

# Investigação da Qualidade da Própolis Adquirida em Minas Gerais

## Investigation of Quality of Propolis Acquired in Minas Gerais

Maria Cristina Marcucci,<sup>a,\*</sup> Adriana Melo,<sup>b</sup> Mara Junqueira Carneiro,<sup>c</sup> Paulo Cesar Pires Rosa<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Avenida Engenheiro Francisco José Longo - 777/778, Jardim São Dimas, CEP 12245-000, São José dos Campos-SP, Brasil.

<sup>b</sup>Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, Etec Dr. Carolino da Motta e Silva, Av. Hélio Vergueiro Leite s/n, Jardim Universitário, CEP 13990-000, Espírito Santo do Pinhal-SP, Brasil.

<sup>c</sup>Instituto Agrônomo de Campinas, Departamento de Fitoquímica, Fazenda Santa Elisa, CEP 13075-630, Campinas-SP, Brasil.

<sup>d</sup>Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rua Cândido Portinari-100, Barão Geraldo, CEP 13083-871, Campinas-SP, Brasil.

\*E-mail: [cristina.marcucci@unesp.br](mailto:cristina.marcucci@unesp.br)

Recebido: 17 de Setembro de 2022

Aceito: 24 de Agosto de 2023

Publicado online: 9 de Outubro de 2023

Propolis is a resin produced by bees from buds and exudates of plant sources. Its use is increasing exponentially, especially after reports of its use as an adjuvant in the therapy against COVID-19. In this scenery, many products can be found on the market, which do not have the minimum quality characteristics established by government agencies, and the most serious, some of them are true frauds, inducing the consumer to use something that is nothing more than a panacea. The objective of this work was to evaluate the physicochemical characteristics of four propolis extracts, the antimicrobial and antioxidant activity, in order to observe frauds practiced in MG. Qualitative and quantitative tests, the HPLC profile, the antioxidant and antimicrobial activities were performed. Samples 1 to 3 showed several non-conformities in relation to what is recommended in the Brazilian Legislation, a fact that is reflected in the weak antioxidant and antimicrobial activity. Sample 4 presented all compliant results. The chemometrics analysis showed the separation of propolis, highlighting the difference between true (4) and false samples. This work showed the evident fraud in bee products offered on the market, especially propolis, and alerted a greater inspection by the government agencies.

**Keywords:** Propolis; adulteration; quality control; antioxidant activity; antibacterial activity

## 1. Introdução

A própolis é elaborada pelas abelhas a partir de brotos e exsudatos de plantas.<sup>1</sup> A palavra própolis vem do grego e quer dizer *pro*, em defesa de e *polis* a cidade.<sup>2</sup> Portanto, a função da própolis é a de defender a colmeia, protegendo-a contra predadores que podem trazer algum dano.<sup>3</sup> É constituída de material resinoso e/ou balsâmico coletado de plantas que estão ao redor da colméia, contendo substâncias químicas que possuem alto poder antioxidante e antimicrobiano.<sup>4</sup> Estas substâncias são produzidas pelas plantas para a sua defesa contra insetos, vírus, bactérias e fungos. Na colmeia, as abelhas misturam esse material com saliva e cera, utilizando-o para a sua vedação.<sup>5</sup> É comum encontrar insetos “mumificados” os quais foram mortos pelas abelhas e estas, não podendo colocá-los para fora da colmeia, envolvem-no em própolis, impedindo a sua putrefação.<sup>6</sup> Até camundongos foram encontrados mumificados, dentro e na entrada da colmeia, em perfeito estado de conservação.<sup>7,8</sup> A própolis era utilizada em processos de mumificação no antigo Egito, existem relatos de múmias descobertas em sarcófagos, de onde exalava um forte odor de resina.<sup>9,10</sup> Também era empregada na fabricação dos famosos violinos Stradivarius, para sua melhor conservação.<sup>11</sup>

Basicamente, a própolis possui em sua composição alguns flavonoides e ácidos aromáticos, terpenos e outras substâncias químicas que são responsáveis pelas propriedades biológicas.<sup>12</sup> Quanto maior o teor de flavonoides e polifenóis, mais ativa é a própolis contra os radicais livres, por exemplo.<sup>13</sup>

Muitos estudos realizados em diferentes partes do mundo, comprovaram a sua eficácia contra microrganismos, tumores, também atuando no sistema imunológico e como anti-inflamatório.<sup>14-17</sup> Foi relatada a atividade antiviral da própolis frente ao poliovírus tipo 1 (PV1),<sup>18</sup> da poliomielite,<sup>19</sup> da influenza,<sup>20</sup> HIV,<sup>21</sup> H1N1,<sup>22</sup> hepatite viral,<sup>23</sup> vírus da herpes tipo 1<sup>24</sup> e tipo 2,<sup>25</sup> vírus envolvido na dengue hemorrágica<sup>26</sup> e em coronavírus de origem animal.<sup>27</sup> Vários trabalhos foram publicados sobre a eficácia da própolis como adjuvante na terapêutica contra o vírus da COVID-19.<sup>28-33</sup>

Sintetizando, a própolis é muito útil no tratamento de infecções, especialmente de garganta, por conta de ser ativa contra o *Staphylococcus aureus*. Atua no sistema imunológico, promovendo uma boa defesa ao indivíduo, além de ser um potente antioxidante, atuando no combate a radicais livres. Seu uso deve ser feito com cautela, pois todo produto natural, pode fazer mal, quando usado indiscriminadamente.

Geralmente o consumo se dá na forma de extrato de própolis alcoólico ou aquoso. A legislação brasileira prevê que seja comercializado o extrato de própolis com teor mínimo de 11% de concentração, um teor de cera de no máximo 1%, flavonoides no mínimo 0,25% e polifenóis de no mínimo 0,50%.<sup>34</sup> Outro parâmetro extremamente importante é a atividade antioxidante, que mede se a própolis é nova, não oxidada e se atende a esses conteúdos de flavonoides e polifenóis preconizados pela legislação. Esse parâmetro não está contemplado na legislação brasileira como requisito de qualidade. Quanto maior o teor de flavonoides e polifenóis, mais ativa é a própolis contra os radicais livres.<sup>7,12</sup>

Atualmente, a procura por própolis cresceu de maneira exponencial, principalmente após a divulgação de notícias sobre o seu uso como adjuvante na terapêutica contra a COVID-19.<sup>35</sup> Com isso muitos produtos podem ser encontrados no mercado. No entanto, nem todos atendem às características mínimas de qualidade estabelecidas por órgãos governamentais e, o mais grave, alguns deles são adulterados, induzindo o consumidor a utilizar um produto que não passa de uma panaceia. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas de quatro amostras de “extrato de própolis” do Estado de Minas Gerais de acordo com o preconizado na legislação. E avaliar a atividade microbiológica das amostras, com a finalidade de verificar a autenticidade dos produtos.

## 2. Experimental

### 2.1. Características das amostras

Foram adquiridas três amostras de “extrato de própolis” em mercados de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, no período de julho a dezembro de 2020, denominadas de amostra **1**, amostra **2** e amostra **3**. A amostra **4** foi utilizada como padrão de comparação, por ser de empresa idônea. A resina bruta foi colhida em Bambuí-MG e o extrato a 21% foi disponibilizado pela empresa Bee Propolis, da mesma localidade.

### 2.2. Análises físicas e físico-químicas

Para as amostras foi determinado o volume de cada frasco e a densidade, sendo calculada a média da triplicata.

### 2.3. Provas qualitativas de controle de qualidade

#### 2.3.1. Identificação de compostos fenólicos por espectrofotometria UV-Vis

Foi obtido o espectro UV-Vis de cada extrato, de acordo com o preconizado na legislação<sup>7,34</sup>, utilizando-se o espectrofotômetro UV-Vis, Marca: Femto (BPP) Modelo Cirrus 80 número de série 8013050034. Para tanto, foram pipetados 50 µL de cada extrato e transferidos para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com

etanol PA (Synth). Foram pipetados 300 µL dessa solução para um novo balão volumétrico e completou-se o volume até 10 mL com etanol. Procedeu-se a leitura de absorbância no espectrofotômetro UV-Vis, entre os comprimentos de onda de 200 a 400 nm. Segundo a legislação, o espectro deve apresentar um ou mais picos entre 250 – 350 nm.<sup>7,34</sup>

#### 2.3.2. Análises qualitativas da presença de flavonoides

Para cada amostra de própolis foi preparado um tubo contendo 500 µL do extrato. Adicionou-se 5 mL de etanol em cada um deles, agitando-se por 2 minutos. Transferiu-se 1 mL desta solução para dois tubos de ensaio. Adicionou-se aproximadamente 5 mL de água em todos os tubos. Em um dos tubos de cada amostra, adicionou-se 150 µL de NaOH (Synth) a 1M, observando-se a mudança de cor de amarelo pálido para amarelo ouro. No outro tubo não foi adicionado o NaOH, pois foi utilizado como “branco”.

Em outro ensaio realizado para análise qualitativa de flavonoides, foram preparados dois tubos de ensaio para cada amostra contendo 2,5 mL do extrato. Adicionou-se 7 mL de etanol em ambos os tubos. Em um dos tubos de cada amostra, adicionou-se 2,5 mL de acetato de chumbo (Ecibra) a 10%, observando-se a formação de precipitado. O outro tubo foi um “branco” que serviu como referência, ao qual não foi adicionado acetato de chumbo.

### 2.4. Análises quantitativas de controle de qualidade

#### 2.4.1. Teor de sólidos solúveis em etanol e de cera nos extratos

Foi utilizado o método gravimétrico para a análise e quantificação do teor de sólidos solúveis em etanol e de cera.<sup>5,7,36-38</sup>

#### 2.4.2. Teor de flavonoides totais expressos em quercetina

Utilizou-se o método de complexação do cloreto de alumínio com os flavonoides da própolis, empregando-se para a quantificação espectrofotométrica em 425 nm, uma curva padrão de quercetina (Sigma, EUA).<sup>37-39</sup>

#### 2.4.3. Teor de fenóis totais expressos em ácido gálico

Empregou-se o método espectrofotométrico da reação de Folin-Ciocalteu (Sigma, EUA) em meio básico (solução de carbonato de sódio da Synth a 20%) com os compostos fenólicos da própolis, utilizando-se para a quantificação espectrofotométrica em 760 nm, uma curva padrão de ácido gálico (Synth).<sup>37-39</sup>

#### 2.4.4. Determinação quantitativa dos marcadores por HPLC

Para a determinação do conteúdo de marcadores na própolis, utilizou-se a técnica de HPLC-DAD. A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido da Merck-Hitachi (Darsmtadt, Alemanha) modelo D-7000 com injetor automático (Fapesp #95/09306-5). As condições cromatográficas foram fase móvel: ácido fórmico (PA, Merck)

diluído a 5% em água ultrapura (solvente A) e metanol de grau cromatográfico - Merck (solvente B). A vazão foi de 1 mL/min e foi utilizado um gradiente linear começando com 30% de B terminando com 90% de B, em uma corrida cromatográfica de 50 min. Os comprimentos de onda de detecção utilizados, foram 280 e 340 nm. Foi injetada uma curva padrão de ácido p-cumárico ( $R=0,99$ ) para a quantificação deste composto e do ácido Artepillin-C e derivados.<sup>37</sup>

#### 2.4.5. Determinação da atividade antioxidante

Determinou-se a atividade antioxidante pela cinética de descoloração do radical livre difenil-picril-hidrazila (DPPH da Sigma, EUA) numa concentração de 30  $\mu\text{M}$ .<sup>7</sup> As leituras foram feitas em comprimento de onda de 517 nm, em triplicata.

#### 2.4.6. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada frente as cepas: **BEC** (*Staphylococcus aureus* Brazilian Epidemic Clone of MRSA strain), **KP** (*Klebsiella pneumoniae* ATCC13693), **EC** (*Escherichia coli* ATCC 25922), **SA-** (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213). As amostras bacterianas foram mantidas em Caldo Muller-Hinton (MH) acrescido de 20% de glicerol e conservadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para o uso, foram repicadas em caldo Muller-Hinton, incubados durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , as quais foram utilizadas na padronização do inóculo. A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se uma cultura preparada a partir do crescimento bacteriano decorrido de 24 horas em caldo MH a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  e posteriormente, após agitação e consequente repouso, uma alíquota da suspensão foi transferida para outro tubo contendo solução salina estéril até atingir uma turvação comparável ao tubo da Escala McFarland correspondente a 0,5 (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) e seguida de leitura espectrofotométrica a 625 nm com absorbância de 0,10 a 0,15 (corresponde até a  $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). Para a utilização na microplaca, o inóculo foi diluído a 1:10 em solução salina estéril (obtendo-se uma suspensão correspondendo a  $1,5 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada utilizando-se a diluição em microplaca, segundo a Norma M7- A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards, porém com modificações descritas neste item.<sup>40</sup> O teste foi realizado em microplacas (ALFA- Ref. 809) estéreis de 96 orifícios, de fundo plano, com tampa. Foi utilizado caldo BHI (HIMEDIA) como meio de cultura. As amostras dos extratos foram preparadas a partir da solução estoque. Para cada bactéria foi testada uma cepa padrão, conforme mencionado anteriormente. Primeiramente, em cada poço foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de meio líquido (caldo BHI) estéril. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de cada amostra. Foram realizadas diluições seriadas na microplaca e as concentrações finais obtidas em cada poço estão mostradas na Tabela 1. Sequencialmente, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana ( $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) nos poços contendo as amostras. Posteriormente, as microplacas foram

levadas à estufa incubadora (Nova Instruments-Modelo NI 1523i) na temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. Fez-se o controle negativo em poços contendo somente o meio de cultura BHI e controle positivo com cloridrato de ciprofloxacino (CECON), na concentração de 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Concentração final do extrato de própolis em cada um dos poços por diluição seriada

Poço	0,6%*	0,5%*	4,1%*	12,7%
	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )**			
1	1450,0	1300,0	10300,0	31750,0
2	362,5	325,0	2575,0	7937,5
3	90,6	81,3	643,8	1984,4
4	22,7	20,3	160,9	496,1
5	5,7	5,1	40,2	124,0
6	1,4	1,3	10,1	31,0
7	0,4	0,3	2,5	7,8
8	0,1	0,1	0,6	1,9

\* Concentração original da tintura, 0,58% amostra 1, 0,52% amostra 2, 4,12% amostra 3 e 11% amostra 4. Os percentuais correspondem ao teor de sólidos solúveis em cada amostra. \*\*Concentração final do extrato de própolis no poço.

Após a incubação, utilizou-se o método de resazurina para a determinação da atividade antibacteriana e CIM. Para isto, foram adicionados aos 96 orifícios das microplacas, 50  $\mu\text{L}$  do corante resazurina (fenoxazin-3-ona, INLAB), preparado na concentração de 0,1  $\text{mg mL}^{-1}$  em solução salina estéril. Utilizada como indicador de óxidorredução, a resazurina apresenta-se de coloração azul em meio oxidado e de coloração rósea em meio reduzido. Posteriormente, as microplacas foram incubadas em estufa à temperatura de  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por no máximo duas horas, para a viragem de coloração. A CIM foi então determinada e definida como a menor concentração da amostra vegetal capaz de impedir a mudança de cor, ou seja, de inibir o crescimento celular. A coloração azul indica ausência de bactéria, e a coloração rosa indica a sua presença.

## 2.5. Análise quimiométrica e estatística

Os dados obtidos a partir das análises físico-químicas, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana das amostras de própolis foram submetidos à quimiometria no software online MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) acessado em novembro de 2021. Os dados foram autoescalados e submetidos à ANOVA seguido de teste Tukey com 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Análises físicas e físico-químicas

Foram observadas as informações constantes nos rótulos

dos produtos, de acordo com as Orientações para Análise de Rotulagem de Produtos Apícolas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).<sup>41</sup>

Todas as amostras apresentavam no rótulo informações sobre volume, data de fabricação e validade, teor de sólidos solúveis e registro SIF.

Existem várias irregularidades nas amostras de **1 a 3**, sendo as mais agravantes, a menção no rótulo de que o produto está descrito na Farmacopeia Brasileira, sendo que é uma inverdade (1). No caso ainda do produto 1, há a informação de alegações terapêuticas e modo de usar, sendo indicado para crianças. Esse tipo de registro não permite alegações terapêuticas, tampouco o modo de usar. Existem dúvidas quanto ao registro dos produtos 1 a 3 no Serviço de Inspeção Federal (SIF). A Tabela 2 traz as observações sobre as informações constantes nos rótulos dos produtos.

Os extratos 1, 2 e 3 apresentaram no rótulo valores de sólidos solúveis diferentes do que foi obtido no estudo, somente o extrato 4 apresentou valores de acordo com o que foi obtido no presente estudo (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra os resultados dos cálculos dos volumes e da densidade dos extratos.

Com respeito ao volume informado no rótulo, após a medição dos mesmos e a determinação da densidade, em nove replicatas, observa-se que nenhum dos frascos contém o volume informado, com o agravante que a amostra **1** apresenta 32% a mais do volume descrito no rótulo. Para essas medidas não existe uma referência.

### 3.2. Provas qualitativas de controle de qualidade

#### 3.2.1. Identificação de compostos fenólicos por espectrofotometria UV-Vis

Em relação ao espectro de absorção de radiações UV-visível, a legislação recomenda que o extrato de própolis apresente picos característicos das principais classes de flavonoides entre 200 nm e 400 nm.<sup>34</sup> A Figura 1 mostra os espectros UV-Vis dos três extratos.

Observa-se na Figura 1 que os extratos analisados não correspondem ao perfil preconizado na Legislação<sup>34</sup> para uma varredura entre 200 a 400 nm. As amostras **1** e **3** apresentam um espectro de absorção com valores baixíssimos, devido ao baixo teor de sólidos solúveis em ambas, de aproximadamente 0,5%. A amostra **2** que

**Tabela 2.** Especificação e observações sobre o rótulo dos produtos

Amostra/ Especificação	Registro no SIF*	Fabricação/ Validade	Volume declarado (mL)/ Conformidade**	Sólidos solúveis (%)/ Conformidade***	Alegações terapêuticas (proibido)	Outras observações
1/ Extrato de Própolis		Fabricação: 03/2020. Validade: 03/2025.	Volume declarado: 30 mL. Não conforme.	O produto, de acordo com essas informações, estaria a 20%. Não é o caso, o teor de sólidos solúveis foi de ~0,6%. Não conforme.	Produto com alegações terapêuticas e modo de usar, sendo indicado para crianças. Esse tipo de registro não permite alegações terapêuticas.	Menção no rótulo de que o produto está descrito na Farmacopeia Brasileira. O produto “Extrato de própolis” não está descrito na Farmacopeia brasileira.
2/ Extrato de Própolis	Supostamente tem registro no SIF. Tem número de lote e data de validade.	Fabricação: 06/2020. Validade: 06/2022.	Volume declarado: 30 mL. Não conforme.	O produto, de acordo com essas informações, estaria no mínimo a 11%. Não é o caso, o teor de sólidos solúveis foi de 4,5%. Não conforme.		
3/ Extrato de Própolis	Supostamente tem registro no SIF. Tem número de lote e data de validade.	Fabricação: 04/20. Validade: 04/22.	Volume declarado: 30 mL. Não conforme.	Não é o caso, o teor de sólidos solúveis foi de 0,5%. O produto, de acordo com essas informações, estaria a no mínimo 11%. Não conforme.		
4/ Extrato de Própolis	Tem registro no SIF. Tem número de lote e data de validade.	Data de fabricação: 04/20. Validade: 04/22.	Volume declarado: 30 mL. Conforme.	O produto está em conformidade, o teor de sólidos solúveis é de 11%.		

\* SIF: Serviço de Inspeção Federal. \*\*Vide Tabela 3. \*\*\*Vide Tabela 5.

**Tabela 3.** Teor de sólidos solúveis nos extratos de própolis

Amostra	Especificação Rótulo	Resultado obtido
1	20%	0,6%
2	mínimo 11%	4,2%
3	mínimo 11%	0,5%
4	11%	12,0%

**Tabela 4.** Cálculo do volume e da densidade dos produtos

Amostra	Volume (mL)*	CV%	Inc.
1	39,7 ± 1,5	3,9	0,9
2	29,3 ± 0,3	1,0	0,2
3	28,9 ± 0,2	0,6	0,1
4	30,5 ± 0,4	1,4	0,1
	Densidade (g mL <sup>-1</sup> )	CV%	Inc.
1	0,9073 ± 0,0190	2,0987	0,0110
2	0,8674 ± 0,0087	1,0075	0,0050
3	0,8653 ± 0,0108	1,2530	0,0063
4	0,8991 ± 0,0009	0,1030	0,0003

\*Média das determinações. DP é o desvio padrão. CV% é o coeficiente de variação em porcentagem [(desvio padrão/média)\*100], Inc é a incerteza da medida (desvio padrão/raiz (n, o número de medidas))

apresentou um teor de sólidos solúveis de 4,2% (Tabela 3) mostra um espectro de absorção com valores maiores, mas ainda assim, fora da especificação.

### 3.2.2. Análises qualitativas da presença de flavonoides

Foram realizados testes qualitativos da presença de flavonoides, empregando-se os reagentes NaOH (hidróxido de sódio) e PbOAc (acetato de chumbo) conforme visualizado na Tabela 5.

O NaOH se coordena com os flavonoides presentes no extrato de própolis, apresentando uma coloração amarelo

ouro. O acetato de chumbo precipita flavonoides, sendo uma reação inespecífica, mas recomendada pela normativa brasileira.<sup>34</sup> Para a amostra **1** o teste de NaOH foi negativo, indicando ausência de flavonoides no produto, pois não houve mudança de cor. O teste do acetato de chumbo foi inconclusivo, já que muitos compostos orgânicos reagem com este sal, ocorrendo a precipitação. Com respeito à amostra **2**, o teste de NaOH foi fracamente positivo, embora sendo qualitativo, pode-se ter uma ideia da pequena quantidade de flavonoides existentes no produto. Para essa amostra, o teste do acetato de chumbo foi inconclusivo. O mesmo ocorreu na amostra **3**. Com respeito à amostra **4**, observou-se a mudança de cor (NaOH) e a precipitação (PbOAc), indicando tratar-se de produto que atende ao preconizado na legislação brasileira.<sup>34</sup>

## 3.3. Análises quantitativas de controle de qualidade

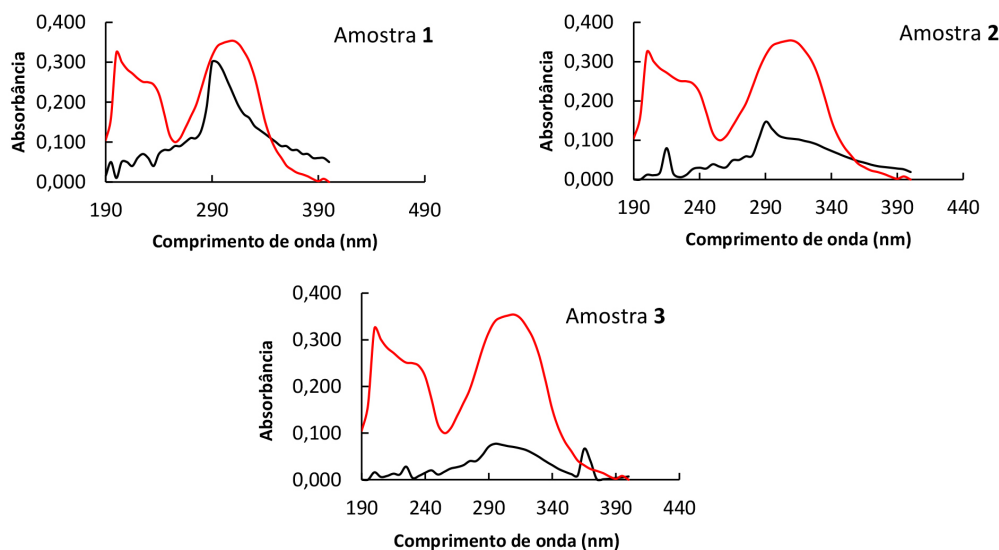
### 3.3.1. Teor de sólidos solúveis em etanol e teor de cera nos extratos

Foi realizada a determinação do teor de sólidos solúveis em etanol nas amostras, cujos valores são apresentados na Tabela 6. As análises foram realizadas em nove replicatas.

A legislação recomenda que o teor de sólidos solúveis em amostras de extrato de própolis seja de, no mínimo 11% (m/V).<sup>34</sup> Sendo assim, as amostras **1**, **2** e **3** apresentaram resultados de sólidos solúveis em etanol abaixo do recomendado na legislação. Já para a amostra **4**, o resultado está conforme. Para as amostras **2** e **3**, os resultados do teor de cera, não estão em conformidade, pois a legislação recomenda que em tintura de própolis seja de, no máximo 1% (m/m).<sup>34</sup> A amostra **4** apresenta todos os resultados em conformidade.

### 3.3.2. Teor de flavonoides e fenóis totais

O teor de flavonoides totais nos extratos foi determinado



**Figura 1.** Espectros de absorção de radiações UV-visível das três amostras (tracejado preto) em comparação com o extrato genuíno de própolis (tracejado vermelho, amostra **4**)

**Tabela 5.** Provas qualitativas da presença de flavonoides nos extratos

Amostra	NaOH*	PbOAc*	Conclusão
1	- (sem mudança de cor)	- (sem precipitado)	Teste negativo para flavonoides (NaOH) e inconclusivo com acetato de chumbo (PbOAc)
2	+/-	Inconclusivo	Teste fracamente positivo para flavonoides (NaOH) e inconclusivo com acetato de chumbo (PbOAc)
3	+/-	Inconclusivo	Teste fracamente positivo para flavonoides (NaOH) e inconclusivo com acetato de chumbo (PbOAc)
4	Positivo	Positivo	Em conformidade <sup>33</sup>

\* Teste em triplicata

**Tabela 6.** Teor de sólidos solúveis e de cera (% m/V) nas amostras

Amostra	Teor de sólidos solúveis* (% (m/V))	CV%	Inc.	Teor de cera* (% (m/V))	CV%	Inc.
1	0,5845 ± 0,0145	2,4853	0,0084	0,5633 ± 0,0271	4,8088	0,0156
2	4,1684 ± 0,1238	2,9695	0,0715	2,5969 ± 0,1776	6,8397	0,1025
3	0,5270 ± 0,0106	2,0044	0,0061	7,2481 ± 0,4699	6,4836	0,2713
4	12,7012 ± 0,0078	0,0618	0,0026	1,0008 ± 0,0009	0,0901	0,0003

\*Média das determinações. DP é o desvio padrão. CV% é o coeficiente de variação em percentagem [(desvio padrão/média)\*100], Inc é a incerteza da medida (desvio padrão/raiz de n, o número de medidas)

pelo método do cloreto de alumínio em metanol, empregando-se a quercetina como padrão. A análise foi realizada em 9 replicatas. O percentual de flavonoides totais foi calculado a partir da curva padrão de quercetina, cujo valor da correlação linear (R) foi de 0,999. O teor de fenóis totais nos extratos foi determinado pelo método de Folin Ciocalteu em água, empregando-se o ácido gálico como padrão. A análise foi realizada em 9 replicatas. O percentual de fenóis totais foi calculado a partir da curva padrão de ácido gálico, cujo valor da correlação linear (R) foi de 0,994. A Tabela 7 mostra os valores de flavonoides expressos em quercetina e de fenóis totais expressos em ácido gálico (% m/m).

Com referência aos resultados encontrados, as amostras **1** e **2** apresentam resultados não conformes. Somente as amostras **3** e **4** apresentam o teor de flavonoides totais dentro do preconizado pela Legislação, que é de no mínimo 0,25% (m/m) para própolis em extrato.<sup>34</sup> Com respeito ao teor de fenóis totais, as amostras **1** e **3** apresentam resultados não conformes. As amostras **2** e **4** apresentam o teor de fenóis totais dentro do preconizado pela Legislação, que é de no mínimo 0,50% (m/m) para própolis em extrato.<sup>34</sup>

### 3.3.3. Determinação quantitativa dos marcadores por HPLC

A análise por HPLC foi realizada e quantificou-se o teor do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin-C), o principal marcador da própolis de *Baccharis dracunculifolia* (verde) além de ser o composto mais abundante. Os cromatogramas dos quatro extratos são mostrados na Figura 2.

Observa-se, nos cromatogramas mostrados na Figura 2, que a faixa de absorvância (circulada em vermelho) que para a amostra **1** é de 0,000 a 0,020, **2**: 0,000 a 0,005, **3**: 0,000 a 0,150 e **4**: de 0,000 a 1,000. Foi injetado o mesmo volume para todos os extratos, a saber, 20 µL, indicando que a concentração dos compostos bioativos é muito baixa nas amostras **1** a **3**. O teor de Artepillin C em % (m/V) foi na amostra **1** de 0,0004%, na **2** de 0,0034%, na **3** de 0,0428 e na **4** de 0,647%. Estes resultados indicam que a amostra **4** é a única que apresenta valores consideráveis do marcador, mostrando mais uma vez que se trata de amostra verdadeira. Matsuda e Almeida-Muradian<sup>42</sup> validaram um método analítico para a quantificação do Artepillin-C em própolis brutas brasileiras. O teor encontrado variou entre 0,10 e

**Tabela 7.** Teor de flavonoides totais expressos em quercetina (% m/m) e de fenóis totais (% m/m) expressos em ácido gálico nas amostras

Amostra	Flavonoides (% (m/m))	CV%	Inc.	Fenóis (% (m/m))	CV%	Inc.
1	0,032 ± 0,003	6,442	0,001	0,487 ± 0,032	6,565	0,011
2	0,167 ± 0,017	5,994	0,005	0,562 ± 0,024	4,203	0,008
3	0,395 ± 0,021	5,360	0,007	0,456 ± 0,018	4,000	0,006
4	0,700 ± 0,001	0,033	0,001	8,202 ± 0,064	0,786	0,021

\*Média das determinações. DP é o desvio padrão. CV% é o coeficiente de variação em percentagem [(desvio padrão/média)\*100], Inc é a incerteza da medida (desvio padrão/raiz de n, o número de medidas)

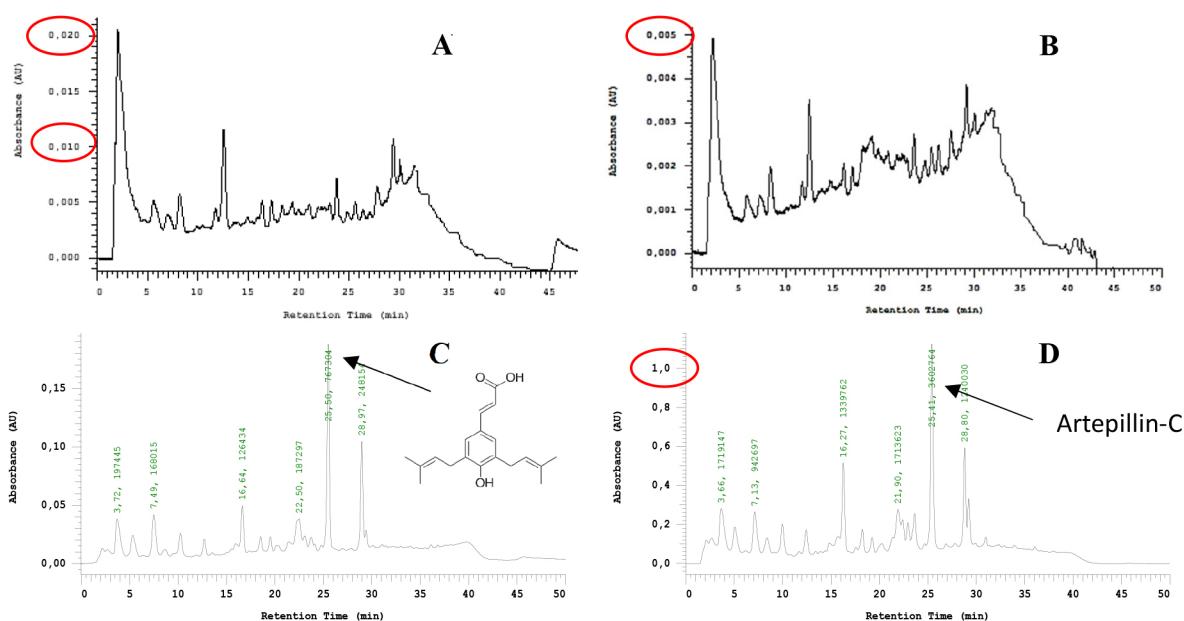


Figura 2. Cromatogramas em HPLC dos extratos. As setas indicam o pico do Artepillin-C, mostrado na estrutura química da Figura 2E. A: amostra 1, B: 2, C: 3 e D: 4. Estrutura química do Artepillin-C, fonte: www.sial.com

11,04% (m/m). No caso, o extrato genuíno de própolis está a 12,7% (m/V), o que daria um valor estimado para a amostra bruta de 5,09% (m/m). Esse valor é condizente com o normalmente encontrado para amostras brutas. Veiga *et al.*<sup>37</sup> encontraram o valor de 0,255% de Artepillin-C em um extrato etanólico de própolis de *Baccharis dracunculifolia*.

### 3.3.4. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de descoloração do radical livre DPPH (difenilpicrilhidrazila) monitorando-se a cinética em comprimento de onda de 517 nm. Os resultados são mostrados na Figura 3.

Quanto menor o valor da  $CE_{50}$ , maior a atividade antioxidante. Sendo assim, nota-se que o extrato da amostra 4 apresentou o melhor potencial antioxidante quando comparado com as demais amostras.

### 3.3.5. Atividade antimicrobiana

O método de difusão em ágar foi utilizado por fornecer resultados seguros, sendo um dos métodos mais

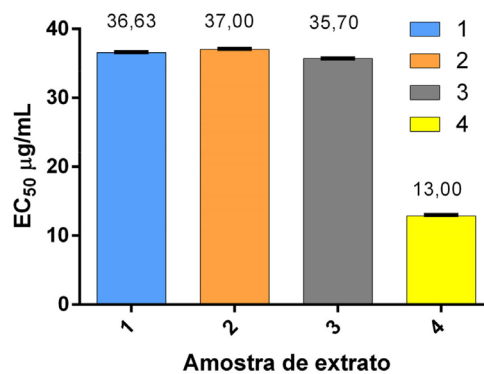


Figura 3. Atividade antioxidante dos extratos expressa em  $CE_{50}$  (dose que elimina 50% dos radicais livres, em  $\mu\text{g/mL}$ )

citados e utilizados na literatura na avaliação da atividade antimicrobiana de compostos naturais. De acordo com os resultados obtidos para a ação antimicrobiana das amostras testadas (Tabela 8), pode-se observar que as própolis 1, 2 e 3 praticamente não interferiram no crescimento de microrganismo. Nota-se que a amostra 4 apresentou

Tabela 8. Concentração inibitória mínima (CIM) em  $\text{mg mL}^{-1}$  e halos de inibição (mm) dos extratos

Bactérias	Amostras				Halo de inibição (mm)			
	CIM ( $\text{mg mL}^{-1}$ )							
	1	2	3	4	1	2	3	4
BEC	-	-	-	0,78	8,7	7,2	5,8	21,0
KP	-	-	-	12,5	5,0	4,0	3,0	18,1
EC	-	-	-	12,5	3,0	3,0	6,0	14,7
SA	-	-	-	0,39	-	-	-	21,3

BEC- *Staphylococcus aureus* Brazilian Epidemic Clone of MRSA strain; KP- *Klebsiella pneumoniae* ATCC13693; EC- *Escherichia coli* ATCC 25922; SA- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Controle (MIC): cloridrato de ciprofloxacina 35  $\mu\text{g/mL}$ . Controles (halo de inibição): Antibiótico Gentamicina (10  $\mu\text{g}$ ) – 16 mm e Cefalexina (30  $\mu\text{g}$ ) 15 mm. (-) Não foi possível determinar a CIM, sem atividade

atividade, inibindo o crescimento de todas as bactérias testadas. A Concentração Inibitória Mínima (CIM em mg mL<sup>-1</sup>) dos extratos foi determinada frente a cada microrganismo.

Os resultados da CIM mostram que as amostras **1**, **2** e **3** não apresentaram capacidade de inibir o crescimento dos microrganismos testados, pois valores de CIM maiores que 1 mg mL<sup>-1</sup> indicam que a amostra não possui atividade inibitória frente às bactérias testadas<sup>43,44</sup>. Já a amostra **4** apresentou valores de CIM abaixo de 1 mg mL<sup>-1</sup> para bactérias Gram-positivas, outros autores já relataram a maior sensibilidade de bactérias Gram-positivas aos extratos de própolis<sup>45-47</sup>, provavelmente devido a característica da membrana da parede celular<sup>48</sup>. Além disso, alguns estudos relatam que a própolis age reduzindo a motilidade de bactérias e sua atividade enzimática<sup>49</sup>.

### 3.4. Análise quimiométrica e estatística

A análise de componentes principais (ACP) distinguiu os 4 grupos de amostras de própolis. De acordo com o teste estatístico aplicado, teste Tukey com 95% de confiança, todas as 14 variáveis analisadas foram significativas para a separação das amostras. O componente principal 1 (CP1) explicou 84,7% da variação dos dados e CP2 explicou 12,1% (Figura 4A). Assim, o gráfico CP1xCP2 explicou 96,8% da variação dos dados. Em CP1 nota-se correlação negativa com o grupo **4** e positiva com os demais grupos. As amostras dos grupos **1**, **2** e **3** apresentaram características semelhantes entre si, pois todas estão localizadas no mesmo quadrante de CP1, que explica maior porcentagem dos dados.

O gráfico *biplot* (Figura 4B) mostra como as variáveis colaboraram para o agrupamento das amostras, ou seja,

as variáveis associadas a determinado grupo, são vistas deslocadas no sentido desse grupo. Sendo assim, nota-se que a amostra **4** está associada com a maioria das variáveis analisadas, exceto cera e densidade, que estão mais associadas às amostras **3** e **1**, respectivamente.

Através da análise multivariada dos dados foi possível observar de forma clara a diferença entre as amostras de extrato de própolis. Sendo destacada a diferença entre a amostra original (**4**) e as amostras possivelmente adulteradas do produto (**1** a **3**).

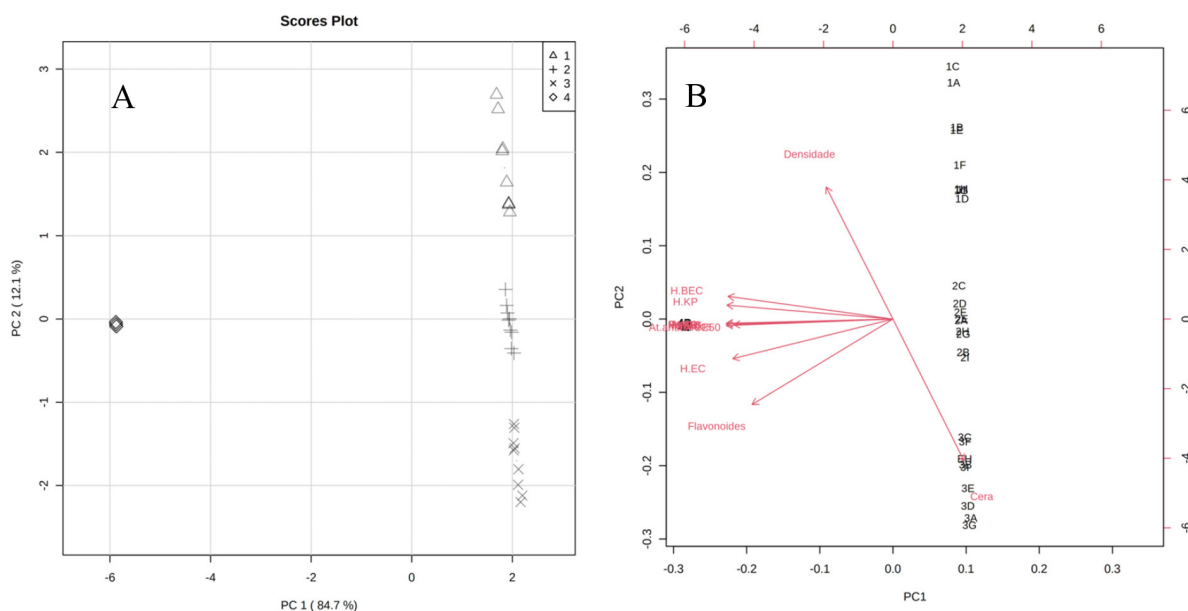
A quimiometria é uma ferramenta útil e aplicada com frequência neste tipo de estudo, quando se quer verificar a relação entre diferentes amostras e as variáveis analisadas.

## 4. Conclusão

As amostras **1**, **2** e **3** apresentaram várias não conformidades em relação ao preconizado na Legislação Brasileira e, também, com respeito às informações contidas nas próprias embalagens. Através da determinação de alguns parâmetros selecionados foi possível distinguir a amostra verdadeira das amostras falsas utilizando-se a análise multivariada dos dados. Este trabalho mostrou o cenário de fraudes desse produto e alerta para uma maior fiscalização por parte dos órgãos competentes.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a empresa Bee Própolis de Bambuí-MG pelo fornecimento da amostra referência do extrato de própolis.



**Figura 4.** Análise de componentes principais (PCA) de amostras de própolis quanto às suas características físicas, químicas e biológicas. A) Scores plot (PC1xPC2), B) Biplot (PC1xPC2)



## Referências Bibliográficas

- Gardini, S.; Bertelli, D.; Marchetti, L.; Graziosi, R.; Pinetti, D.; Plessi, M.; Marcazzan, G. L. Chemical Composition of Italian Propolis of Different Ecoregional Origin. *Journal of Apicultural Research* **2018**, *57*, 639. [Crossref]
- Plunkett, A. Products from the Hive: Propolis. *NAHA's Aromatherapy Journal* **2020**, *4*, 31. [Crossref]
- Mamillapalli, V.; Tiyyagura, V.M.; Katamneni, M.; Khantamneni, P.L. Bee Propolis-A Novel Perspective. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research* **2018**, *5*, 167. [Crossref]
- Peixoto, M.; Freitas, A.S.; Cunha, A.; Oliveira, R.; Almeida-Aguiar, C. Antioxidant and antimicrobial activity of blends of propolis samples collected in different years. *LWT-Food Science and Technology* **2021**, *145*, 11131. [Crossref] [PubMed]
- Marcucci, M. C.; Salatino, A.; Oliveira, L. F. A. M.; Gonçalves, C. P. Metodologias Acessíveis para a Quantificação de Flavonoides e Fenóis Totais em Própolis. *Revista. Virtual Química* **2021**, *13*, 61. [Crossref]
- Wang, X.; Hu, H.; Luo, Z.; Liu, Y.; Zhang, H. A plant origin of Chinese propolis: *Populus canadensis* Moench. *Journal of Apicultural Research* **2017**, *57*, 228. [Crossref]
- Marcucci, M.C.; Oliveira, L.F.A.M.; Gonçalves, C.P.; De Carvalho, C. Espectroscopia Uv-Vis e Reação com o Radical DPPH para a Detecção de Flavonoides e Determinação do Potencial Antioxidante de Extratos de Própolis. *Revista Eletrônica de Ciências Exatas* **2020**, *1*, 1. [Crossref]
- Silva-Carvalho, R.; Baltazar, F.; Almeida-Aguiar, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities that Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, *2015*, 206439. [Crossref] [PubMed]
- Kartal, M.; Yıldız, S.; Kaya, S.; Kurucu, S.; Topçu, G. Antimicrobial Activity of Propolis Samples from Two Different Regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, *86*, 69. [Crossref] [PubMed]
- Khorasgani, E.M.; Karimi, A.H.; Nazem, M.R. A Comparison of Healing Effects of Propolis and Silver Sulfadiazine on Full Thickness Skin Wounds in Rats. *Pakistan Veterinary Journal* **2010**, *30*, 72. [Crossref]
- Hayriye, A.L.P. Effects of Propolis on Immune System. *Anadolu Journal of Aegean Agriculture Research Institute* **2018**, *28*, 99. [Crossref]
- De Carvalho, C.; Fernandes, W.H.C.; Moutinho, T.B.F.; De Souza, D.M.; Marcucci, M.C.; D'Alpino, P.H.P. Evidence-Based Studies and Perspectives of the Use of Brazilian Green and Red Propolis in Dentistry. *European Journal of Dentistry* **2019**, *13*, 453. [Crossref] [PubMed]
- Alves, E.; Kubota, E.H. Conteúdo de Fenólicos, Flavonoides Totais e Atividade Antioxidante de Amostras de Própolis Comerciais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2013**, *34*, 37. [Crossref]
- Pobiega, K.; Kras'niewska, K.; Derewiaka, D.; Gniewosz, M. Comparison of the Antimicrobial Activity of Propolis Extracts Obtained by Means of Various Extraction Methods. *Journal of Food Science and Technology* **2019**, *56*, 5386. [Crossref] [PubMed]
- Sepúlveda, C.; Núñez, O.; Torres, A.; Guzmán, L.; Wehinger, S. Antitumor Activity of Propolis: Recent Advances in Cellular Perspectives, Animal Models and Possible Applications. *Food Reviews International* **2019**, *36*, 429. [Crossref]
- Mojarab, S.; Shahbazzadeh, D.; Moghbeli, M.; Eshraghi, Y.; Bagheri, K.P.; Rahimi, R.; Savoji, M.A.; Mahdavi, M. Immune Responses to HIV-1 Polytope Vaccine Candidate Formulated in Aqueous and Alcoholic Extracts of Propolis: Comparable Immune Responses to Alum and Freund Adjuvants. *Microbial Pathogenesis* **2020**, *140*, 103932. [Crossref] [PubMed]
- Nani, B.D.; Sardi, J.C.O.; Lazarini, J.G.; Silva, D.R.; Massariolli, A.P.; Cunha, T.M.; De Alencar, S.M.; Franchin, M.; Rosalen, P.L. Anti-inflammatory and Anti-Candida Effects of Brazilian Organic Propolis, a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, *68*, 2861. [Crossref] [PubMed]
- Búfalo, M.C.; Figueiredo, A.S.; De Sousa, J.P.B.; Candeias, J.M.G. Bastos, J.K.; Sforzin, J.M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* **2009**, *107*, 1669. [Crossref] [PubMed]
- Pobiega, K.; Gniewosz, M.; Kras'niewska, K. Antimicrobial and Antiviral Properties of Different Types of Propolis. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* **2017**, *589*, 69. [Crossref]
- Kai, H.; Obuchi, M.; Yoshida, H.; Watanabe, W.; Tsutsumi, S.; Park, Y.K.; Matsuno, K.; Yasukawa, K.; Kurokawa, M. *In vitro* and *in vivo* Anti-Influenza Virus Activities of Flavonoids and Related Compounds as Components of Brazilian Propolis (AF-08). *Journal of Functional Foods* **2014**, *8*, 214. [Crossref]
- Ito, J.; Chang, F.-R.; Wang, H.-K.; Park, Y.K.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K.-H. Anti-AIDS Agents. 48. (1) Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. *Journal of Natural Products* **2001**, *64*, 1278. [Crossref] [PubMed]
- Urushisaki, T.; Takemura, T.; Tazawa, S.; Fukuoka, M.; Hosokawa-Muto, J.; Araki, Y.; Kuwata, K. Caffeoylquinic Acids are Major Constituents with Potent Anti-Influenza Effects in Brazilian Green Propolis Water Extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2011**, *2011*, 254914. [Crossref] [PubMed]
- El-Mahalaway, A.M.; Selim, A.A.; Mahboub, F.A.R. The Potential Protective Effect of Propolis on Experimentally Induced Hepatitis in Adult Male Albino Rats. *Histological and Immunohistochemical Study. Journal of Histology and Histopathology* **2015**, *2*, 14. [Crossref]
- Shimizu, T.; Takeshita, Y.; Takamori, Y.; Kai, H.; Sawamura, R.; Yoshida, H.; Watanabe, W.; Tsutsumi, A.; Park, Y.K.; Yasukawa, K.; Matsuno, K.; Shiraki, K.; Kurokawa, M. Efficacy of Brazilian Propolis against Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mice and Their Modes of Antitherapeutic Efficacies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2011**, *2011*, 976196. [Crossref] [PubMed]
- Sartori, G.; Pesarico, A. P.; Pinton, S.; Dobrachinski, F.; Roman,

- S. S.; Pauletto, F.; Prigol, M. Protective Effect of Brown Brazilian Propolis Against Acute Vaginal Lesions Caused by Herpes Simplex Virus Type 2 in Mice: Involvement of Antioxidant and Anti-Inflammatory Mechanisms. *Cell Biochemistry and Function* **2011**, *30*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
26. Soroy, L.; Bagus, S.; Yongkie, I.P.; Djoko, W. The Effect of a Unique Propolis Compound (Propoelix™) on Clinical Outcomes in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. *Infection and Drug Resistance* **2014**, *7*, 323. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
27. Ferreira, L.N.; Finger, P. F.; Castro, C. C.; Siedler, B. S.; Munhoz, L. S.; Vargas, G. D.; Fischer, G.; Hübner, S.O. Effect of the Ethanolic Extract from Green Propolis on Production of Antibodies after Immunization Against Canine Parvovirus (CPV) and Canine Coronavirus (CCoV). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **2012**, *49*, 116. [[Crossref](#)]
28. Ali, A. M.; Kunugi, H. Propolis, Bee Honey, and Their Components Protect against Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review of *in silico*, *in vitro*, and Clinical Studies. *Molecules* **2021**, *26*, 1232. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
29. Fiorini, A.C.; Scorza, C.A.; Almeida, A.C.G.; Fonseca, M.C.M.; Finsterer, J.; Fonseca, F.L.A.; Scorza, F.A. Antiviral Activity of Brazilian Green Propolis Extract against SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome- Coronavirus 2) Infection: Case Report and Review. *Clinics* **2021**, *76*. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. Refaat, H.; Mady, F.M.; Sarhan, H.A.; Rateb, H.S.; Alaaeldin, E. Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. *International Journal of Pharmaceutics* **2021**, *592*, 120028. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
31. Ripari, N.; Sartori, A.A.; Honorio, M.S.; Conte, F.L.; Tasca, K.I.; Santiago, K.B.; Sforzin, J.M. Propolis Antiviral and Immunomodulatory Activity: A Review and Perspectives for COVID-19 Treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2021**, *73*, 281. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
32. Berretta, A.A.; Silveira, M.A.D.; Capcha, J.M.C.; De Jong, D. Propolis and its Potential against SARS-CoV-2 Infection Mechanisms and COVID-19 Disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2020**, *131*, 110622. [[Crossref](#)]
33. Dilokthornsakul, W.; Kosiyaporn, R.; Wuttipongwaragon, R.; Dilokthornsakul, P. Potential Effects of Propolis and Honey in COVID-19 Prevention and Treatment: A Systematic Review of *in silico* and Clinical Studies. *Journal of Integrative Medicine* **2022**, *20*, 114. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Sítio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>> Acesso em: 10 março 2022.
35. Attia, Y.A.; Giorgio, G.M.; Addeo, N.F.; Asiry, K.A.; Piccolo, G.; Nizza, A.; Di Meo, C.; Alanazi, N.A.; Alqurashi, A.D.; ElHack, M.E.A.; Khafaga, A.F.; Bovera, F. COVID-19 Pandemic: Impacts on Bees, Beekeeping, and Potential Role of Bee Products as Antiviral Agents and Immune Enhancers. *Environmental Science and Pollution Research* **2022**, *29*, 9592. [[Crossref](#)]
36. Marcucci, M.C.; Woisky, R.G.; [Salatino, A.](#) Uso de Cloreto de Alumínio na Quantificação de Flavonoides em Amostras de Própolis. *Mensagem Doce* **1998**, *46*, 3. [[Crossref](#)]
37. Veiga, R.S.; Mendonca, S.; Mendes, P.B.; [Paulino, N.](#); Mimica, M.J.; Lagareiro Netto, A.A.; Lira, I.S.; Cassina-Lopez, B.G.; Negrão, V.; Marcucci, M.C. Artepillin C and Phenolic Compounds Responsible for Antimicrobial and Antioxidant Activity of Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology* **2017**, *122*, 911. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
38. [Sawaya, A.](#); Cunha, I.B.S.; Marcucci, M.C. Analytical Methods Applied to Diverse Types of Brazilian Propolis. *Chemistry Central Journal* **2011**, *5*, 27. [[Crossref](#)]
39. Woisky, R.G. *Dissertação de Mestrado*, FCF da USP, São Paulo, Brasil. **1996**. [[Link](#)]
40. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Testes for Bacteria That Grow Aerobically. 11<sup>th</sup> ed. CLSI standard M07, Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. [[Link](#)]
41. Sítio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/empresario/arquivos/MANUALROTULAGEMMEL14082014.pdf>>. Acesso em: 12 março 2022.
42. Matsuda, A.H.; De Almeida-Muradian, L.B. Validated Method for the Quantification of Artepillin-C in Brazilian Propolis. *Phytochemical Analysis* **2008**, *19*, 179. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
43. Webster, D.; Taschereau, P.; Belland, R.J.; Sand, C.; Rennie, R.P. Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts; Preliminary Screening Studies. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, *115*, 140. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
44. Aligians, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. B. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 4168. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
45. Wiczorek, P.P.; Hudz, N.; Yezerska, O.; Horáčínová-Sedláčková, V.; Shanaida, M.; Korytniuk, O.; Jasicka-Misiak, I. Chemical variability and pharmacological potential of propolis as a source for the development of new pharmaceutical products. *Molecules* **2022**, *27*, 1600. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
46. Ribeiro, V.P.; Mejia, J.A.A.; Rodrigues, D.M.; Alves, G.R.; Pinheiro, A.M.F.; Tanimoto, M.H.; Bastos, J.K.; Ambrósio, S.R. Brazilian brown propolis: an overview about its chemical composition, botanical sources, quality control, and pharmacological properties. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2023**, *33*, 288. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
47. S ahib, A.A.; Hassan, W.R.; Al-Muhsen, F.A.; Abdul-Rasul, I.J.; Hadi, B.S. Synergism activity between propolis and various antibacterial drugs against multidrug resistance gram positive and gram-negative bacteria isolated from upper respiratory tract (URT). *HIV Nursing* **2023**, *23*, 441. [[Crossref](#)]
48. Almuhayawi, M.S. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2020**, *27*, 3079. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
49. Mirzoeva O. K., Grishanin, R. N., and Calder, P. C. "Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria," *Microbiological Research* **1997**, *152*, 239. [[Crossref](#)]