دراسة تأثير المستخلص الكحولي لكل من البروبوليس والحبة السوداء ونبات القرفة في الفطر. *Rhizoctania solani* Kuhn الممرض

مرزة حمزة هادي

الكلية التقنية / المسيب

الخلاصة :

استهدف البحث دراسة تأثير تراكيز مختلفة (1.00 ، 5.00 ، 10.00) % لكل من المستخلصات الكحولية للبروبوليس والحبة السوداء ونبات القرفة في تثبيط نمو الفطر الممرض *Rhizactonia solani* Kuhn بالأضافة الى معاملة السيطرة (0.00) % . حيث أظهرت نتائج الدراسة أن أستخدام المستخلصات الكحولية بتركيز 70 % أدى الى تثبيط نمو الفطر الممرض *R.solani* بنسب مختلفة ويزداد التأثير بزيادة التركيز ، فقد أثبت المستخلص الكحولي للبروبوليس كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطر الممرض بأعلى بنسبة بلغت (57.29) % للتركيز (10.00) %حيث بلغ قطر نمو مستعمرة الفطر الممرض (3.63) سم مقارنتآ مع معاملة السيطرة (0.00) % بمعدل نمو للفطرالممرض بقطر بلغ (8.50) سم . في حين أنخفض تأثير كل من مستخلصي الحبة السوداء ونبات القرفة في تثبيط نمو الفطر *R.solani* عند التركيز (10.00) % بمعدلات نمو بلغت أقطارها (5.30 ، 5.00) سم على التوالي ، مقارنتآ مع معاملة السيطرة (0.00) % بمعدل نمو بلغ (8.50) سم .

Abstract:

The research aimed to study the effect of different concentration of proplis ,blac seed and Plant cinnamon alcoholic extracts (1.00,5.00 and 10.00)%. active of *R.solani* growth inhibition, and comparing with it.

Resuit showed the used of alcoholic extract to 70% from propolis ,black seed and plant cinnamon to perform of inhibition growth fungi to different concentration ,

The result showed to (10)% concentration to propolis alcoholic extract to high inhibition reached (57.29)% . where to prove of of propolis to high ability in growth hibition to fungi pathogen with diamiters average(3.63) cm.compired with control treatment (8.50) cm. while was lower inhibition efficacy alcoholic extract of black seed and plant cinnamon of grath fungi to (10.00)% to dimeter avarge (5.30, 5.00) cm respecitivey.

ISSN 2072-3875

المقدمة :

يعتبر الفطر *R.solani* من مسببات التربة الرئيسة وذو مدى عائلي وانتشار واسعين في العالم ويسبب أمراض الذبول وسقوط البادرات للعديد من المحاصيل الزراعية وان الفطر R.solani يصيب اجزاء النباتات من جذور ورايزومات في التربة لعدد كبير من محاصيل الخضر والفاكهة . يسبب الفطر *R. solani* موت البادرات وتعفن جذور الطماطة والبطاطا والباذنجان والباميا والقطن والفاصوليا والبزاليا والحمص والسلق والبنجر السكري والتبغ والحنطة والشوفان والذرة والسمسم وكذلك محاصيل العائلة القرعية مسببا تعفن البذور وموت البادرات قبل وبعد البزوغ (das.B.C.&PDutta,1999).

يمتاز الفطر *R.solani* بقدرته على اصابة النباتات في مراحل مختلفة من النمو وتعد مشكلة تعفن الجذور وموت البادرات من الامراض المهمة في العراق لما تسببه من خسائر كبيرة ، ويعتبرالفطر R.solani من أهم مسببات هذا المرض ويمتاز بنشاطه ونموه السريع في التربة ، كما ان الخيوط الفطرية العائدة للفطر R. solani يمكن ان تبقى في التربة لمدة 9 اشهر في الاراضي المتروكه دون زراعة ، فضلا عن تكوينه للأجسام الثمرية القادرة على البقاء لفترة طويلة . أن هذا المرض ينمو في مدى واسع من درجات الحرارة (8 – 36)°م ألا أن افضل نمو مابين (25 – 30) °م (Ithurrart et al,2004) . وأن اعلى نسبة من الاصابة يسببها الفطر على المحاصيل الزراعية تكون في الاسبوع الاول والثاني من الزراعة وتقل شدة الاصابة مع تقدم البادرالت في العمر، وتحت الظروف الملائمة تظهر علامات الاصابة خلال فترة تمتد من (3–7) ايام بعد أنتشار العدوى بالفطر (Larkin,2001).

أن للفطر *R. solani* القابلية على انتاج تلانزيم بوليكلاكيتورنيز والبوليكلاكينورتيز – ترانس اليمنيز وانزيم الكاربوكسي ميثايل سليليز المحلل للسيليلوز ، ويؤكد العديد من الباحثين الى اهمية الانزيمات في احداث الاصابة المرضية حيث توجد علاقة مابين احداث الاصابة المرضية وقدرة الفطر R.solani على أنتاج كميات كبيرة من أنزيمات البوليكلاكينوريتيز فيما تعتبر الأنزيمات المحللة للسيليلوز والبكتين والبروتين من العوامل المهمة في احداث الاصابة المرضية (Kell,1997) .

المواد وطرائق العمل :

1. البروبوليس : Propolis

يعد الروبوليس من منتجات نحل العسل المهمة ذات الاصل النباتي والتي يجمعها النحل من قلف الاشجار والأوراق وبراعم بعض الأشجار كالنخيل والصنوبريات واليوكالبتوس وغيرها، يمزج النحل المواد التي يحصل عليها من الاشجار مع انواع مختلفة من الانزيمات الفعالة التي تفرز من الغدد الموجودة في راس وصدر النحلة (Kall,1991) .

يحتوي البروبوليس على 50 % مواد راتينية وبلسم و39% مواد شمعية و10 % زيوت أساسية و5% حبوب لقاح و5% عناصر ومواد عضوية ، كما توجد فيه معدلات من الالكينات والاحماض الامينية الموجودة فيه حيث

ISSN 2072-3875

شخصت (19) مادة مختلفة التركيب الكيميائي وهذه المركبات تتضمن عدد من المواد التي تعود الى الفلافونيدز (flavonids) وتشمل البيوتالين (Betulene والأيزوفانلين (Isovanillin) ، (Aagaard ,2004) . وهناك مركبات في البروبوليس ذات فعالية بايولوجية ودوائية وخاصة Chrysin,Calanigin, Pinocenbrin ، (Hegazi et al , 200) . أن مركبات البروبوليس فعالة ضد الفيروسات التي تسبب مرض موزائيك التبغ ، كما انه يحتوي عوامل مانعة لانبات البذور ونمو النباتات وخاصة التي عوملت باشعة كاما مثل الثوم والبصل والكراث والبطاطا ، (Kujumgieveter,1999) .

2. الحبة السوداء: Black seed

تعود الى العائلة الشقائقية Ranunclaceae وتسمى علمياً بأسم Nigella sative تحتوي بذور الحبة السوداء على المواد العضوية والمعدنية وأهمها البروتين الذي يشكل نسبة 20 21 % من محتويات الحبة السوداء وتحتوي على الاحماض الامينية الاساسية وغير الاساسية (Nergiz & Otles ,1993) . يشكل الدهن بين (29 – 30) % اعتماداً على مناطق وجودها وظروف زراعتها . فقد وجد ان دهن الحبة السوداء يتكون من مادة الثايمو كيتون ومشتقاته Thymohydrouinone وكذلك أحتواءه على الثايمول ، (Abou- bash et al ,1995) .
كما يحتوي على الستيرولات فضلا عن انواع من الفوسفو لبيدات وأربعة أنواع من التوكوفيرول ، أما العناصر المعدنية فتحتوي على البوتاسيوم ، الحديد ، الفسفور ، الصوديوم ، الكالسيوم ، الزنك ، المغنيسيوم ن المنغنيز ن والنحاس ، (AL-JASSER ,1992) . كما يحتوي على انزيم اللايبيز وحامض الاسكوربك والكاروتين وفيتامين A وزيت ثابت 33% ويحتوي على مادة النجلون والتي يعزى اليها المفعول الطبي ،(الخزرجي ، 2008) .

3. نبات القرفة : (الدارسين) CINNAMON

ويعود الى العائلة الغارية أو القرفية Lauraceae وتسمى بعدة اسماء منها في العراق والوطن العربي يسمى الدارسين و Cannlle في فرنسا وzimit في ألمانيا و Cannella في أيطاليا . تنتشر زراعته في سريلانكا وجنوب شرق الصين وبلدان اخرى ، والقرفة شجرة يصل طولها الى 10 م وأوراقها رمحية وأزهارها صغيرة وبشكل مجاميع وثمارها صغيرة ،يؤخذ الغلاف الخارجي كل سنتين .

تحتوي القرفة على زيت طيار Volatile oil بنسبة 1.4 % ويتركب اساساً من مادة الديهايد سيناميك Cinnamic aldyhade بنسبة 55 – 75 % ويوجينول Eugenol بنسبة 4 – 10 % بالاضافة الى بيتا فيلاندرين (ß-Phellandren) وباراسيامين ρ-Cymene والفاياتين (ألفا) a-Pinene ولينالول Linalool وفورفورال Furfural وألديهايدات مختلفة (Saman , 2006) . وجد (Wilson, 1997) ان من بين 345 مستخلص نباتي اختير 40 مستخلصا منها مستخلص اوراق القرفة ومستخلص البراعم الزهرية للقرنفل وكان لهما تاثير فعال ضد الفطر Botrytic cinerea وذكر (Carvajal & Belmont ,1998) انه كان لزيت القرفة تاثيرا مثبطا للفطر Aspergillas flavus على نبات الذرة .

تستعمل مستخلصات القرفة كطارد للبلغم وتطهير الجهاز التنفسي والبولي وزيت القرفة طارد للغازات ومزيل للالام وفاتح للشهية وكقابض لاحتوائه على بعض التبتين (الخزرجي ، 2008) .

ISSN 2072-3875

4.عزلة الفطر *R.solani*

تم الحصول على عزلة الفطر R. solani من مختبر المقاومة الأحيائية في الكلية التقنية المسيب ، حيث تم تنشيطها على الوسط الغذائي PDA عند درجة حرارة (25 – 27) °م ولمدة (5) أيام بعدها تم التأكم من مواصفات العزلة والتي اعتمدت في تشخيص الفطر الممرض R.solani وحسب العالم (Parmeter, 1970) .

تأثير الفطر *R. solani* في نسبة إنبات بذور الطماطة

اعتمدت طريقة Leiner (1986) لقياس تأثير الفطر *R. Solani* في نسبة إنبات بذور الطماطة *Lycopersicom esculentum* Mill صنف سوبرمريموند، اذ تم زراعة بذور الطماطة المعقمة سطحيا" بمحلول هيبوكلورات الصوديوم 4% لمدة 4 . 5 دقيقة والتي جرى غسلها بالماء المقطر المعقم فيما بعد في أطباق بتري حاوية على الوسط ألزرعي PDA المعقم بمعدل 20 بذرة / طبق وبشكل دائري بعد تلقيح مركز الطبق بقرص قطره 1 سم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *R. solani* النامي على الوسطPDA ولثلاث مكررات مع الأخذ بنظر الاعتبار إجراء معاملة مقارنة بزراعة بذور الطماطة على الوسط ألزرعي بالطريقة نفسها وبدون تلقيح الوسط بالفطر *R. Solani* . تم حساب نسبة أنبات بذور الطماطة بعد مرور ستة أيام من الحضن بدرجة حرارة 25 م° وحسب القانون التالي :

$$\text{نسبة الإنبات} = \frac{\text{العدد الكلي للبذور . عدد البذور غير النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

5. جمع العينات :

جمعت كميات كافية من البروبوليس من مناحل مختلفة وفي فصل الربيع كونه يجمع بكميات كبيرة من قبل النحل تصل الى 15.4 غرام ،(Salalino et al ,2005) . وقد تم أختيار نباتات الحبة السوداء وقلف اشجار القرفة بناءآ على تأثيرها ضد بعض الأنواع البكتيرية والفطرية (الكناني ، 2000) وقد تم الحصول عليها من المعشبات المحلية ن سحقت النباتات في المجرشة نوع wiley mill standard ,model no.3.Arthar Thomas co. ثم وضعت في أكياس نايلون معقمة ومعلمة ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

ISSN 2072-3875

6. تحضير المستخلصات الكحولية :

أ- **المستخلص الكحولي للبروبوليس :** أخذ 10 غم بروبوليس وقطع الى قطع صغيرة ووضعت في دورق حجمي واضيف اليه 200 مل كحول اثيانول Ethanol تركيز 70 % وترك لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة ن ثم رج بواسطة الرجاج المغناطيسي Megnetic stirrer لمدة 15 دقيقة ثم رشح المحلول من خلال قطعة قماش نظيفة ومعقمة للتخلص من الجزيئات الكبيرة (المسافر،2005)، ثم رشح بعد ذلك بواسطة ورق ترشيح نوع (Whatman No. 3) ، جفف الراشح بواسطة جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة حرارة 45 °م ، (Ayres et al ,2007). بعدها وزن وزن معلوم وأضيف اليه حجم معلوم من مادة Dimethyl sulfuxide لعمل مستخلص أصلي Stock extract تركيز 50% ومن ثم عملت التراكيز (1.00، 5.00 ، 10.00) % وبأستخدام التخفيف المتتالي ،(الجوراني ،)

ب – المستخلص الكحولي لكل من بذور الحبة السوداء وقلف نبات القرفة: استعملت طريقة (Hamborne ,1973) . في الاستخلاص حيث وزن 100 غم من مسحوق كل من بذور الحبة السوداء وقلف نبات القرفة ووضع في دورق حجمي سعة 500 مل ، ثم اضيف اليها 200 مل كحول أيثانول تركيز 70 % واغلق باحكام ثم رج لمدة 24 ساعة بواسطة الرجاج المغناطيسي Magnetic stirrer ثم رشح المستخلص خلال ورق ترشيح نو (Whatman No.3) بعدها جفف بواسطة المبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة 45 °م ، بعدها وزن وزن معلوم وأضيف اليه حجم معلوم من مادة Dimethyl sulfuxide لعمل مستخلص أصلي Stock extract تركيز 50% ومن ثم عملت التراكيز (1.00، 5.00 ، 10.00) % وبأستخدام التخفيف المتتالي ،(الجوراني،).

ج – أختبار الفعالية التضادية لكل من البروبوليس والحبة السوداء ونبات القرفة :

حضرت اطباق بتري تحوي الوسط الغذائي PDA وبثلاث مكررات لكل تركيز ن أضيف لكل طبق (0.1) مل من مستخلصات البروبوليس والحبة السوداء ونبات القرفة وللتراكيز (1.00 ، 5.00 ، 10.00) % بالأضافة الى معاملة السيطرة (0.00) % والتي لأتحتوي على أي من المستخلصات ، ورجت محتويات الطبق جيدا قبل تصلبه ، ثم نقلت لكل طبق قرص فطري (R. solani) قطره 5 ملم من مستعمرة الفطر المنشط وبعمر 5 أيام . بعد ذلك حضنت الاطباق على درجة 25 °م ولمدة (5 – 7) أيام ، تم قياس قطر المستعمرة بواسطة المسطرة فضلآ عن عمل أطباق

ISSN 2072-3875

سيطرة Control تحتوي على الوسط الغذائي فقط وبدون اضافة أي من المستخلصات السابقة وزرعت عليها مستعمرة الفطر وبنفس القياس.

ء- اختبار تأثير مستخلصات البروبوليس ووالجبة السوداء ونبات القرفة ضد الفطر *R. solani* .

بعد تحضير المستخلصات المائية للبروبوليس والغذاء الملكي وبالتراكيز(0.00 ،1.00 ،5.00 ،10.00)% لكل منهما صبت الرواشح والمستخلصات في أطباق بتري معقمة قطرها 9 سم كررت كل معاملة ثلاث مرات ولقحت الأوساط الحاوية على الرواشح والمستخلصات بعد تصلبها بأقراص قطر كل منها 1 سم من الفطر *R. solani* النامي على الوسط PDA وبعمر أربعة أيام. حضنت الأطباق لمدة سبعة أيام عند درجة حرارة 25± م°. تم قياس النمو القطري للفطر *R. solani* بأخذ معدل قطرين متعامدين من ظهر المستعمرة يمران بمركز القرص كل 24 ساعة ولحين وصول النمو في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق وحسبت النسبة المئوية لتثبيط النمو القطري للفطر *R. solani* وفق المعادلة التالية (شعبان ،1993).

$$\text{\% لتثبيط النمو القطري} = \frac{\text{معدل النمو القطري في المقارنة . معدل النمو القطري في المعاملة}}{\text{معدل النمو القطري في المقارنة}} \times 100$$

7. التحليل الأحصائي :

حللت النتائج أحصائيآ بإستخدام التصميم العشوائي الكامل (C.R.D.) Complete Randomized Design وبأقل فرق معنوي LSD تحت مستوى أحتمالية 0.05 ، (الساهوكي، 1995) .

النتائج والمناقشة :

اظهرت نتائج معاملة بذور الطماطة صنف سوبر مريموند بالفطر الممرض *R. solani* أن نسبة أنبات البذور كانت 40% بعد ستة أيام من تنميتها في وسط أل PDA الملقح بفطر الممرض مقارنة بالبذور غير المعاملة .

كما بينت نتائج جدول (1) قدرة المستخلص الكحولي لكل من البروبوليس والحبة السوداء ونبات القرفة في تثبيط نمو الفطر الممرض *R. solani* ولكافة التراكيز وبنسب تثبيطية مختلفة تزداد بزيادة التركيز . حيث أعطى التركيز الأعلى (10.00) % للمستخلص الكحولي للبروبوليس أفضل تأثير في تثبيط نمو الفطر الممرض بأعلى نسبة بلغت (

ISSN 2072-3875

57.29)% في حين أعطى كل من المستخلص الكحولي للحبة السوداء ونبات القرفة اقل تأثير ولنفس التركيز نسبة بلغت (37.64 ، 41.17) % على التوالي ، مقارنتآ مع التركيز المنخفض (1.00) % حيث أعطى أقل تأثير وللمستخلصات المذكورة بنسب بلغت (24.50 ، 17.64 ،22.58) % على التوالي.

وعلى ضوء ماتقدم يمكن تفسير كفاءة المستخلص الكحولي للبروبوليس الى أحتواءه على مركبات فعالة في تثبيط الأحياء المجهرية المختلفة ولكافة التراكيز ، حيث أسهمت وبشكل فاعل في منع نمو الفطر *R.solani* وبأقطار مختلفة . كالمواد الفينولية والفلافونية والراتنجات والزيوت الطيارة ، وهذا ما أكده الباحث Decastro,2001) من أن للبروبوليس فعالية تثبيطية للبكتريا والفطريات والفايروسات . وبدرجة أقل لكل من مستخلصات الحبة السوداء ونبات القرفة حيث تعتمد على نوعية المواد المستخلصة وطريقة الأستخلاص .

جدول (1) النسب المئوية لمعدلات قطر نمو الفطر R.solani بتاثير المستخلصات الكحولية للبروبوليس والحبة السوداء ونبات القرفةالمزروعة على وسط PDA في درجة حرارة25 ± 2ºم

التراكيز %	النسبة المئوية للمعدلات التثبيطية لنمو الفطر *R.solani*		
	البروبوليس	الحبة السوداء	نبات القرفة
0.00	0.00	0.00	0.00
1.00	24.58	17.64	22.58
5.00	45.88	29.41	38.47
10.00	57.29	37.64	41.17
L.S.D: P= 0.05	للمعاملات : 9.68 للتراكيز : 6.36 للتداخل : 8.10		

المصادر :

النجار ، عبدالرحمن (1997) : اسرارجديدة عن حبة البركة . دارأخبار اليوم . القاهرة.

الخزرجي، عمار سالم (2008): موسوعة الطب البديل ،معجم الأعشاب الطبية ، دار الهادي للطباعة والنشر والتوزيع . بيروت . لبنان ،967 صفحة .

الكناني ، محمد عبدالجليل (2000) : دراسة مرض تعفن الحضنة الاوربي على نحل العسل ومكافحته باستخدام المستخلصات النباتية . أطروحة دكتوراه .كلية الزراعة . جامعة بغداد .

المسافر، محسن عبدالله كريم (2005) . الفعالية الحيوية للبروبوليس والغذاء الملكي وسم النحل في بكتريا تعفن الحضنة الأوربي ، رسالة ماجستير.الكلية التقنية المسيب، هيئة التعليم التقنين العراق ، 117 صفحةز

ISSN 2072-3875

الجوراني، رضا صكب ،علي عبدالرحمن العسكري ونايف عبدالمنعم الدركزلي (1994) .تأثير مستخلصات نبات الأس *Myruts communis* على نسبة فقس بيض حشرتي الخابرا ودودة الشمع الكبرى ، مجلة البحوث التقنية، بغداد – العراق، العدد 21، السنة الرابعة 1994.

شعبان، عواد ونزار مصطفى الملاح ، (1993) . المبيدات ، دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل . العراق .520 صفحة.

الساهوكي، مدحت وكريمة محمد وهيب (1995) : تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب ، دار الحكمة ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .جامعة بغداد . 488 صفحة .

Das.b.C and P.dutta : (1999).Biological management of stem rot of soybean eaused by Rhizctonia solani kuhn .J.Agric.Sc.Soc.North East India 12:217-220.

Ithurrart ,M.E.,Buttner.and J.petersen(2004) . Rhizoctonia root in sugar beet (Betavulgaris ssp. Altissima)-epidemiological aspects in relation to maiza (zemays)as ahost plant. J .Plant isease protection 111;302-312.

Larkin ;R.P.(2001).control of rhizoctonia canker and Black scurf of potato by biological products. Agriculture Reaserch service Univ.of maine.

Keel,C.and Defago,G.(1997).Intraction between beneticial soil bacterial and root pathogen .mechanisms and ecological impact .InMultitrophic Interactions in Terrestrial system ed Gange,A.C. and Brown,U.K.pp27-46>London ,Blackwell science.

kall,j.(1991). Natural medicine from honey bees.(apitherapy) Amsterdam,p.93.

Aggaand,K.Lurd(2004).Propolis powerful, Natural Antibiotic pleasant valley Apiaries of Montana LLC 10010 lost pravie Rd.marion. MT59926.USA.

Hegazi-AG;Abd-EL-Hady-FK;Abd-Allah-FA.(2000).Chamical composition and antimicrobial activity of European propolis z-Nature forsch-C:55(1-2):70-5.

Nergiz, C.and otlels .S.(1993).chemichal composition of *Nigella sativa* L.seed food chemistry.4893):259- 261.

Abou- bash,L.I.;Rushed;M.S. and Aboul-Enein, m.Y.(1995).TLC assay of thymoguinone in black seed oil (nigella sative L.) And identification of dithymoguinone and thymol.Journal of liquid chromatography.18(1) 105 – 115.

AL- jassir ,M.S.(1992).Chemical composition and microflora of black cumin (Nigella sativa) seeds growing in Saudi Arabia food chemistry 45(40;239 – 242.

Salman,M.T.; Khan, R. Ali and Shukla, Inda,(2006):In vitro antimicrobial activity of Nigella sativa oil against multi –drug resistant bacteria .Unimed kulliyat,II (1). pp.8- 13.

Wilson, C.l.; Solar,J.M;El –ghauth – A., and wisniewski, M.E.91997).Rupid evalution of plant extract and essential oils for antifungal activity against *Btryis cinerea.* Plant – disease (U.S.A)v.81 92). P.204 – 210.

ISSN 2072-3875

Belmont,m.R. and carvajal,M.(19980.Control of Aspergillus flavus in maize with plant essential oils and their components – Jou –of food production (U.S.A).V.61(5)p.610 – 619.

Leiner, R.H. and Carling ,D.E.(1986). Characterization of waita circinata isolated from Agricultural soils in Alaska. Plant dis .78:385-388.

Parmeter,J.R.Tr(Ed).(1970)."Rhizoctonia solani ,biology and pathology ." Univ. of Calif. Press,Berkeley, LosAngcles.225p.

salatino,A., Teixeira, E.;Negri, G.and message.D.(2005).Origin and chemical variation of Brazilian propolis – eCAM,2(1);33- 38.

Ayres,D.C.; Marcucci,M.C.and Giorgio,S.(2007).Effect of brazilian propolis Leishmania amazonensis Men.Inst.Oswaldo Cruz.10292):215 – 228.

Harborne,J.b.91984):phytochmical Methods:Aguide to modern techniques of plants analysis, 2nd edition, London,UK.

De Castro,S.L.(2001): Propolis : Biological and pharmacologicall activities. Therapeutic uses of this product. Ann.Rev.Biomed.Sc.3:49 – 83.

ISSN 2072-3875