.

² Universidade Federal de Alagoas, Brasil, Aluna do Curso de Farmácia-Bioquímica da Universidade Federal de Alagoas, microhospitalar@hotmail.com.

³ Universidade Federal de Alagoas, Brasil, Aluno de Curso de Especialização em Microbiologia Clínica Hospitalar da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, microhospitalar@hotmail.com.

⁴ Universidade Federal de Sergipe, Brasil, Professora Doutora da Universidade Federal de Sergipe, microhospitalar@hotmail.com.

⁵ Universidade Federal de Alagoas, Brasil, Professora Doutora do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, microhospitalar@hotmail.com.

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The ethanolic extract showed activity against Gram-positive strains (100%), Gram-negative (62.5%) and fungi (100%) with efficiency against 76.9% of all the analyzed strains. The hexanic fraction showed efficiency against 76.9% as observed with the ethanolic extract, though the chloroform fraction showed activity against 92.3% of the strains analyzed. *Klebsiella pneumoniae* was the only resistant species. The ethyl acetate was the fraction that showed the best antimicrobial activity with efficiency against 100% of all strains analyzed. Excellent results were observed to *Candida albicans* mainly with ethyl acetate fraction with the value of minimum inhibitory concentration (MIC) similar to those observed to Gram-positives bacteria. We concluded that the partitions of red propolis showed excellent antimicrobial activity mainly against Gram-positive microorganisms and *Candida albicans*. Furthermore, we observed the ethyl acetate fraction stood out as a promissory biotechnological product.

Keywords: Red propolis. Antibacterial activity. Antifungal activity. Partitions.

Introdução

A própolis é formada por material resinoso e balsâmico e é coletada pelas abelhas nos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores. Trata-se de uma mistura complexa, à qual, na colmeia, elas adicionam secreções salivares. Esta resina é utilizada pelas abelhas na proteção da colméia contra a proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias (SILVA et al., 2006).

Estudos apontam que a própolis (ou os seus derivados) apresenta toxicidade contra células cancerígenas e atividade antioxidante, antiviral, antiúlceras, cicatrizante e antibiótica frente às bactérias gram-positivas (AZEVEDO et al., 1986; KUJUMGIEV et al., 1999; REIS et al., 2000; FERNANDES JUNIOR et al., 2005; KHALIL, 2006). O alto teor de flavonóides está diretamente ligado ao poder antioxidante, e verificou-se que a fração clorofórmica apresentou maior atividade (CABRAL et al., 2009). Vários estudos comprovaram a ação anti-séptica, antifúngica, antipirética, adstringente, antiinflamatória e anestésica (HAY; GRIS, 1990; DOBROWOLSKI et al., 1991; RUPPELT et al., 1991; BURDOCK, 1998; AZEVEDO et al., 1999; SANTOS et al., 2003). Também tem ação comprovada frente ao *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* (GRANGE; DAVEY, 1990; D'AURIA et al., 2003).

As própolis brasileiras foram classificadas por Park, Ikegaki e Alencar (2000) em doze grupos

principais, de acordo com a composição química básica dos extratos alcoólicos obtidos daquelas própolis. Recentemente, um novo grupo da Mata Atlântica de Alagoas foi identificado e classificado como grupo 13, este apresenta uma potente ação biológica (ALENCAR et al., 2007). Aguiar et al. (2003) observaram que as características física e química destas amostras de própolis diferem das outras amostras dos 12 grupos.

Quando se avalia a atividade antibacteriana da própolis vermelha, verifica-se que o extrato obtido das regiões brasileiras possui melhor ação biológica em comparação aos resultados obtidos com extratos norte-americanos (BASTOS et al., 2008). Segundo Dausch et al. (2007), as amostras de própolis vermelha brasileira da região Nordeste apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), em concentrações próximas a 2,5 µg/ml. Alencar et al. (2007) demonstraram que o extrato etanólico e a fração clorofórmica da própolis brasileira, apresentaram uma potente atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus mutans* (UA 159).

As investigações sobre as propriedades antibióticas da própolis têm sido conduzidas sobretudo nas áreas médica e veterinária, nas quais o produto tem demonstrado uma eficiente atividade em relação a diversos gêneros de bactérias, sendo as gram-positivas mais sensíveis aos extratos de

própolis que as gram-negativas (PINTO et al., 2001).

O presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e frações de própolis vermelha obtida no estado de Alagoas frente a bactérias dos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Proteus sp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Klebsiella sp.*, e fungos do gênero *Candida sp.*

Material e Métodos

Amostra

A amostra de própolis vermelha para análise foi adquirida do Apiário Ilha do Porto, localizado em área de manguezal, na cidade de Marechal Deodoro – AL, Região Nordeste do Brasil.

Fracionamento

A própolis foi triturada e extraída a frio com agitação mecânica, utilizando-se como solvente o etanol 96°GL; a solução foi filtrada e concentrada em rotaevaporador, e obteve-se o extrato bruto da própolis (EBEP). Esse extrato foi suspenso em uma mistura metanol-água 40% (v/v) e fracionado utilizando a técnica de extração líquido-líquido com os solventes: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Após evaporação dos solventes em aparelho rotatório à pressão reduzida, foram obtidas a fração hexânica de própolis (FHP), fração clorofórmica de própolis (FCP), fração acetanólica da própolis (FAP) e fração hidroalcoólica.

Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados foram: *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a *Candida albicans*. As linhagens foram cedidas pelo Centro de Patologia e Medicina

Laboratorial da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas. Foram, também, utilizadas as *P. aeruginosa* ATCC 2785, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *C. albicans* ATCC 14053, que são cepas com perfil de resistência padronizado internacionalmente e serviram como controle da atividade antimicrobiana.

Atividade antimicrobiana in vitro

O meio de cultura Agar Infuso de Cérebro e Coração - BHA - (Vetec, Brasil) foi preparado de acordo com o fabricante, e o extrato bruto e frações da própolis foi incorporados individualmente ao mesmo.

Os microrganismos foram repicados da cultura estoque para tubos de ensaio contendo 2 mL do meio de cultura Brain Heart Infusion – BHI – (Difco, Brasil) líquido e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após a verificação do crescimento dos microrganismos, por meio da turbidez, foi realizada a inoculação de 10 µL de cada suspensão bacteriana (aproximadamente 10⁶ microrganismos) e fúngica (aproximadamente 10⁵ microrganismos). Contou-se com o auxílio de uma alça de platina calibrada, e nas placas continham meio de cultura sólido e as respectivas frações da própolis vermelha.

As placas inoculadas com os microrganismos foram incubadas até 48 horas. Após esse período, foram realizadas as leituras para averiguar se havia crescimento dos microrganismos. Foram considerados sensíveis à partição da própolis os espécimes nos quais não se observou crescimento no meio de cultura.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi determinada para as frações FHP, FCP e FAP. Para isso, utilizou-se a técnica de incorporação das frações de própolis

ao meio agar base em concentrações decrescentes entre 1% a 0,005 % (m/v). Após a incorporação, os microrganismos foram semeados na superfície das placas e após 24 horas (bactérias) e 48 horas (fungos) de incubação foi realizada a leitura. A menor concentração em que não houve crescimento dos microrganismos foi considerada como CIM e todos os testes foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

De acordo com os resultados expressos na Tabela 1, o extrato etanólico da própolis vermelha apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas gram-positivas (100%), gram-negativas (62,5%) e fúngicas (100%), com eficiência em 76,9% de todas as espécies testadas.

Fernandes Júnior, Balestrin e Cunha (2003) evidenciaram a ação antimicrobiana da própolis frente ao *Staphylococcus aureus*, uma espécie gram-positiva com largo espectro de patogenicidade, demonstrando seu efeito inibitório em baixas concentrações. Esse resultado foi observado em nossos trabalhos onde constatamos resultado semelhante para *Staphylococcus coagulase negativa* (Tabela 1). Frente às espécies Gram-negativas, Sforcin (1996) observou a necessidade de concentrações de própolis maiores, entre 4,5 – 8,0%, para obter atividade antimicrobiana. Em nossos resultados, o extrato etanólico na concentração de 1% foi eficiente para *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*, o que demonstra uma maior atividade da própolis vermelha da região alagoana. Já as espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foram resistentes a essas linhagens, o que confirma os dados já obtidos por Vargas et al. (2004) e Detoma, Ozino (1991).

Ao analisar a fração clorofórmica, pode-se observar atividade antimicrobiana em face de 92,3% das espécies analisadas (Tabela 1), das quais a *K. pneumoniae* foi a única espécie resistente. Alencar et al. (2007) relataram essa ação, caracterizando

como a fração de melhor atividade antibacteriana, determinando, também, as concentrações mínimas inibitórias frente a *S. aureus* e *S. mutans*.

A fração acetanólica apresentou atividade antimicrobiana em face dos 100% das espécies analisadas, o que a tornou a partição de melhor atividade em nossos estudos. Embora Pinto et al. (2001) não tenham observado essa ação, as frações clorofórmica e acetanólica foram as que apresentaram melhor atividade antimicrobiana em face dos microrganismos analisados. Já a fração hexânica foi a que apresentou pior desempenho quando comparadas às outras frações, com eficiência em 76,9% das espécies, atividade semelhante ao observado com o extrato bruto.

A atividade antibacteriana da própolis pode estar relacionada diretamente à presença de compostos fenólicos e flavonóides, onde a maior concentração desses compostos bioativos determina uma maior atividade antibacteriana (CASTRO et al., 2007). Na Figura 1, observamos que houve uma maior atividade da própolis frente às bactérias Gram-positivas, apresentando CIM menores que aos observados em bactérias Gram-negativas, resultado que corrobora com os dados de Sforcin et al. (2000). Fernandes Júnior et al. (2001) também demonstraram esta diferença, onde a inibição de *E. coli* ocorreu com um CIM de até 9,5 mg/mL enquanto *S. aureus* foi inibido com um CIM de 0,7 mg/mL. As menores CIM foram observadas para a fração acetanólica o que ratifica a elevada ação biológica dessa partição (Figura 1). Essa boa atividade pode ser explicada do ponto de vista fitoquímico devido à grande quantidade de compostos fenólicos ativos, os quais migraram para esta fração de alta polaridade, e devido a reduzida quantidade de interferentes apolares (ceras), que estariam presentes na fração hexânica, justificando a menor atividade antimicrobiana de tal fração.

Para a *Candida albicans*, observamos excelentes resultados, principalmente para a fração acetanólica onde a CIM se compara aos valores encontrados para as bactérias Gram-positivas analisadas. Foram

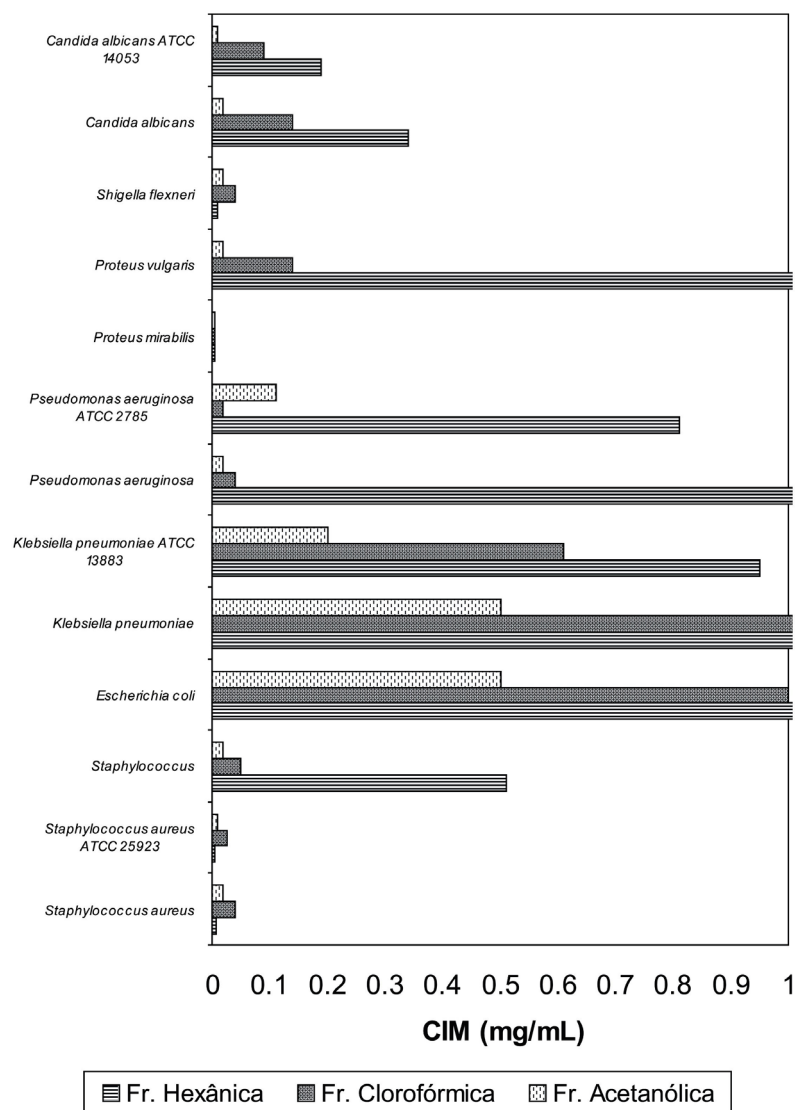
observadas, em estudos com *C. albicans*, CIM de 5,0 mg/mL utilizando própolis obtidas no Sudeste, ressaltando uma superioridade na qualidade da própolis alagoana (OLIVEIRA et al., 2006; SFORCIN et al., 2001).

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana das frações da própolis vermelha a 1%.

MICRORGANISMOS	AMOSTRAS DE PRÓPOLIS			
	Extrato Bruto (EBEP)	Fração Hexânica (FHP)	Fração Clorofórmica (FCP)	Fração Acetanólica (FAP)
Gram-Positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	S	S	S
	<i>Staphylococcus</i> Coagulase negativo	S	S	S
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	R	R	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	S
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	S	S	S
	<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S
Fungos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 2785	S	S	S
	<i>Proteus vulgaris</i>	S	S	S
	<i>Shigella flexneri</i>	S	S	S
	<i>Candida albicans</i>	S	S	S
	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	S	S	S

S – Sensível, R- Resistente

Fonte: Autores.

Figura 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações de Própolis Vermelha de Alagoas.

Fonte: Autores.

Conclusões

Assim, verificamos que as bactérias Gram-positivas e os fungos foram as linhagens mais suscetíveis aos extratos analisados, dos quais a fração acetanólica foi a que apresentou o melhor resultado, evidenciando o excelente poder antibacteriano e antifúngico da própolis vermelha de Alagoas.

Agradecimento

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) pelo incentivo cedido.

Referências

- AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; PAREDES-GUZMÁN, J. F.; KOO, M. H.; PARK, Y. K. Caracterização físico-química das própolis originárias da região Mata Atlântica do Estado de Alagoas. *Mensagem Doce*, São Paulo, n. 27, p. 15-21, 2003.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- AZEVEDO, I. B. S.; SAMPAIO, R. F.; MONTES, J. C.; CONTRERAS, R. L. Tratamento de escaras de decúbito com própolis. *Revista Brasileira de Enfermagem, Brasília*, v. 39, p. 7-33, 1986.
- AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C.; SALVETTI, C.; REZENDE, F. H. C. 1999. Candida sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of própolis and periogard. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 30, p. 335-341, 1999.
- BASTOS, E. M. A. F.; SIMONE, M.; JORGE, D. M.; SOARES, A. E. E.; SPIVAK, M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology, Marceline*, v. 97, n. 3, p. 273-281, 2008.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 36, p. 347-363, 1998.
- CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; KEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.
- DAUGSCH, A. MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Oxford, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.
- D'AURIA, F. D.; TECCA, M.; SCAZZOCCHIO, F.; RENZINI, V.; STRIPPOLI, V. Effect of propolis on virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Chemotherapy*, Firenze, v. 15, p. 454-460, 2003.
- DETOMA, P.; OZINO, O. I. Azione della propoli su microorganismi dell'ambiente ospedaliero. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, Italy, v. 41, p. 231-236, 1991.
- DOBROWOLSKI, J. W.; VOHORA, S. B.; SHARMA, K.; SHAH, S. A.; NAQVI, S. A.; DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 35, p. 77-82, 1991.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E. C. D.; CUNHA, M. L. R. S. Atividade anti *Staphylococcus aureus* de extratos de própolis (EP) de *Apis mellifera* preparados com diferentes concentrações de etanol como extrator. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, Araraquara, v. 24, n. 2, p. 147-152, 2003.
- FERNANDES JUNIOR, A.; BALESTRIN, E. C.; BETONI, J. E. C.; ORSI, R. O.; CUNHA, M. L. R. S.; MONTELLI, A. C. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, p. 563-566, 2005.
- FERNANDES JUNIOR, A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *Journal Venomous Animal Toxins, Botucatu*, v. 7, n. 2, p. 173-182, 2001.
- GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of própolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, London, v. 83, p. 159-160, 1990.
- HAY, K. D.; GRIS, D. E. Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, Saint Louis, v. 70, p. 584-586, 1990.
- KHALIL, M. L. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Nagoya, v. 7, n. 1, p. 22-31, 2006.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 64, p. 235-240, 1999.
- OLIVEIRA, A. C. P.; SHINOBU, C. S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S. L.; SVIDZINSKI, T. I. E. Antifungal activity of própolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 493-497, 2006.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. H.; ALENCAR, S. M. Classification of Brazilian propolis by physicochemical method and biological activity. *Mensagem Doce*, São Paulo, n. 58, p. 2-7, 2000.

- PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extrato de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.
- REIS, C. M. F.; CARVALHO, J. C. T.; CAPUTO, L. R. G.; PATRICIO, K. C. M.; BARBOSA, M. V. J.; CHIEFF, A. L.; BASTOS, J. K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gátrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 9/10, p. 43-52, 2000.
- RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. 1. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 86, p. 203-205, 1991.
- SANTOS, C. R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E. S.; LUCIO, E. M. R. A.; ARAUJO, G. L.; TEIXEIRA, L. A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 13, p. 71-74, 2003.
- SFORCIN, J. M. *Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladora e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico em ratos*. 1996. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 73, n. 1/2, p. 43-249, 2000.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal Venomous Animal Toxins*, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 139-144, 2001.
- SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTODIO A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, 2006.
- VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; SILVA, M. S. E.; VIANA, L. R.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

Recebido em 01 de março de 2010

Aceito em 25 de janeiro de 2012