

Artigo original: Acesso aberto



## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS DE DIFERENTES ORIGENS

Autores: Túlio Custódio Reis<sup>1</sup>, Sannyele Alcantara Emiliano<sup>2</sup>, Francisco Eduardo de Carvalho Costa<sup>3</sup>, Maria Cristina Marcucci<sup>4,A</sup>

<sup>1</sup>Aluno do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Sapucaí - Pouso Alegre - MG.

<sup>2</sup>Instituto Beeva-Via Riacho Velho, Marechal Deodoro - Alagoas – Brasil.

<sup>3</sup> Docente do Instituto Nacional de Telecomunicações – Santa Rita do Sapucaí – Minas Gerais - Brasil

<sup>4</sup>Docente colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Diagnóstico Bucal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Ciências e Tecnologia – São José dos Campos – São Paulo - Brasil

### Resumo

A própolis é um produto natural utilizado pelas abelhas para vedar as frestas da colmeia, preservando-a contra microrganismos e invasores. Possui inúmeras atividades biológicas, como antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, reforçadora do sistema imunológico, entre outras. Considerando-se as atividades biológicas de diferentes tipos de própolis, foi preparada uma mistura de três amostras para se obter um extrato etanólico a 21%, denominada de *fusion*. No presente trabalho, avaliou-se a atividade antimicrobiana através da técnica de difusão em disco, dos extratos etanólicos da própolis silvestre, verde, vermelha e da *fusion*, contra cinco espécies de leveduras, seis linhagens de bactérias e um fungo. Os extratos obtidos apresentaram diferentes cores, característica devida a presença de distintos compostos fenólicos, inerentes a cada tipo de própolis. O extrato de própolis vermelha destacou-se na atividade antifúngica, seja contra células leveduriformes ou filamentosas. Conclui-se que a união de diferentes própolis num único extrato, aqui denominado *fusion*, apresenta resultados superiores ao esperado na maior parte dos testes.

Palavras-chave: própolis; fusion; atividade antimicrobiana.

<sup>A</sup>Autora correspondente:

Maria Cristina Marcucci - E-mail: [cris.marcucci@yahoo.com.br](mailto:cris.marcucci@yahoo.com.br) – Orcid : <https://orcid.org/0000-0002-8065-5618>

DOI: <https://doi.org/10.31415/bjns.v4i1.139> - Artigo recebido em: 20 de março 2021 ; aceito em 25 de março de 2021 ; publicado em 03 de abril de 2021 no Brazilian Journal of Natural Sciences, ISSN: 2595-0584, Vol. 4, N.1. Online em [www.bjns.com.br](http://www.bjns.com.br). Todos os autores contribuíram igualmente com o artigo. Os autores declaram não haver conflito de interesse Este é um artigo de acesso aberto sob a licença CC - BY: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

## Abstract

Propolis is a natural product used by bees to seal the hive and preserve it against microorganisms and invaders. It has numerous biological activities, such as antimicrobial, antioxidant, antitumor, immune system booster and others. Considering the biological activities of different types of propolis, a mixture of three samples, named *fusion*, was prepared to obtain an ethanolic extract at 21%. In the present work, the antimicrobial activity was evaluated using the disk diffusion technique, of ethanolic extracts from wild, green, red and *fusion* propolis, against five yeast species, six bacterial strains and a fungus. The extracts showed different colors, a characteristic due to the presence of different phenolic compounds, inherent to each type of propolis. The red propolis extract stood out in its antifungal activity, either against yeast or filamentous cells. It is concluded that the union of different propolis in a single extract, here called *fusion*, presents better results than expected in most tests.

Keywords: propolis; fusion; antimicrobial activity.

## Introdução

---

---

A própolis é uma substância resinosa, a defesa das abelhas, revestindo e fortalecendo as paredes internas da colmeia. Também é usada para cobrir buracos e rachaduras, reparar os favos, evitar invasões de insetos e reduzir o crescimento microbiano nas paredes da colmeia, impedindo a entrada de vento e água. É um produto elaborado pelas abelhas a partir de resinas contidas em brotos e exsudatos de árvores, chamados de metabólitos secundários, os quais a planta produz para a sua defesa contra microrganismos e insetos invasores (1,2). Era de se esperar que os compostos presentes na resina, produzissem efeitos similares nos seres humanos e é exatamente isso que ocorre. A própolis é um excelente produto antibacteriano, antifúngico e antiviral, além de atuar no sistema imunológico e ser um excelente antioxidante (3-5). Existe uma enorme biodiversidade no Brasil, portanto, em decorrência disso, existem vários tipos de própolis, incluindo a verde, a vermelha e a marrom, que são classificadas de acordo com a região produtora

(6). A própolis verde é produzida por abelhas *Apis mellifera*, cujas resinas provêm da planta nativa, *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim-do-campo (7). No entanto, a própolis de diferentes regiões geográficas pode apresentar variações na sua composição e vários tipos de própolis são encontrados no Brasil, incluindo a vermelha. A existência de própolis vermelha foi relatada em alguns países como México, China e Venezuela e no Brasil é encontrada na costa nordestina (Alagoas, Bahia, Paraíba, Sergipe e Pernambuco) (8). Estudos sobre as fontes vegetais de própolis vermelha não são muito extensos, como os encontrados sobre a própolis verde, por exemplo. A origem botânica da própolis vermelha em diversos países é diferente, pois o clima e a flora são específicos para cada região. No Brasil, a espécie *Dalbergia ecastaphyllum* foi relatada como sendo uma das fontes principais de coleta de resina vermelha pelas abelhas (9). Seu nome popular é rabo de bugio. A própolis

vermelha é biologicamente ativa, com atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral, entre outras (6-14). Os primeiros estudos sobre a própolis vermelha, relataram sua atividade contra psoríase, anti-inflamatória e analgésica (15, 16). A própolis e seus constituintes isolados foram comprovados como sendo agentes antitumorais e imunomoduladores *in vitro* e *in vivo* (17, 18). Existem outros tipos de própolis, pouco estudados, como a silvestre, originária da planta jurema preta (*Mimosa hostilis* Benth) que cresce em regiões ao norte do país (19). A identificação de novos constituintes na própolis brasileira, a maioria deles com atividades antibacterianas, antimicóticas e antirradicais livres, é mais uma confirmação do fato de que a mesma, independentemente de sua fonte vegetal e composição química, sempre possui essas atividades. Em estudos recentes, foi comprovada a sua atividade antiviral contra o coronavírus (3, 20, 21) e outras espécies de vírus (22). Toda a atividade comprovada em estudos

*in vitro*, *in vivo* e na terapêutica, se deve ao papel que a própolis desempenha na colmeia: é a “arma química” das abelhas contra os microrganismos patogênicos e fatores climáticos (23).

Pensando nas possibilidades terapêuticas da própolis, foi idealizada uma mistura contendo alguns tipos, como a silvestre (da *Mimosa hostilis* Benth), a verde (do alecrim, *Baccharis dracunculifolia*) e a vermelha (de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. e *Symphonia globulifera* L.f.). A mistura desses três diferentes tipos de própolis foi denominada de “*fusion*”, aliando-se os constituintes químicos da própolis verde, que são potentes agentes antioxidantes, antimicrobianos e atuantes no sistema imunológico, com a própolis vermelha, que possui constituintes com ação antitumoral, antimicrobiana e antioxidante, bem como a silvestre, potencializando os efeitos biológicos e farmacológicos no produto “*fusion*”. A **figura 1** mostra o aspecto de cada uma das própolis.

**Figura 1** – Aspecto da resina de própolis bruta, silvestre (da *Mimosa hostilis* Benth) (A), a verde (do alecrim, *Baccharis dracunculifolia*) (B) e a vermelha (de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. e *Symphonia globulifera* L.f.) (C).



Fonte: Jannyne Barbosa. Beeva.

A proposta do presente trabalho foi a de avaliar a atividade antimicrobiana dos três tipos de própolis em separado e da junção dos mesmos, a saber, da *fusion*.

## Material e Método

### Própolis:

As amostras de própolis silvestre (*Mimosa hostilis* Benth) e verde do alecrim (*Baccharis dracunculifolia*), foram ambas coletadas em Minas Gerais e a vermelha (*Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. e *Symphonia globulifera* L.f.) coletada em Alagoas e Bahia. As amostras foram trituradas e misturadas numa proporção de 40% de própolis verde, 35% de própolis silvestre e 25% de própolis vermelha, sendo assim denominada de "fusion".

### Preparação dos extratos:

Foram preparados extratos etanólicos das própolis a 21%, cuja concentração foi determinada pelo teor de sólidos solúveis em etanol.

### Determinação do teor de sólidos solúveis em etanol:

Retirou-se uma alíquota de 5mL de cada um dos extratos obtidos e colocou-se em um béquer de 25 mL previamente pesado. O béquer foi levado a estufa a 60°C durante 2 horas. Após este tempo, deixou-se esfriar em dessecador e pesado. Retornou-se o béquer para a estufa por mais 15 minutos, até peso constante. O procedimento foi realizado em triplicata. O teor de sólidos solúveis foi calculado segundo a fórmula:

$$\% \text{ sól.sol (m/V)} = \frac{(m_2 - f) \times 100}{V_a}$$

onde:  $m_2$  = massa final béquer com o extrato seco;  
 $f$  = massa inicial do béquer;  
 $V_a$  = volume da alíquota.

### Amostras microbianas:

O presente estudo fez uso de diferentes cepas da American Type Culture Collection (ATCC) e de cepas provenientes de outras coleções e estudos, respeitando-se os meios de cultura e temperaturas aconselhadas para o crescimento de cada cepa.

As cepas bacterianas utilizadas foram: *Bacillus subtilis* (ATCC® 6051™); *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC® 13311™); *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™); *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™); *Escherichia coli* (ATCC® 8739™); *Shigella* sp (cedida pela Universidade do Vale do Sapucaí). As cepas foram reativadas em meio TSA (agar tríptico de soja) (Kasvi, Brasil) (24) e os seus estoques foram armazenados em meio TSA inclinado em tubos, os quais foram mantidos refrigerados a 4 °C após o crescimento bacteriano.

As cepas de fungos leveduriformes utilizadas, foram: *Issatchenkia orientalis* (ATCC® 6258™) (anteriormente denominada *Candida krusei*); *Candida glabrata* (ATCC®MYA2950™); *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019™); *Cutaneotrichosporon dermatis* (ATCC® 204094™) (anteriormente denominada *Trichosporon mucoides*) e *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (ATCC®90113™). As cepas foram reativadas em meio Agar Sabouraud (Kasvi, Brasil) e os seus estoques foram armazenados em meio Agar Sabouraud inclinado em tubos, os quais foram mantidos refrigerados a 4 °C após o crescimento das mesmas.

A cepa de fungo filamentoso utilizada foi: *Aspergillus flavus* (FXX02011) de origem ambiental (solo) depositada na coleção da Embrapa CNPMA. Esta foi reativada em meio batata dextrose agar e os seus estoques foram armazenados pelo método de Castellani (25) em tubos do tipo antibiótico, os tubos foram mantidos refrigerados a 4 °C.

### Preparação dos meios de cultura para os testes de suscetibilidade:

Para o teste de suscetibilidade antibacteriana foi utilizado o meio Mueller-Hinton ágar (26) (Kasvi, Brasil). Para os testes com leveduras foi utilizado o meio agar Sabouraud (27) e para os fungos foi adotado o meio batata dextrose agar (24) (Kasvi, Brasil).

### Avaliação da suscetibilidade *in vitro* aos extratos de própolis:

Foi adotada a metodologia descrita no NCCLS (28) com modificações. A principal modificação foi que cada disco para antibiograma estéril e livre de outras substâncias (discos brancos estéreis LaborClin, Brasil) recebeu 20 µL do extrato a ser testado a (21%) utilizado num intervalo de tempo inferior a 20 min. A segunda modificação foi para o fungo filamentoso selecionado, para o qual aguardou-se o mesmo esporular, e depois feita uma suspensão de esporos com solução de Tween a 0,2% e posteriormente a quantidade de esporos padronizada para  $1 \times 10^6$  UFC/mL com contagem em câmara de Neubauer espelhada (Boeco, Alemanha). O mesmo teste, com a mesma cepa (bacteriana, leveduriforme e fúngica) e os mesmos extratos, foi repetido 5 vezes. As placas foram incubadas nas temperaturas indicadas para cada linhagem em incubadora refrigerada tipo B.O.D. 120 L (Solab, Brasil).

### Análise estatística:

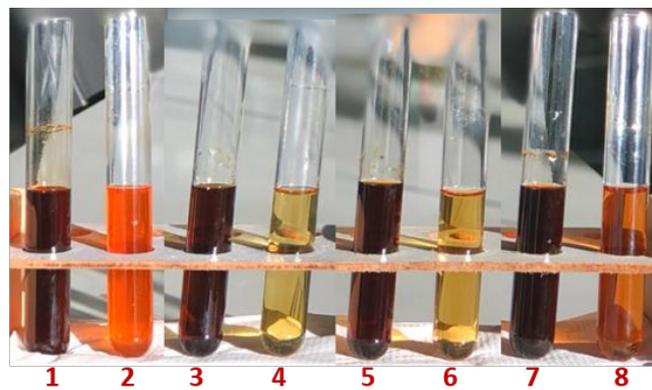
Foi realizado o teste análise de variância ANOVA complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, com um nível de significância (p) inferior a 5%. Para a análise dos dados foi utilizado o software R (<https://www.r-project.org/>).

## Resultados

### Extratos

Os extratos foram todos padronizados a uma concentração de 21%, após a determinação do teor de sólidos solúveis. O aspecto dos extratos obtidos de cada uma das própolis e da *fusion*, é mostrado na **figura 2**, a seguir.

**Figura 2** – Aspectos dos extratos etanólicos de própolis.

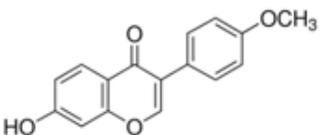
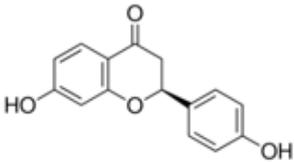
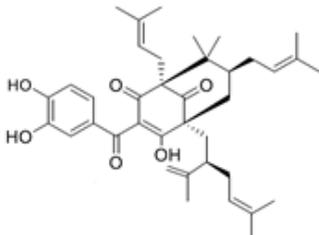
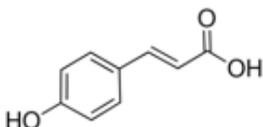
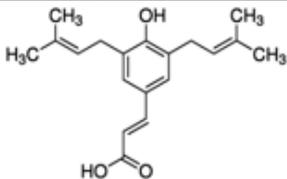
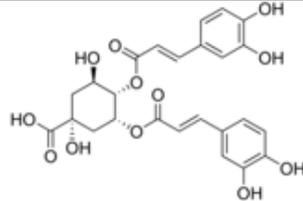
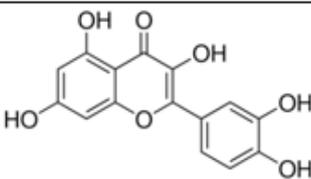
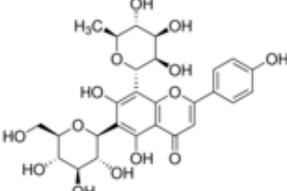
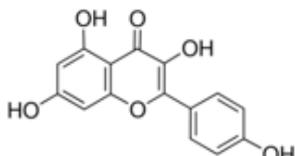


**Figura 2.** Legenda: (1) vermelha a 21%, (2) vermelha a 1%, (3) verde a 21%, (4) verde a 1%, (5) silvestre a 21%, (6) silvestre a 1%, (7) *fusion* a 21% e (8) *fusion* a 1%.

Fonte: Jannyne Barbosa. Beeva.

As distintas cores dos extratos, todos na mesma concentração, evidencia a existência de diferentes compostos químicos em cada um dos tipos de própolis. Por exemplo, a vermelha é rica em benzofenonas preniladas e flavonoides (9, 10), a verde em ácidos prenilados derivados do p-cumárico e ácidos cafeoilquínicos (29), a silvestre, alguns flavonoides como quercetina e kaempferol (30). A **tabela 1** mostra alguns desses compostos encontrados nesses tipos de própolis.

**Tabela 1** Alguns compostos encontrados em própolis brasileiras.

Própolis	Compostos identificados		
Vermelha			
	Formononetina	Liquiritigenina	Benzofenona prenilada
Verde			
	Ácido p-cumárico	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin-C)	Ácido 3,4-dicafeoilquinico
Silvestre			
	Quercetina	Violantina	Kaempferol

Fonte: [www.sial.com](http://www.sial.com). Benzofenona (Ccana-Ccapatinta et al., 2020).

### Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos quatro extratos, foi avaliada quanto ao halo de inibição (em mm). Os resultados mostrados na **tabela 2** a seguir, se referem a atividade dos extratos a 21% sobre leveduras. O extrato etanólico de própolis vermelha foi o que apresentou os melhores resultados contra as diferentes linhagens testadas. A mistura das diferentes própolis, aqui denominada fusão não atingiu os valores esperados para as cepas de *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019™) e a *Cryptococcus neoformans var. grubii* (ATCC®90113™).

**Tabela 2** - Atividade antimicrobiana em leveduras, dos extratos de própolis a 21%.

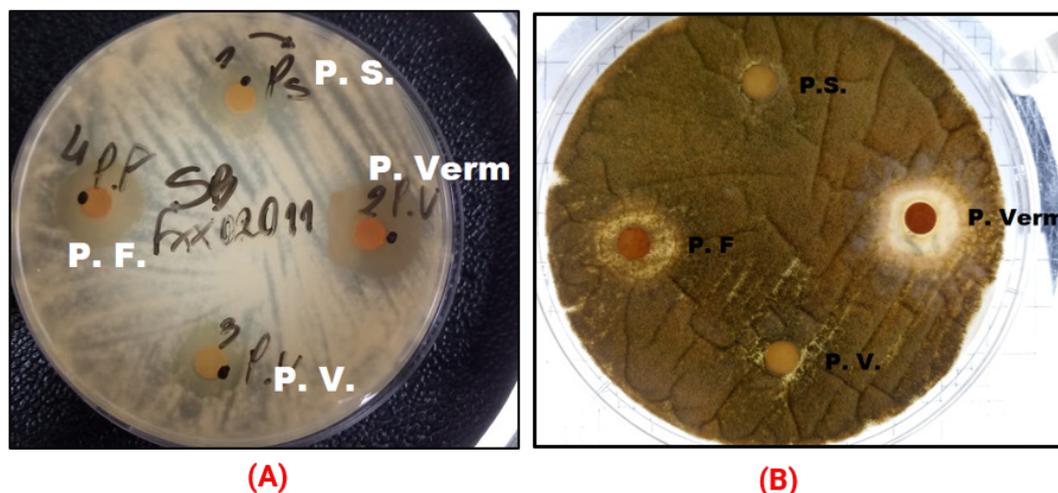
Própolis	Leveduras (halo de inibição em mm)*				
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
Silvestre	12,0 ± 1,0 <sup>c</sup>	15,7 ± 2,5 <sup>a</sup>	11,7 ± 1,5 <sup>c</sup>	9,7 ± 1,5 <sup>b</sup>	8,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
Verde	11,3 ± 0,6 <sup>c</sup>	10,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	15,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	9,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	8,3 ± 0,6 <sup>a</sup>
Vermelha	21,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	14,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	19,0 ± 3,5 <sup>a</sup>	19,7 ± 1,5 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,6 <sup>a</sup>
<i>Fusion</i>	15,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	10,7 ± 1,5 <sup>b</sup>	15,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	10,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	9,3 ± 0,6 <sup>a</sup>
Valor ideal <i>fusion</i> <sup>#</sup>	<b>14,15</b>	<b>13,00</b>	<b>14,85</b>	<b>12,04</b>	<b>8,44</b>

\* Média de triplicata. <sup>#</sup> Considerando-se a mistura numa proporção de 40% de própolis verde, 35% de própolis silvestre e 25% de própolis vermelha, sendo assim denominada de “*fusion*”. (A) *Issatchenkia orientalis* (ATCC® 6258™) (*C. krusei*); (B) *Candida glabrata* (ATCC®MYA2950™); (C) *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019™); (D) *Cutaneotrichosporon dermatis* (ATCC® 204094™) (T mucoides); (E) *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (ATCC®90113™). Letras iguais indicam não haver diferença estatística (Teste de Tukey 5%).

A **figura 3** apresenta uma placa demonstrando os halos de inibição dos extratos, frente ao fungo *Aspergillus flavus* (FXX02011) de origem ambiental (solo) depositado na coleção da Embrapa CNPMA. Os resultados mostrados na **tabela 3** se referem a atividade dos extratos a 21% em fungos. Com 48 horas de incubação (**figura 3 A**) observa-se a inibição da germinação dos esporos pelos diferentes extratos de própolis testados.

Decorridas 96 horas (**figura 3 B**) observa-se que a própolis vermelha continua inibindo a germinação dos esporos formados na placa, assim como impede o crescimento micelial no seu entorno. Da análise dos halos de inibição, observa-se um maior efeito antifúngico do extrato etanólico da própolis vermelha seguida pela extrato etanólico da própolis *fusion*.

**Figura 3** – Presença de halos de inibição dos extratos frente ao fungo *Aspergillus flavus* (FXX02011) com 48 horas de crescimento dos esporos (A) e 96 horas de crescimento dos esporos (B).



Legenda: P.S. é a própolis silvestre, PVerm. a vermelha, P.V. a verde e P.F. a *fusion*.

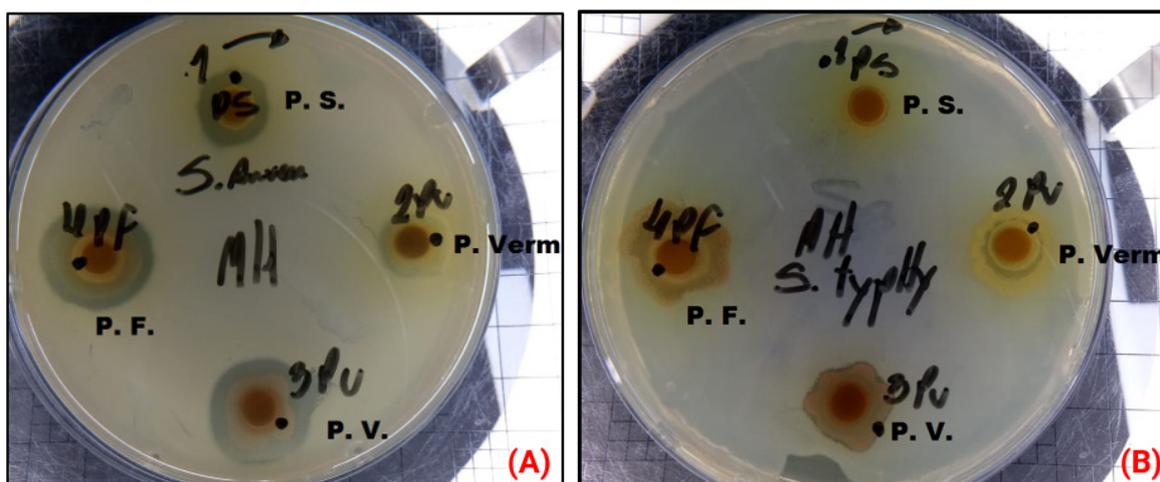
**Tabela 3** - Atividade antimicrobiana em fungos, dos extratos de própolis a 21%.

Própolis	Fungos (halo de inibição em mm)*		
	(L)	(M)**	(N)**
Silvestre	13,7 ± 0,6 <sup>c</sup>	Nulo	Nulo
Verde	13,7 ± 1,2 <sup>c</sup>	Nulo	Nulo
Vermelha	19,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	Total	Total
<i>Fusion</i>	17,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	Fraco	Nulo
Valor ideal <i>fusion</i> <sup>#</sup>	15,2		

\* Média de triplicata. # Considerando-se a mistura numa proporção de 40% de própolis verde, 35% de própolis silvestre e 25% de própolis vermelha, sendo assim denominada de "fusion". (L) *Aspergillus flavus*; (M) *Aspergillus flavus* após 48h e crescimento vegetativo; (N) *Aspergillus flavus* após 96h e crescimento vegetativo. \*\* Inibição do crescimento vegetativo. Letras iguais indicam não haver diferença estatística (Teste de Tukey 5%).

A **figura 4** apresenta uma placa demonstrando os halos de inibição dos extratos, frente a bactérias Gram positiva (*S. aureus*) e Gram negativa (*S. enterica*). Os resultados mostrados na **tabela 4** a seguir, se referem a atividade dos extratos a 21% em bactérias.

**Figura 4** – Presença de halos de inibição dos extratos frente as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC® 13311™) (B).



Legenda: P.S. é a própolis silvestre, PVerm. a vermelha, P.V. a verde e P.F. a *fusion*.

Nos testes de inibição, os extratos de própolis verde assim como da *fusion*, apresentaram os melhores resultados, tanto para bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas, sendo os melhores resultados observados em bactérias Gram-positivas (**tabela 4**).

**Tabela 4** - Atividade antimicrobiana em bactérias, dos extratos de própolis a 21%.

Própolis	Bactérias (halo de inibição em mm)*					
	(F)	(G)	(H)	(I)	(J)	(K)
Verde	20,3 ± 4,0 <sup>a</sup>	10,0 ± 1,7 <sup>a</sup>	16,3±2,1 <sup>a,b</sup>	22,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	7,3 ± 0,6 <sup>a,b</sup>	19,3 ± 1,2 <sup>a</sup>
Vermelha	13,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	14,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	14,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	7,0 ± 1,7 <sup>b</sup>	14,3 ± 2,1 <sup>b</sup>
Silvestre	15,0 ± 2,6 <sup>b</sup>	6,7 ± 1,2 <sup>b</sup>	13,7 ± 2,1 <sup>b</sup>	17,3±3,1 <sup>a,b</sup>	6,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	12,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
<i>Fusion</i>	21,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	9,3 ± 1,5 <sup>a</sup>	19,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	18,7±2,3 <sup>a,b</sup>	9,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	12,0 ± 1,0 <sup>b</sup>
<b>Valor ideal <i>fusion</i><sup>#</sup></b>	<b>16,18</b>	<b>7,58</b>	<b>15,01</b>	<b>17,63</b>	<b>6,86</b>	<b>15,48</b>

\* Média de triplicata. # Considerando-se a mistura numa proporção de 40% de própolis verde, 35% de própolis silvestre e 25% de própolis vermelha, sendo assim denominada de "fusion". (F) *Bacillus subtilis* ATCC6051; (G) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (ATCC® 13311™); (H) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; (I) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; (J) *Escherichia coli* (ATCC® 8739™); (K) *Shigela* sp. Letras iguais indicam não haver diferença estatística (Teste de Tukey 5%).

## Discussão

Como se pode observar, as diferentes cores dos extratos indicam a presença de diferentes compostos químicos, dependentes do tipo de própolis. Com respeito a atividade antifúngica, o extrato de própolis apresenta-se como um produto com atividade conhecida (31-33). No entanto as variações sazonais e até mesmo de microrregiões afetam a atividade antimicrobiana das própolis (34 - 37). Esse fato pode explicar algumas diferenças observadas nesse estudo quando comparado com outros, demonstrando a importância da padronização das análises físico-químicas, principalmente a uniformização da concentração dos extratos, para a definição de agrupamentos ou perfis.

Diversos estudos com o uso de extrato de própolis contra células leveduriformes de diferentes isolados de *Candida albicans* observaram a inibição do crescimento celular dessas linhagens (38, 39) enquanto outros não observaram nenhum efeito inibitório (31, 40, 41). No presente estudo

observamos uma maior eficácia do extrato da própolis vermelha sobre diferentes espécies de *Candida*.

Um estudo realizado com diferentes própolis no Iran demonstrou grande variação na atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, sendo que os melhores resultados foram observados para as amostras com maiores concentrações de flavonoides (42).

A grande parte dos estudos versa sobre a inibição de cepas de *C. albicans*, no entanto, espécies não-albicans têm surgido como importantes patógenos oportunistas, dentre elas *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (43-45). Assim como no presente estudo, Sobreira et al. (46), observaram que o extrato de própolis vermelha foi capaz de inibir as diferentes linhagens de *Candida* testadas, dentre elas a *C. parapsilopsis*. Dessa forma, o extrato de própolis pode ser um potencial substituto ao uso de polienos e os azólicos (47) sem apresentar os seus efeitos adversos, como:

nefrototoxicidade, hepatotoxicidade, reações de hipersensibilidade e ginecomastia (48).

Fianco et al. (49) e Okińczyca et al. (50) observaram um amplo espectro de ação do extrato etanólico de própolis vermelha sobre diferentes linhagens de *Candida*, dentre as quais estavam a *C. glabrata* e a *C. krusei*. Por sua vez Freire et al. (51) observaram inibição sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

Os potenciais mecanismos de controle de fungos leveduriformes pertencentes ao gênero *Candida* por extratos de própolis foram propostos por Pippi et al. (52) que sugeriram uma atuação sobre a parede celular; enquanto Portilho et al. (53) propuseram que a inibição da atividade da enzima extracelular fosfolipase reduz a capacidade das células leveduriformes aderirem às células epiteliais do hospedeiro.

O controle de fungos filamentosos por própolis é pouco abordado na literatura. Souza et al. (54) observaram que o uso de extrato de própolis na concentração de 20% impediu o desenvolvimento do fungo *Penicillium* sp. em condições *in vitro* sobre sementes de couve-flor. Outros estudos apontaram o efeito inibitório do uso do extrato de própolis sobre *Phakopsora euvitis*, *Pseudocercospora vitis* e *Elsinoe ampelina* (55), cercosporiose em café (56); *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Coletotrichum* spp e *Fusarium* spp (57). Essa atividade sobre fungos filamentosos parece ser baixa se comparada às atividades contra leveduras e bactérias Gram-positivas, no entanto o fato do extrato da própolis vermelha não permitir o desenvolvimento micelial ou a germinação de esporos por quatro dias abre um amplo espectro de aplicações como saneante e defensivo agrícola.

Atividade antibacteriana: no presente estudo o extrato de própolis verde mostrou efeito inibitório superior ao da própolis vermelha. Essa observação

é o contrário do observado por Silva et al. (41). Um estudo anterior apresentou o extrato da própolis vermelha como mais ativo contra *S. aureus* (41), fato este não observado no presente trabalho, onde o extrato alcoólico de própolis verde apresentou os melhores resultados com as duas cepas testadas de *S. aureus*.

Assim como descrito na literatura, observamos um efeito predominante do extrato de própolis verde sobre bactérias Gram positivas e pouca atividade sobre as bactérias Gram negativa (41, 58 - 61). Uma exceção a esse padrão foi o efeito inibitório observado em *Shigela* sp.

A atividade inibitória observada sobre *E. coli* por todos os extratos testados, ainda que pequena, vai de encontro ao observado em outros estudos (31, 40, 41). Essa diferença provavelmente se deve ao método empregado tanto no processo de extração quanto nos isolados microbianos. Resultados positivos de estudos com extratos de própolis contra *E. coli* estão descritos na literatura (38, 39). A ação antibacteriana dos extratos de própolis apresenta uma relação com a presença de flavonoides (60, 62, 63). Como no presente estudo a concentração de sólidos solúveis totais foi padronizada e essa concentração apresenta correlação com a concentração de fenóis e flavonoides totais (compostos fenólicos) que estão presentes nas diferentes fontes de própolis usadas (9, 10, 29, 30) podemos supor que as diferenças observadas sejam devidas a diferentes compostos fenólicos presentes em cada amostra.

Afrouzan et al (42) observaram uma relação entre o teor de flavonoides em diferentes extratos etanólicos de própolis e o tamanho do halo de inibição com *S. aureus*, sendo que o mesmo padrão não foi observado em relação aos testes de inibição contra *E. coli*. O padrão observado, incluindo a atividade antifúngica parece ser devido

à combinação de flavonoides e terpenos (64, 65). Amarante et al. (66) compararam duas própolis distintas, de origem comercial, e observaram que o extrato com maiores concentrações de fenóis e flavonoides apresentaram maior atividade contra um número maior de cepas de *S. aureus*, assim como apresentaram resultados com concentrações inibitórias menores.

Przybyłek e Karpiński (67) observaram o efeito inibitório de extratos de própolis sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *Shigela*. Excetuando essa última, os melhores resultados foram para bactérias Gram-positivas.

O mecanismo de ação dos compostos presentes nos extratos de própolis pode ser observado por análises de microscopia de força atômica (AFM) e parece estar relacionado a alterações na membrana plasmática das células bacterianas (68) assim como nas suas paredes celulares (69). Essas alterações morfológicas também foram relatadas em outros estudos (70) podendo ser decorrentes de alterações no padrão de osmose em nível de membrana bacteriana o que pode levar a uma lise osmótica (62). Os mecanismos anteriormente listados devem estar associados às concentrações de compostos fenólicos, terpenos, ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico e ésteres, além dos flavonoides (5, 71). Portanto, propomos que esses sejam os marcadores para a escolha de extratos de própolis com maior atividade antimicrobiana.

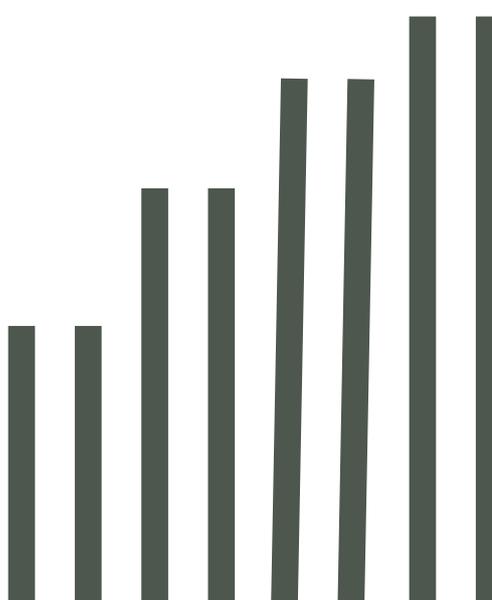
Al-Walli (72) observou um melhor efeito sobre diferentes linhagens de microrganismos, ou seja, uma redução significativa da concentração mínima inibitória, quando misturou duas própolis distintas, corroborando com os resultados do presente estudo.

## Conclusão

Os extratos obtidos apresentaram diferentes cores, característica devida a presença de diferentes compostos fenólicos, inerentes a cada tipo de própolis. Diante dos resultados observados, pudemos concluir que a união de diferentes própolis melhora a eficácia do produto final, com respeito a atividade antimicrobiana. Destaca-se o efeito da própolis vermelha sobre os fungos leveduriformes e em especial sobre o fungo filamentosso *Aspergillus flavus*, com um efeito inibitório duradouro.

## Agradecimento

Os autores agradecem a empresa Beeva Indústria Comércio e Exportação de Mel e Derivados S/A de Marechal Deodoro (AL) Brasil, pelo apoio à realização da pesquisa, bem como pelo fornecimento das amostras.



## Referências

1. 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**. Rev. Eletr. Ciênc. Exatas. 2020; 1: 1-9.
2. 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**. Rev.Virt.Quím. 2021; 13 (1): 61-73.
3. Fiorini, A.C.; Scorza, C.A.; De 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: e2357.
4. De Moraes, D.O.; Rosalen, P.L.; Ikegaki, M.; Silva, A.P.S.; Massarioli, A.P.; De Alencar, S.M. **Active antioxidant phenolics from Brazilian red propolis: an optimization study for their recovery and identification by LC-ESI-QTOF-MS/MS**. Antioxidants 2021; 10: 297-312.
5. 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**. J. Appl. Microbiol. 2017; 122: 911-920.
6. 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**. Eur. J. Dent. 2019; 3(3): 453-463.
7. Tomazzoli, M.M.; Zeggio, A.R.S.; Dal Pai Neto, R.; Specht, L.; Costa, C.; Rocha, M.; Yunes, R.A.; Maraschin, M. **Botanical source investigation and evaluation of the effect of seasonality on Brazilian propolis from *Apis mellifera* L.** Sci. Agric. 2020; 77(6): e20180258.
8. Banzato, T.P.; Gubiani, J.R.; Bernardi, D.I.; Nogueira, C.R.; Monteiro, A.F.; Juliano, F.F.; De Alencar, S.M.; Pilli, R.A.; De Lima, C.A.; Longato, G.B.; Ferreira, A.G.; Foglio, M.A.; De Carvalho, J.E.; Vendramini-Costa, D.B.; Berlinck, R.G.S. **Antiproliferative flavonoid dimers isolated from Brazilian red propolis**. J. Nat. Prod. 2020; 83(6): 1784-1793.
9. Ccana-Ccapatinta, G.V.; Mejía, J.A.A.; Tanimoto, M.H.; Groppo, M.; De Carvalho, J.C.A.S.; Bastos, J.K. ***Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: the botanical sources of isoflavonoids and benzophenones in Brazilian red propolis**. Molecules. 2020; 25: 1-7.
10. Trusheva, b.; Popova, m.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M.C.; Miorin, P.L.; Pasin, F.R.; Tsvetkova, I. **Bioactive constituents of Brazilian red propolis**. eCAM. 2006; 3(2): 249–254.
10. Nani, B.D.; Franchin, M.; Lazarini, J.G.; Freires, I.A.; Da Cunha, M.G.; Bueno-Silva, B.; de Alencar, S.M.; Murata, R.M.; Rosalen, P.L. **Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: a pharmacogenomic analysis**. Phytother.Res. 2018; 32(4): 750–754.
12. Do Nascimento, T.G.; Arruda, R.E.S.; Almeida, E.T.C.; Oliveira, J.M.S.; Basílio-Júnior, I.D.; Porto, I.C.C.M.; Sabino, A.R.; Tonholo, J.; Gray, A.; Ebel, R.E.; Clements, C.; Zhang, T.; Watson, D.G. **Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study**. Sci. Rep. 2019; 9(1):18293.
13. Bueno-Silva, B.; Franchin, M.; Alves, C.F.; Denny, C.; Colón, D.F.; Cunha, T.M.; Alencar, S.M.; Napimoga, M.H.; Rosalen, P.L. **Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process**. Phytomedicine. 2016; 23: 1583–1590.

14. Miranda, S.L.F.; Damasceno, J.T.; Faveri, M.; Figueiredo, L.; Silva, H.D.; De Alencar, S.M.; Rosalen, P.L.; Feres, M.; Bueno-Silva, B. **Brazilian red propolis reduces orange-complex periodontal pathogens growing in multispecies biofilms.** *Biofouling*. 2019; 35(3): 308–319.
15. Ledón, N.; Casacó, A.; González, R.; Merino, N.; González, A.; Tolón, Z. **Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis.** *Acta Pharm.Sinica*. 1997; 18(3):274-276.
16. De Freitas, M.C.D.; De Miranda, M.B.; De Oliveira, D.T.; Vieira-Filho, S.A.; Caligiorne, R.B.; De Figueiredo, S.M. **Biological activities of red propolis: a review.** *Rec. Pat. Endocr. Metabol. Immun. Drug Disc.* 2017; 11(1): 3-12.
17. Chan, G.C.F.; Cheung, K.W.; Sze, D.M.Y. **The immunomodulatory and anticancer properties of propolis.** *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.* 2013; 44: 262–273.
18. Watanabe, M.A.E.; Amarante, M.K.; Conti, B.J.; Sforcin, J.M. **Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review.** *J. Pharm. Pharmacol.* 2011; 63:1378–1386.
19. Silva, A.S.; Fernandes, N.S.; Cavalcante, A.M.; Lima, A.O.N.; Freitas, B.M. **Florescimento induzido da jurema preta para fornecer pólen à abelha melífera na estiagem da caatinga.** *Rev. Caatinga*. 2015; 28(2): 197-206.
20. Berretta, A.A.; Silveira, M.A.D.; Capcha, J.M.C.; De Jong, J. **Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease.** *Biomed. Pharmacother.* 2020; 131: 110622.
21. Kwona, M.J.; Shina, H.M.; Perumalsamy, H.; Wang, X.; Ahna, Y.-J. **Antiviral effects and possible mechanisms of action of constituents from Brazilian propolis and related compounds.** *J. Apic. Res.* 2019; 59(4): 413-425.
22. Ripari, N.; Sartori, A.A.; Honorio, M.S.; Conte, F.L.; Tasca, K.I.; Santiago, K.B.; Sforcin, M.J. **Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment.** *J. Pharm. Pharmacol.* 2021; 73: 281–299.
23. Shehata, M.G.; Ahmad, F.T.; Badr, A.N.; Masry, S.H.; El-Sohaimy, S.A. **Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions.** *Ann. Agric. Sci.* 2020; 65(2): 209-217.
24. Farmacopeia Brasileira, 5ª edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, 2010.
25. Castellani, A. **Viability of some pathogenic fungi in distilled water.** *J. Trop. Med. Hyg.* 1939; 24:270-276.
26. Jorgensen, J. H.; Turnidge, J. D.; Washington, J. A. **Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods.** In: Murray, R. P. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7. ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1999, p.1526-1543.
27. Sutton, D.A. 2003. **Specimen collection, transport, and processing: mycology.** In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
28. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.** Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2000.
29. Marcucci, M. C.; Sawaya, A.C.H.F.; Custodio, A.R.; Paulino, N.; Eberlin, M.N. **HPLC and ESI-MS typification: new approaches for natural therapy with Brazilian propolis.** *Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine*, Editores: Nada Oršolić e Ivan Bašić, p. 33-54, 2008.

30. Ferreira, J. M.; Fernandes-Silva, C. C.; Salatino, A.; Negri, G.; Message, D. **New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin.** J. Sci. Food Agric. 2017; 97(11): 3552–3558.
31. Bankova, V.; Marcucci, M. C.; Simova, S.; Nikolova, N.; Kujumgiev, A.; Popov, S. **Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis.** Z. Naturforsch. B. 1996; 51: 277-280.
32. Kalogeropoulos, N.; Konteles, S. J.; Troullidou, E.; Mourtziinos, I.; Karathanos, V. T. **Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus.** Food Chem. 2009; 116: 452-461.
33. Piccinelli, A. L.; Lotti, C.; Campone, L.; Cuesta-Rubio, O.; Campo Fernandez, M.; Rastrelli, L. **Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry.** J. Agric. Food Chem. 2001; 59(12): 6484-6491.
34. Castro, M. L.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Duarte, S.; Koo, H. **Propolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica.** Quim. Nova. 2007; 30: 1512-1516.
35. Silici, S.; Kutluca, S. **Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region.** J. Ethnopharmacol. 2005; 99(1): 69-73.
36. Simões-Ambrosio, L. M. C.; Gregório, L. E.; Sousa, J. P. B.; Figueiredo-Rinhel, A. S. G.; Azzolini, A. E. C. S.; Bastos, J. K.; Lucisano-Valim, Y. M. **The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils.** Fitoterapia. 2010; 81: 1102-1108.
37. Touzani, S.; Al-Waili, N.; El Menyiy, N.; Filipic, B.; Pereyra, A.; El Arabi, I.; Al-Waili, W.; Lyoussi, B. **Chemical analysis and antioxidant content of various propolis samples collected from different regions and their impact on antimicrobial activities.** Asian Pacific J. Trop. Med. 2018; 11(7): 436-442.
38. Graikou, K.; Popova, M.; Gortzi, O.; Bankova, V.; Chinou, I. **Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?** LWT Food Sci. Technol. 2016; 65: 261-267.
39. Tosi, E. A.; Rea, E.; Ortega, M. E.; Gazzoli, A. F. **Food preservative based on propolis: bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*.** Food Chem. 2007; 104(3): 1025-1029.
40. Popova, M.; Trusheva, B.; Antonova, D.; Cutajar, S.; Mifsud, D.; Farrugia, C.; Tsvetkova, I.; Hristo, N.; Bankova, V. **The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta.** Food Chem. 2011; 126: 1431-1435.
41. Silva, R. P. D.; Machado, B. A. S.; Barreto, G. A.; Costa, S. S.; Andrade, L. N.; Amaral, R. G.; Carvalho, A. A.; Padilha, F. F.; Barbosa, J. D. V.; Umsza-Guez, M. A. **Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts.** PLoS ONE. 2017; 12(3): e0172585.
42. Afrouzan, H.; Tahghighi, A.; Zakeri, S.; Es-haghi, A. **Chemical composition and antimicrobial activities of Iranian propolis.** Iranian Biom. J. 2018; 22(1): 50-65.
43. Goulart, L. S.; Santiago, E. F.; Ramon, J. L.; Moura, S. V.; Silva, A. R.; Silva Jr, I. F.; Chávez-Pavoni, J. H.; Araújo, C. **Species distribution and antifungal susceptibility to vulvovaginal *Candida* spp. in southern Mato Grosso State, Brazil.** J. Bras. Patol. Med. Lab. 2016; 52 (4): 233–237.
44. Glehn, M. D. P.; Ferreira, L. C. E. S.; Silva, H. D. F.; Machado, E. R. **Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* among Brazilian women of reproductive age.** J. Clin. Diag. Res. 2016; 10(11): 24-27.

45. Brandolt, T.M.; Klafke, G. B.; Gonçalves, C. V.; Bitencourt, L. R.; Martinez, A. M. B.; Mendes, J. F.; Meireles, M. C. A.; Xavier, M. O. **Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the *in vitro* susceptibility of isolates.** Braz. J. Microbiol. 2017; 48(1): 145–150.
46. Sobreira, A. L. C.; Silva, M. M. A.; Okamura, L. S.; de Souza, J. B. P.; Carmo, E. S. **Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de *Candida* spp.** Rev. Verde. 2020; 15(4): 429-433.
47. Siqueira, A. B. S.; Rodriguez, L. R. N. A.; Santos, R. K. B.; Abreu, S.; Peixoto, R. F.; Gurel, B. C. V. **Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis.** Braz. Oral Res. 2015; 29 (1): 1-6.
48. Jensen, R. H.; Astvad, K. M. T.; Silva, L. V.; Sanglard, D.; Jorgensen, R.; Nielson, K. F.; Mathiasen, E. G.; Doroudian, G.; Perlin, D. S.; Arendrup, M. C. **Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations.** J. Antimicrob. Chemother. 2015; 70(9): 2551-2555.
49. Fianco, A. L. B.; Falcão, M. A.; Cassel, E.; Milão, D. **Determinação da atividade antimicrobiana e teor de polifenóis totais de extratos etanólicos de própolis das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jataí) e *Scaptotrigona bipunctata* (Tubuna).** Rev. Liberato. 2013; 14(21): 1-8.
50. Okińczyca, P.; Paluchb, E.; Franciczekb, R.; Wideliskic, J.; Wojtanowskic, K. K.; Mroczekd, T.; Krzyżanowskab, B.; Skalicka-Woźniakd, K.; Srokaa, Z. **Antimicrobial activity of *Apis mellifera* L. and *Trigona* sp. propolis from Nepal and its phytochemical analysis.** Biomed. Pharmacother. 2020; 129: 110435.
51. Freire, I. A.; Queiroz, V. C. P. P.; Furletti, V. F.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Duarte, M. C. T.; Rosalen, P. L. **Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp.** J. Mycol. Medic. 2016; 26(2): 122-132.
52. Pippi, B.; Lana, A. J. D.; Moraes, R. C.; Guez, C. M.; Machado, M.; Oliveira, L. F. S.; Poser, G. L. V.; Fuentefria, A. M. ***In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp.** J. App. Microbiol. 2015; 118(4): 839-850.
53. Portilho, D. R.; Melo, I. A.; Guerra, R. C.; Batista, H. L.; Fernandes, C. H. C. **Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no Estado do Tocantins.** Rev. Cient. ITPAC. 2013; 6(2): 1-8.
54. Souza, E.P.; Perino, F.H.B.; Moscato, B.S.; Freitas, P.G.N.; Blumer, S.; Cardoso, A.I.I.; Bonini, C.S.B.; Bonini Neto, A. **Extrato de própolis no controle do *Penicillium* sp. e e na qualidade de sementes de couve-flor.** Braz. J. Biosyst. Engineer. 2017; 11(2): 135-141.
55. Marini, D.; Mensch, R.; Freiburger, M. B.; Dartora, J.; Franzener, G.; Garcia, R.C.; Stangarlin, J.R. **Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira.** Arq. Inst. Biol. 2012; 79 (2): 305-308.
56. Pereira, C. S.; Souza, F. L. F.; Godoy, C. A. **Extrato etanólico de própolis no controle da cercosporiose e no desenvolvimento de mudas de cafeeiro.** Rev. Bras. Agroecol. 2013; 8(1): 170-178.
57. Vieira, G. H.C.; Dardani, P.; Andrade, W.P.; Barbosa, C. A. F. **Efeitos do extrato de própolis sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão.** Resumos do III Seminário de Agroecologia de MS. Cadernos de Agroecologia, v. 15, n. 1, 2010.
58. De Castro, S. L. **Propolis: Biological and pharmacological activities, therapeutic uses of this bee-product.** Annu. Rev. Biol. Sci. 2001; 3: 49-83.
59. Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V.S.; De Castro, S.L.; Dantas, A.P.; Valente, P.H.M.; Paulino, N. **Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.** J. Ethnopharmacol. 2001; 74(2): 105-112.

60. Sawaya, A. C. H. F.; Tomazela, D.M.; Cunha, I. B. S.; Bankova, V. S.; Marcucci, M. C.; Custodio, A. R, et al. **Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis**. *Analyst*. 2004; 129(8): 739-744.
61. Uzel, A.; Sorkun, K.; Önçag, Ö.; Çogulu, D.; Gençay, Ö.; Salih, B. **Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples**. *Microbiol. Res*. 2005; 160: 189-195.
62. Cushnie, T. P. T.; Lamb, A. J. **Antimicrobial activity of flavonoids**. *Int. J. Antimicrob. Ag*. 2005; 26: 343-356.
63. Ristivojević, P.; Dimkić, I.; Trifković, J.; Berić, T.; Vovk, I.; Milojković-Opsenica, D.; Stanković, S. **Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics**. *PLoS ONE*. 2016; 11(6): e0157097.
64. Kedzia, B.; Gepper, B.; Iwaszkiewicz, J. **Pharmacological investigations on ethanolic extract of propolis**. *Herba Pol*. 1988; 34(4): 243-253.
65. Scheller, S.; Szaflarski, J.; Tustanowski, J.; Nolewajka, E.; Stojko, A. **Biological properties and clinical application of propolis I. Some physico-chemical properties of propolis**. *Arzneim. Forsch*. 1977; 27(4): 889-890.
66. Amarante, J. F.; Ribeiro, M. F.; Costa, M. M.; Menezes, F. G.; Silva, T. M. S.; Amarante, T. A. B.; Gradela, A.; Moura, L. M. D. **Chemical composition and antimicrobial activity of two extract of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. and multiresistant bacteria**. *Pesq. Vet. Bras*. 2019; 39(9):734-743.
67. Przybyłek, I.; Karpiński, T.M. **Antibacterial properties of propolis**. *Molecules*. 2019; 24, 2047: 1-17.
68. Takaisi-Kikuni, N. B.; Shcilcher, H. **Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance**. *Planta Med*. 1994; 60: 222-227.
69. Santana, H. F.; Barbosa, A. A. T.; Mantovani, H. C. **Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows**. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2012; 28: 485–491.
70. Bryan, J.; Redden, J.; Traba, C. **The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria**. *Lett. Appl. Microbiol*. 2015; 62: 192-198.
71. Inui, S.; Hatano, A.; Yoshino, M.; Hosoya, T.; Shimamura, Y.; Masuda, S. **Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis**. *Nat. Prod. Res*. 2014; 28(16): 1293-1296.
72. Al-Waili, N. **Mixing two propolis samples potentiates their antimicrobial activity and wound healing properties: A novel approach in infection control and wound healing**. *Veter. World*. 2018; 11(8):1188-1195.