

Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*

María Leonor Quintero-Mora¹, Amparo Londoño-Orozco¹, Francisca Hernández-Hernández², Patricia Manzano-Gayosso², Rubén López-Martínez², Carlos Ignacio Soto-Zárate¹, Liborio Carrillo-Miranda¹, Guillermo Penieres-Carrillo¹, Carlos Gerardo García-Tovar¹ y Tonatiuh A. Cruz-Sánchez¹

¹Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México; ²Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

Resumen

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de diferentes árboles y arbustos. Sus propiedades medicinales han mantenido su popularidad a través de los años debido a que posee actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral y antiparasitaria, mostrando variación en su actividad biológica dependiendo de su origen geográfico. En México, la información respecto a la actividad de este producto es muy limitada. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de cuatro extractos etanólicos de propóleos de tres diferentes Estados de la República Mexicana, y de cuatro extractos comerciales sobre el crecimiento de *Candida albicans*. Se emplearon una cepa de referencia (ATCC 10231) y 36 aislamientos clínicos de origen humano de *C. albicans*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar. Se realizaron curvas de crecimiento en caldo glucosado de Sabouraud solo y con diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de propóleos; además se determinó si el efecto era fungicida o fungistático. El extracto obtenido en Cuautitlán Izcalli, Estado de México presentó la mayor actividad biológica, inhibiendo el 94,4% de los aislamientos clínicos a una concentración de 0,8 mg/ml; la cepa de referencia fue inhibida a una concentración de 0,6 mg/ml. El efecto fue fungistático a bajas concentraciones y fungicida a concentraciones superiores a la CMI. El extracto etanólico de propóleos mexicano podría ser investigado como un tratamiento alternativo en algunas infecciones causadas por *C. albicans*.

Palabras clave

Propóleos, Actividad antifúngica, *Candida albicans*.

Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth

Summary

Propolis is a resinous substance collected by bees (*Apis mellifera*) from different trees and bushes. Due to its antifungal, antibacterial, antiviral and antiparasitic properties, it has continued to be very popular throughout the time showing variable activity depending on its geographical origin. In Mexico, information about this product is very limited. The aim of this work was to evaluate the antifungal activity of four propolis ethanolic extracts from three different Mexican states, and four commercial extracts on *Candida albicans* growth. A reference strain (ATCC 10231) and 36 clinical isolates of *C. albicans* were used. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined by the dilution on agar method. Growth curves on Sabouraud Dextrose broth with and without different propolis ethanolic extracts concentrations were performed. In addition, whether the effect was fungistatic or fungicide was determined. The propolis ethanolic extract obtained from Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, showed the best biological activity, inhibiting 94.4% from the clinical isolates at 0.8 mg/ml; the reference strain was inhibited at 0.6 mg/ml. The propolis effect was fungistatic in low concentrations and fungicide in concentrations higher to MIC. The Mexican propolis ethanolic extract could be further investigated for its alternative use for the treatment of some *C. albicans* infections.

Key words

Propolis, Antifungal activity, *Candida albicans*

Dirección para correspondencia:

Dra. María Leonor Quintero Mora
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México
Km. 2.5 Carr. Cuautitlán Teoloyucan San Sebastián Xhala CP 54700
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México
Tel.: +55 56231846
Fax: +55 56231831
E-mail: marileqm@hotmail.com

Aceptado para publicación el 9 de octubre de 2007

El aumento en la prevalencia de las micosis, la aparición de cepas fúngicas resistentes a los agentes antimicóticos empleados en la actualidad y los efectos secundarios que estos últimos provocan en los pacientes son, sin duda, algunos indicadores de la necesidad de encontrar o desarrollar nuevos compuestos que cumplan con los requerimientos de un antifúngico ideal. El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de yemas, brotes y peciolos de las hojas de diferentes vegetales, y que mezclan en la colmena con ceras y secreciones salivales. De acuerdo a varios autores, este compuesto posee actividad antifúngica, antibacteriana, antiviral y antiparasitaria [7,10,14,20]; otros estudios han demostrado que el propóleo tiene propiedades como antioxidante, anticancerígeno y antiinflamatorio [1,4,15,26]. La composición química del propóleo es muy compleja: contiene más de 160 componentes activos, entre ellos flavonoides, ácido benzoico, ácido cafeico y sus derivados. Se ha propuesto que su actividad biológica depende de muchos factores y, por lo tanto, ha sido asociada a la región geográfica, la temporada de recolección, el tipo de vegetación, la especie de abeja y el solvente usado para su extracción [3,24]. Hasta ahora no se ha demostrado que exista una sustancia individual o una clase particular de sustancias responsables de la actividad biológica y se considera que tiene una actividad sinérgica entre diferentes compuestos [14].

Con anterioridad se ha demostrado la actividad biológica del extracto de propóleo sobre la levadura *Candida albicans* cuando se emplearon extractos de diferentes orígenes geográficos, principalmente de Egipto, Turquía, Brasil, Bulgaria, El Salvador y Cuba [2,7,11,19,22,25]. Sin embargo, y a pesar de que en México el propóleo es empleado desde hace muchos años como parte de la medicina tradicional y de que existe una gran variedad de productos comerciales, son muy pocos los estudios que se han realizado respecto a su actividad biológica. El objetivo de este estudio fue comparar la efectividad sobre el crecimiento de *C. albicans* de ocho extractos etanólicos de propóleo, cuatro de ellos obtenidos directamente de apiarios de diferentes regiones del país y cuatro más que se encuentran a la venta en tiendas naturistas o en supermercados a nivel nacional.

Materiales y métodos

Microorganismos. Se utilizaron una cepa de referencia de *C. albicans* (ATCC 10231) y 36 cepas aisladas de pacientes e identificadas como *C. albicans* por los procedimientos tradicionales (filamentación en suero, producción de clamidoconidios en agar harina de maíz, crecimiento en

CHROMagar *Candida*, asimilación de carbohidratos con el sistema API 20C AUX). Estos aislamientos de origen humano provenían de exudado bucal (11), escamas de uñas (11), escamas de piel (7), sangre (4), líquido de aspirado bronquial (1) y orina (1), y fueron mantenidos en agar YPD (*yeast peptone dextrose*) hasta su utilización.

Extractos etanólicos de propóleos. Se probaron cuatro extractos etanólicos de propóleos obtenidos directamente de apiarios de las siguientes regiones geográficas: Cuautitlán Izcalli y Amatepec, Estado de México; Cholula, Estado de Puebla; Arroyo Colorado, Estado de Veracruz. Para el procesamiento de los propóleos se adoptó la técnica descrita en el Curso de Industrialización de Productos Apícolas [6]. Brevemente, el propóleo fue recolectado manualmente de la colmena y congelado durante una noche; posteriormente se maceró hasta formar un polvo fino y se introdujo en alcohol al 70% en una proporción al 15% peso/volumen; esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad durante siete días, homogenizando tres veces al día. Se filtró con papel Whatmann de 0,45 µm y al producto obtenido (fracción soluble) se le denominó extracto etanólico de propóleos. Los extractos comerciales fueron denominados 1, 2, 3 y 4; las concentraciones de cada uno se encontraban indicadas por el fabricante y oscilaban entre el 15 y el 30%.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Sawaya (2002) con algunas modificaciones. Para determinar la CMI, al medio agar glucosado de Sabouraud (Difco, México), a una temperatura de 40 °C, se le adicionaron concentraciones de 0,4 hasta 10 mg/ml de agar de extracto etanólico de propóleos. Posteriormente, la mezcla se homogenizó y vertió en cajas de Petri estériles. Se utilizaron dos placas control: a una se le adicionó etanol al 70% en un volumen igual al empleado en la máxima concentración del extracto etanólico de propóleos, y la otra contuvo solo el medio de cultivo. Las placas fueron inoculadas utilizando hisopos estériles embebidos en una suspensión de *C. albicans* de 24 h de crecimiento que contenía 10⁶ UFC/ml en solución salina estéril. Todas las placas fueron incubadas a 35 °C durante cinco días. Este procedimiento fue realizado por triplicado tanto con la cepa tipo como con los aislamientos clínicos. La CMI se determinó como la concentración mínima de extracto etanólico de propóleos donde no hubo crecimiento visible después del periodo de incubación.

Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico utilizando la prueba de la t de Student.

Determinación de las curvas de crecimiento. De un cultivo de 24 h de crecimiento en agar glucosado de Sabouraud se preparó una suspensión con la cepa de referencia de *C. albicans* (ATCC 10231) y se inocularon matraces

Tabla 1. Valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de propóleos comerciales y otros provenientes de diferentes regiones de la república mexicana sobre la cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 y cepas aisladas de muestras clínicas.

Extracto de propóleos	CMI (mg/ml) <i>C. albicans</i> ATCC 10231	Media CMI (mg/ml) en los aislamientos clínicos (n = 36)	Número de aislamientos clínicos inhibidos (n = 36)
Cuautitlán Izcalli, Estado de México	0,6	0,7	34
Amatepec, Estado de México	1	1,1	35
Arroyo Colorado, Veracruz	3	4,8	35
Cholula, Puebla	> 10	7	5
Extracto comercial 1	5	8,5	22
Extracto comercial 2	> 10	7	4
Extracto comercial 3	3	4,9	32
Extracto comercial 4	5	6,3	25

conteniendo 50 ml de caldo glucosado de Sabouraud para obtener una concentración de 10^6 UFC/ml; se adicionó extracto etanólico de propóleos para obtener diferentes concentraciones correspondientes a los valores de CMI determinados para cada extracto. Se incubó en agitación (200 rpm) a 35°C durante 10 h, tomando alícuotas cada hora para medir la densidad óptica a 600 nm. Para evaluar si el efecto era fungicida o fungistático se tomó una muestra del cultivo con un asa a los mismos tiempos en que se determinó la absorbancia para la curva de crecimiento y se inoculó una placa de agar glucosado de Sabouraud que se mantuvo en incubación durante 48 h a 35°C . Se consideró que el crecimiento en la placa era indicativo de un efecto fungistático, en tanto que la ausencia del mismo correspondía a un efecto fungicida.

Resultados

Como se observa en la tabla 1 existe una gran variación en la actividad de los diferentes extractos; el de mayor actividad biológica fue el que provenía de Cuautitlán Izcalli, Estado de México, con una CMI para la cepa de referencia de 0,6 mg/ml, y de 0,7 de valor medio para las cepas de aislamientos clínicos. Los extractos etanólicos de propóleos de Amatepec, Estado de México y de Arroyo Colorado, Veracruz, presentaron una menor actividad, seguidos de los extractos comerciales 1, 3 y 4. Los extractos que menor actividad presentaron fueron el de Cholula, Puebla, y el extracto comercial 2. Con todos los extractos se observó que había cepas que eran inhibidas a concentraciones menores que la cepa de referencia, y que otras cepas requerían concentraciones mayores. En la figura 1 se observa que extractos como el de Cuautitlán Izcalli, Amatepec y Arroyo Colorado inhibieron más del 95% de las muestras en concentraciones de 0,8, 2 y 7 mg/ml, respectivamente. Los extractos comerciales 3 y 4 inhibieron el 89% de las cepas con una concentración de 10 mg/ml. Finalmente, los extractos provenientes de Cholula y el extracto comercial 2 inhibieron, a las mismas concentraciones, solo el 13 y el 11% de las muestras, respectivamente.

Respecto al efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleos de Cuautitlán Izcalli, sobre los aislamientos clínicos se observó que los aislamientos de escamas de uñas fueron los más sensibles a concentraciones menores, seguidos de los aislamientos de sangre, exudado bucal, escamas de piel y aspirado bronquial. Dos cepas no fueron inhibidas por ninguno de los propóleos: una proveniente de exudado bucal y otra de orina. Estos resultados fueron similares para los extractos restantes con excepción del extracto de Cholula y el extracto comercial 2, donde solo fueron sensibles dos muestras de exudado bucal, una de escamas de piel y una de escamas de uñas, sensibles todas ellas desde una concentración de 5 mg/ml.

Se evaluó el efecto de los extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento in vitro de *C. albicans* encontrándose que no había incremento en la densidad óptica en los cultivos que estuvieron en contacto con los extractos. Los resultados fueron similares para todos los extractos probados y sin diferencias considerables entre las concentraciones empleadas. En la figura 2 se muestra la inhibición del crecimiento de tres de los ocho extractos estudiados sobre la cepa de referencia de *C. albicans*, con las concentraciones a las que se presentó mayor actividad inhibitoria: Cuautitlán Izcalli 0,8 mg/ml, Amatepec 2 mg/ml y Arroyo Colorado 7 mg/ml.

En este estudio fue evaluada la actividad fungicida del extracto de Cuautitlán Izcalli en la cepa de referencia

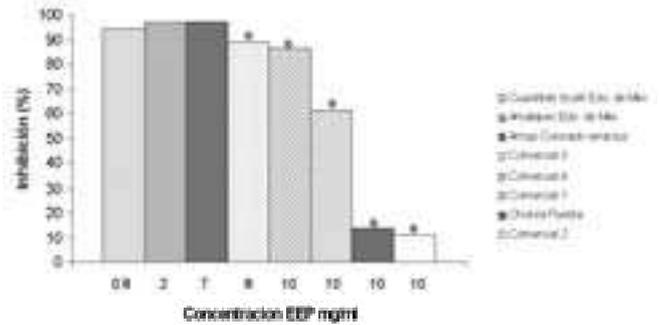


Figura 1. Porcentaje de aislamientos clínicos inhibidos por las distintas concentraciones de los diferentes propóleos. Los resultados son el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El * denota diferencias significativas ($p < 0,05$).

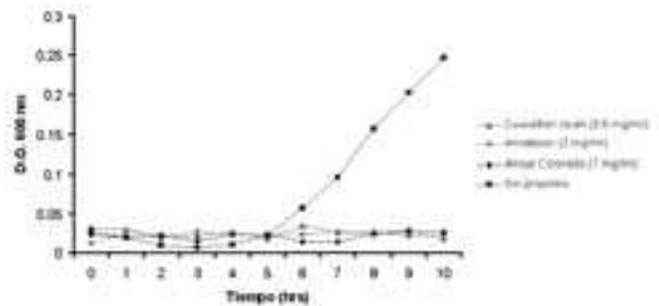


Figura 2. Efecto de los tres extractos de propóleos con mayor actividad biológica sobre el crecimiento de *C. albicans* (ATCC 10231).

C. albicans (ATCC 10231), encontrando que fue dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. Se observó que el efecto fue fungistático a concentraciones menores de propóleos e iguales a la CMI, 0,6 mg/ml, permaneciendo este efecto hasta las 10 h. En concentraciones superiores a la CMI, empleando la concentración de 1,2 mg/ml, el efecto fungistático permaneció durante las primeras seis horas y a partir de la séptima hora el efecto fue fungicida. A la concentración de 2,4 mg/ml fue fungicida a partir de la segunda hora.

Discusión

El propóleos ha sido empleado por sus propiedades medicinales desde la antigüedad por culturas como la egipcia, griega y romana [12]. Se sabe que es relativamente atóxico: dosis diarias de 1.400 mg/kg no causan ningún efecto negativo en ratones, aunque masticar grandes cantidades de propóleos en bruto puede producir náuseas y otros trastornos digestivos [13].

Durante los últimos 30 años se han intensificado los estudios farmacológicos y químicos, demostrando que los propóleos de diversas regiones geográficas tienen diferentes composiciones y actividad biológica [3,12].

Desde 1988 se ha descrito la actividad del extracto etanólico de propóleos frente a 23 cepas del género *Candida* aisladas de diferentes partes del cuerpo humano, encontrando que era fungistático a una concentración de 0,55 mg/ml [21]. Otros autores encuentran actividad fungicida en el extracto etanólico de propóleos estudiado frente a 15 cepas, con una concentración del extracto de 3 a 7 mg/ml, siendo *C. albicans* más sensible que otras especies de su género, como *Candida tropicalis*, *Candida krusei* o *Candida guilliermondii* [17]. Algunos autores han recomendado la utilización del propóleos como un antiséptico

tico para la prevención y tratamiento de la candidosis oral [5,17,18]. Se ha mencionado, incluso, que el extracto etanólico de propóleos podría ser usado como medicina alternativa en el tratamiento de las candidosis en pacientes VIH positivos, siendo tan efectivo como la nistatina y superando a otros antifúngicos como el clotrimazol, el econazol y el fluconazol [16]. El propóleos también ha sido empleado para el tratamiento de infecciones vaginales crónicas, con el 61,1% de las pacientes mostrando mejoría después de seis meses sin necesidad de otro tratamiento [9].

En este estudio se demostró que todos los extractos etanólicos de propóleos mexicanos probados presentaron actividad biológica contra *C. albicans*, tanto los obtenidos directamente de apiarios como los extractos comerciales. Sin embargo, su actividad biológica fue muy diferente entre sí, presentando valores CMI similares a los descritos para extractos obtenidos en otras partes del mundo, y que van de 0,2 a 12 mg/ml [8,18,23]. En este estudio se empleó la técnica de dilución en agar para la determinación de la CMI al ser el método más efectivo para la evaluación del efecto del propóleos sobre *C. albicans*; el procedimiento no es afectado por la baja solubilidad de los componentes del propóleos, y es posible diferenciar su actividad biológica de acuerdo a su composición [23]. Se realizaron curvas de crecimiento para evaluar el tiempo en el cual se llevaba a cabo la inhibición, observada desde la primera hora, permaneciendo constante hasta las diez horas. A este respecto no se encontraron referencias para poder establecer una comparación. Sin embargo, cuando se evaluó la actividad fungicida del extracto de Cuautitlán Izcalli, que presentó la mayor actividad biológica con la cepa de referencia ATCC (10231), se observó que el efecto fue fungistático hasta una concentración equivalente a dos veces la CMI, observándose un efecto fungicida a partir de las siete horas de incubación. Estas concentraciones coinciden con las descritas para otros extractos etanólicos de propóleos, como se había mencionado anteriormente [17,21].

En trabajos previos se ha demostrado que las diferencias en la actividad biológica de diversos extractos de propóleos se deben a su composición química, ya que provienen de diferentes regiones geográficas; sin embargo también podrían estar influyendo la época de recolección del propóleos, la especie de abeja y el método de preparación de la tintura, como han mencionado otros autores [3,12,14,24]. Se ha propuesto que las proporciones del ácido caféico, los flavonoides y los ésteres fenólicos son los principales responsables de la actividad biológica,

pero también se ha demostrado que existe un efecto sinérgico entre estos y otros componentes del extracto [10]. Por lo anterior, es necesario señalar que se requieren análisis más rigurosos que permitan garantizar la calidad de estos extractos antes de salir al mercado.

Es importante recordar que las pruebas *in vitro* no reflejan las condiciones reales encontradas en infecciones clínicas, si bien son de utilidad para poder realizar posteriormente estudios *in vivo*.

En conclusión, en este trabajo se evaluó la actividad antifúngica de ocho extractos etanólicos de propóleos provenientes de diferentes regiones de México frente a cepas de *C. albicans*, una de referencia (ATCC 10231) y 36 cepas de origen clínico, resultando que los propóleos de Cuautitlán Izcalli y Amatepec, Estado de México, fueron los que presentaron mayor actividad biológica. Aun cuando se han logrado importantes avances en la investigación acerca del propóleos y su actividad biológica frente a *C. albicans*, es recomendable ampliar los estudios enfocados a la caracterización de este producto, incluyendo la identificación del o los principios activos, y determinar su mecanismo de acción, así como su efecto en otros hongos de importancia médica.

A las pasantes de químico-farmacéutico-biólogo Carol Martínez Urbán y Angeles Marín Ruiz, por su apoyo en la realización de las pruebas de sensibilidad. A los médicos-veterinarios-zootecnistas Marco Antonio Mendoza Saavedra, Edna Maribel Legazpi Nuevo y Consuelo Álvarez Rodríguez por su asistencia técnica. Al Maestro en Ciencias Crisóforo Mercado por las muestras de propóleos proporcionadas. Este estudio fue financiado por los proyectos DGAPA PAPIIT IN202105-3, PAPIIT IN203106-3 y PROFIP (UNAM).

Bibliografía

1. Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, Araki Y, Mishima S, Nozawa Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1057-1059.
2. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, Popov S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z Naturforsch [C]* 1999; 54: 401-405.
3. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Z Naturforsch [C]* 2002; 57: 530-533.
4. Blonska M, Bronikowska J, Pietsz G, Czuba ZP, Scheller S, Krol W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2004; 91: 25-30.
5. da Silva RRG, Pimenta FC, Ribeiro RSCL. Antimicrobial activity of two commercial propolis extracts. *Braz J Oral Sci* 2006; 5: 967-970.
6. González Guerra Ana Ramona. Fórmulas apiterapéuticas. Cosméticos, apifármacos y suplementos nutricionales. Curso de Industrialización de productos apícolas. Veracruz, México, 2000.
7. Güler P, Sorkun K, Salih B. The effect of some Turkish propolis on the product quantity of *Agaricus bisporus* (Lange). *Pak J Bot* 2003; 35: 437-445.
8. Hegazi AG, El Hady FK. Egyptian propolis: 1-antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. *Z Naturforsch [C]* 2001; 56: 82-88.
9. Imhof M, Lipovac M, Kurz Ch, Barta J, Verhoeven HC, Huber JC. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *Int J Gynaecol Obstet* 2005; 89:127-132.
10. Kartal M, Yildiz S, Kaya S, Kurucu S, Topçu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol* 2003; 86: 69-73.
11. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* L. Propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Research* 1999; 33: 393-400.
12. Kosalec I, Peveljnjak S, Bakmaz M, Vladimir-Knelević S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm* 2005; 55: 423-430.
13. Krell R. Value-added products from beekeeping. Rome, FAO Agricultural Services Bulletin N°. 124, 1996.
14. 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.
15. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem* 2004; 84: 329-339.
16. Martins RS, Pereira ES Jr, Lima SM, Senna MI, Mesquita RA. Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vivo* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci* 2002; 44: 41-48.
17. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 2001; 44: 375-378.
18. Palamin-Azevedo RV, Chinalli-Komesu M, Candido RC, Salvetti C, Caetano-Rezende FH. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and periodarg. *Rev Microbiol* 1999; 30: 335-341.
19. Popova M, Bankova V, Spassov S, Tsvetkova I, Naydenski C, Silva MV, Tsartsarova M. New bioactive chalcones in propolis from El Salvador. *Z Naturforsch [C]* 2001; 56: 593-596.
20. Prytyk E, Dantas AP, Salomao K, Pereira AS, Bankova VS, De Castro SL, Aquino Neto FR. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *J Ethnopharmacol* 2003; 88: 189-193.
21. Rojas N, Lugo S. Efecto antifúngico del propóleo sobre cepas del género *Candida*. Memorias del I Simposio sobre los Efectos del Propóleo en la Salud Humana y Animal. Varadero, Cuba, 1988, 42-53.
22. Salomao K, Dantas AP, Borba CM, Campos LC, Machado DG, Aquino Neto FR, de Castro SL. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38: 87-92.
23. Sawaya AC, Palma AM, Caetano FM, Marcucci MC, da Silva Cunha IB, Araujo CE, Shimizu MT. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35: 203-207.
24. Sforcin JM, A Fernandes Jr, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazil propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 243-249.
25. Ugur A, Arslan T. An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *J Med Food* 2004; 7: 90-94.
26. Wang BJ, Lien YH, Yu ZR. Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chem* 2004; 86:237-243.