

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PRÓPOLIS EMPREGANDO-SE A METODOLOGIA CLÁSSICA DO PERMANGANATO DE POTÁSSIO REDESENHADA



PEREIRA, Thais Cristine<sup>1</sup>, MECCATTI, Vanessa Marques<sup>1</sup>, DE LIMA, Patrícia Michelle Nagai<sup>1</sup>, DE OLIVEIRA, Luciane Dias<sup>2</sup>, MARCUCCI, Maria Cristina<sup>3,A</sup>

<sup>1</sup>Discente do curso de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, ICT-Unesp, SJC, SP

<sup>2</sup>Docente do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, ICT-Unesp, São José dos Campos, SP

<sup>3</sup>Docente colaboradora do Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, ICT-Unesp, SJC, SP

## RESUMO

A própolis, é um produto elaborado pelas abelhas a partir de resinas encontradas na natureza, que possuem uma forte atividade antioxidante. A ela são atribuídas diversas propriedades farmacológicas e biológicas, a saber, antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiana, entre outras. Os parâmetros de controle de qualidade estabelecidos para esse produto apícola, preveem a avaliação da atividade antioxidante por permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) e pelo radical difenilpicrilhidrazila (DPPH). Esses parâmetros medem a qualidade da própolis. O método do  $\text{KMnO}_4$  é qualitativo, permitindo verificar a capacidade antioxidante da própolis, ou seja, o tempo medido para a oxidação completa da solução do  $\text{KMnO}_4$  por meio da verificação visual da alteração da cor. Na reação redox, o  $\text{KMnO}_4$  é o agente oxidante, observando-se a alteração da cor da solução de violeta para incolor. Entretanto, esse método é bastante controverso, pois leva a muitos erros de medida porque o tempo de descoloração do reagente é muito rápido. A proposta desse trabalho foi a de tornar a metodologia do  $\text{KMnO}_4$  quantitativa, semelhante à do DPPH, medindo-se a concentração de própolis que leva a descoloração do  $\text{KMnO}_4$  em 5 s, 10 s e 20 s. O resultado mostrou uma correlação linear (R) de 0,95 para o tempo de 20 s, em comparação com o DPPH, indicando que o método redesenhado é confiável e pode ser utilizado em vez desse último.

**Palavras-chave:** Permanganato de potássio. Antioxidante. DPPH. Própolis.

## ABSTRACT

Propolis is a product elaborated by bees from resins found in nature, which have a strong antioxidant activity. Several pharmacological and biological properties are attributed to it, such as, antioxidant, anti-inflammatory, wound healing and antimicrobial, among others. The quality control parameters established for this bee product provide, for the evaluation of antioxidant activity, potassium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ) and diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH). This parameter measures the quality of propolis. The  $\text{KMnO}_4$  method is qualitative, allowing the verification of the antioxidant capacity of propolis, that is, the time for complete oxidation of the  $\text{KMnO}_4$  solution, through visual verification of the color change. In the redox reaction,  $\text{KMnO}_4$  is the oxidizing agent; it can

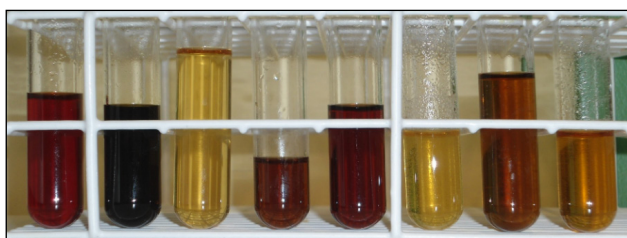
<sup>A</sup>Autor correspondente: Maria Cristina Marcucci. PhD. E-mail: cristina.marcucci@unesp.br - ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8065-5618>. Av. Engo. Francisco José Longo, 777, Jd. São Dimas. São José dos Campos, SP. Brasil. CEP 12245-000.

be possible to observe the change in color of the solution from violet to colorless. However, this method is controversial as it leads to many measurement errors because the time to change the color is very fast. The objective of this work was to transform the  $\text{KMnO}_4$  methodology into a quantitative one, similar to DPPH, measuring the propolis concentration that leads to  $\text{KMnO}_4$  discoloration in 5 s, 10 s and 20 s. The result showed a linear correlation (R) of 0.95 for the 20 s time in relation to the DPPH, indicating that the redesigned method is reliable and can be used in place of the latter.

**Keywords:** Potassium permanganate. Antioxidant. DPPH. Propolis.

## INTRODUÇÃO

A própolis é uma resina de consistência e coloração variada, produzida por abelhas a partir de brotos e exsudatos de algumas árvores e arbustos, adicionada de algumas secreções orais, pólen e cera (1-3). As diferenças de cor e composição da própolis de *Apis mellifera* do Brasil estão diretamente relacionadas às suas origens geográficas e à vegetação predominante no local de coleta (**figura 1**). Cada tipo de própolis contém marcadores químicos originários da resina coletada pelas abelhas (3).



**Figura 1.** Diferentes tipos de extratos de própolis. Cada cor indica uma origem botânica diferente.

Fonte: CAÑEDO, 2017 (4).

À própolis são atribuídas muitas propriedades terapêuticas e atividades biológicas comprovadas e reconhecidas, como a ação anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante e atividade antimicrobiana (5, 6). Atualmente, é um dos produtos naturais com maior destaque devido às suas diversas propriedades biológicas (2, 5, 7, 8). Estudos comprovaram a sua eficácia contra diversos microrganismos, atua no sistema imunológico e como anti-inflamatório, além de uma atividade antitumoral descrita (9-13). A atividade antiviral da própolis frente a vários tipos de vírus, foi descrita: poliovírus tipo 1 (PV1) (14), poliomielite (15), influenza (16), HIV (17), H1N1 (18), hepatite viral (19), vírus da herpes tipo 1 (20) e tipo 2 (21), vírus envolvido na dengue hemorrágica (22) e em coronavírus de origem animal (23). Vários trabalhos foram publicados sobre a eficácia da própolis como adjuvante na terapêutica contra o vírus da COVID-19 (24-28). Sua atividade farmacológica está diretamente relacionada à composição química, onde até inúmeros compostos químicos foram identificados, sendo os principais listados os flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides, esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, dentre outros (1, 29-31). Quanto maior o teor de flavonoides e polifenóis, mais ativa é a própolis

contra os radicais livres (32-34).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras de própolis

As amostras de própolis utilizadas no presente trabalho foram dezenove, a saber: BRPX, BRP1, BRP1 (Apis Brasil), BRP2, BRP2, BRP3, BRP(PR), BRG, BRPG, BRPG, Fusion (Beeva), Jurema preta (Beeva), Verde, Verde (Beeva), Vermelha (Beeva), Vermelha (Apis Flora), Verde (Apis Flora), Marrom (Apis Flora) e Marrom (Apis Flora). As amostras BRPX, BRP1, BRP1 (Apis Brasil), BRP2, BRP2, BRP3, BRP (PR), BRG, BRPG e BRPG foram tipificadas e classificadas quimicamente (35). As amostras foram extraídas com etanol (Ecibra) a 70% e determinado o teor de sólidos solúveis (13).

### Atividade antioxidante por $\text{KMnO}_4$

**Procedimento preliminar:** foram pipetados 136  $\mu\text{L}$  de cada tintura de própolis a 11%. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Completou-se com água destilada previamente fervida e resfriada, isenta de  $\text{CO}_2$ . Agitou-se a solução por 3 minutos, filtrando-se em seguida. Essa é a solução estoque a 300  $\mu\text{g/mL}$ . Para o teste preliminar, colocou-se em um banho-maria (20° C) 4 tubos de ensaio e em um deles, 1340  $\mu\text{L}$  de água isenta de  $\text{CO}_2$  e 600  $\mu\text{L}$  da solução estoque de própolis a 300  $\mu\text{g/mL}$  (0,03%). Adicionou-se sob constante agitação o volume referente ao tubo 1 (**tabela 1**) de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Synth) a 20% (preparado com a água isenta de  $\text{CO}_2$ ). Agitou-se por 1 min adicionando-se 60 mL de uma solução de  $\text{KMnO}_4$  (Dinâmica) a 0,1N (preparada com a água isenta de  $\text{CO}_2$ ) acionando-se o cronômetro ao mesmo tempo. Mediu-se o tempo gasto até o desaparecimento da coloração rosada (em segundos). Quando o tempo foi ao redor de 1 minuto, seguiu-se realizando a cinética de descoloração do  $\text{KMnO}_4$ , conforme descrito a seguir. Quando o tempo foi maior que 1 minuto, realizou-se a mesma prova com as concentrações do tubo 2 e assim sucessivamente (**tabela 1**) até encontrar a concentração de própolis inicial cujo tempo de descoloração do  $\text{KMnO}_4$  fosse ao redor de um minuto.

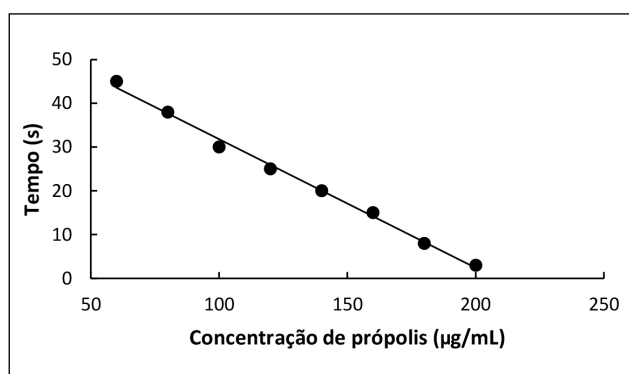
**Cinética de descoloração do  $\text{KMnO}_4$ :** realizou-se a cinética de descoloração do  $\text{KMnO}_4$ , utilizando-se as informações contidas na **tabela 1**.

**Tabela 1.** Dados necessários para a cinética da reação redox.

Tubo	Conc. de própolis (µg/mL)	Volume de própolis (µL) (2)	Vol. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (µL) (3)	Vol. de KMnO <sub>4</sub> (µL) (4)	Vol. água (µL) (1)
1	60	600	940	60	1340
2	80	800	940	60	1140
3	100	1000	940	60	940
4	120	1200	940	60	740
5	140	1400	940	60	540
6	160	1600	940	60	340
7	180	1800	940	60	140

Volume total do teste = 3000 µL. Solução estoque de própolis a 300 µg/mL.

A partir da solução estoque a 300 µg/mL, realizou-se cada ponto da **tabela 1** em separado. Colocou-se em um banho-maria (20° C) 21 tubos de ensaio e em cada tubo cada volume descrito na Tabela 1, correspondente a cada concentração final de própolis. Adicionou-se nos tubos o volume de água referente a cada concentração de própolis. Adicionou-se sob constante agitação 1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20% no tubo 1.1 e agitou-se por 1 min. Foram adicionados 60 µL da solução de KMnO<sub>4</sub> 0,1N acionando-se o cronômetro ao mesmo tempo. Mediu-se o tempo gasto até o desaparecimento da coloração rosada. Repetiu-se o processo para o tubo 1.2 e 1.3 triplicata. Foi repetido o procedimento para as concentrações subsequentes de própolis. O teste foi realizado em triplicata. Construiu-se um gráfico de concentração de própolis (µg/mL) *versus* o tempo (s) de descoloração do KMnO<sub>4</sub>, conforme o modelo descrito na **figura 2**.

**Figura 2.** Modelo da cinética da reação redox da própolis com o KMnO<sub>4</sub>.

Calculou-se a partir da curva da **figura 2**, a concentração de própolis (em µg/mL) que reage com 100% do KMnO<sub>4</sub> em 5 s (C5), 10 s (C10) e 20 s (C20) descolorindo-o totalmente.

#### Atividade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante da própolis foi avaliada usando o radical DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazila, Sigma, EUA) (0,1 mM, A = 0,960 a 25° C) o qual foi misturado com várias concentrações do extrato em etanol (em triplicata). Os tubos com diferentes concentrações do extrato de própolis a 0,01% foram mantidos por 30 min em relação à temperatura ambiente no escuro. A mesma preparação foi feita substituindo-se o volume da amostra de própolis por etanol (t = 0 min). Os valores de absorbância foi medida em 517 nm. O valor da CE<sub>50</sub> (concentração que elimina 50% dos radicais livres) foi calculado por uma regressão linear (VEIGA et al., 2017).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A finalidade do desenvolvimento da técnica descrita, foi a de se aproveitar um método existente, mas pouco confiável do ponto de vista qualitativo, transformando-a numa metodologia quantitativa, sem a utilização de equipamentos para medições. A **tabela 2** mostra os resultados obtidos tanto para o teste do KMnO<sub>4</sub> como para a atividade antioxidante por DPPH.

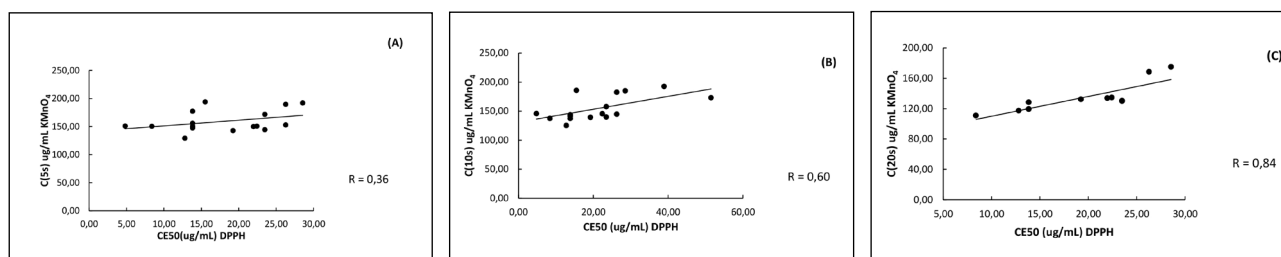
Em seguida, construiu-se um gráfico da C(5 s) *versus* a CE<sub>50</sub> (DPPH), da C(10 s) *versus* a CE<sub>50</sub> (DPPH) e da C(5 s), C(10 s) e C(20 s) *versus* a CE<sub>50</sub> (DPPH), cujos resultados são mostrados na **figura 3**.

Observa-se na figura 3 que a melhor correlação linear entre a C (KMnO<sub>4</sub>) e a CE<sub>50</sub>(DPPH) ocorreu para o tempo de 20 s (C(20 s)) sendo estabelecido como parâmetro na análise da atividade antioxidante por KMnO<sub>4</sub>, isto é, a concentração de própolis que reage com todo o KMnO<sub>4</sub> em 20 segundos (C(20 s)). A vantagem de se utilizar o método do KMnO<sub>4</sub>, é que esse reagente tem um custo muito mais acessível que o DPPH, não há a necessidade de se utilizar um espectrofotômetro ou colorímetro na análise e

**Tabela 2.** Resultado do índice de oxidação por  $\text{KMnO}_4$  comparado à atividade antioxidante por DPPH.

Própolis	C (20 s)*	C (10 s)**	C (5 s)***	CE <sub>50</sub> (DPPH)
	µg/mL			
BRPX	51,72	59,29	63,08	11,33
BRP1	119,65	137,37	150,53	13,84
BRP1	128,46	141,28	147,69	13,84
BRP2	119,65	143,79	155,86	13,84
BRP2	130,56	139,91	144,58	23,49
BRP3	130,00	157,78	171,67	23,49
BRP(PR)	134,00	145,00	150,00	21,97
BRG	153,00	173,00	183,00	51,49
BRPG	168,59	182,68	189,72	26,28
BRPG	129,70	144,85	152,82	26,28
Fusion <sup>a</sup>	111,05	137,37	150,53	8,39
Jurema preta	132,41	139,31	142,76	19,24
Verde (BRP3)	157,33	170,67	177,33	13,84
Verde B <sup>a</sup> (BRP1)	117,44	125,28	129,19	12,80
Vermelha B <sup>a</sup>	135,46	145,77	150,93	4,82
Vermelha AF <sup>b</sup>	169,34	185,74	193,93	15,53
Verde AF <sup>b</sup> (BRP2)	134,80	145,40	150,71	22,42
Marrom AF <sup>b</sup>	175,00	185,00	192,00	28,55
Marrom AF <sup>b</sup>	186,87	192,48	195,28	38,93

\*Concentração de própolis capaz de reagir com o  $\text{KMnO}_4$  em 20 s, descolorindo-o totalmente. \*\*Concentração de própolis capaz de reagir com o  $\text{KMnO}_4$  em 10 s, descolorindo-o totalmente. \*\*\*Concentração de própolis capaz de reagir com o  $\text{KMnO}_4$  em 5 s, descolorindo-o totalmente. <sup>a</sup>Própolis Beeva; <sup>b</sup>Própolis Apis Flora.



**Figura 3.** Correlação linear entre o método do  $\text{KMnO}_4$  e a atividade antioxidante por DPPH.

Legenda: (A) C(5s) versus a CE<sub>50</sub> (DPPH), (B) C(10s) versus a CE<sub>50</sub> (DPPH), (C) C(20s) versus a CE<sub>50</sub> (DPPH).

**Tabela 3.** Dados de segurança\* dos reagentes utilizados para a análise da atividade antioxidante.

DPPH	KMnO <sub>4</sub>
<p>Pode causar uma reação alérgica na pele.                      Pode causar sintomas de alergia ou asma ou dificuldades respiratórias se inalado.                      Pele: Nocivo em contato com a pele. Provoca irritação cutânea.                      Pode provocar uma reação alérgica cutânea.                      Ingestão: Nocivo por ingestão. Irritante para a boca, garganta e estômago.                      Inalação: Nocivo por inalação. A exposição aos produtos de decomposição pode resultar num perigo para a saúde. Os efeitos graves podem não ser imediatos após a exposição.                      Crônica: Não foram encontradas as informações.                      Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Provoca irritação ocular grave.                      Não se desfazer deste produto e do seu recipiente sem tomar as precauções de segurança devidas. Há que ter cautela no manuseamento de recipientes vazios que não tenham sido limpos ou lavados. Recipientes vazios ou revestimentos podem reter alguns resíduos do produto. Evitar a dispersão do produto derramado e do escoamento em contato com o solo, cursos de água, fossas e esgoto.                      O fígado de camundongos tratados com DPPH apresentou alterações histopatológicas proeminentes caracterizadas por tumefação de hepatócitos e degeneração vacuolar, especialmente quando a dose foi superior a 50 mg/kg e o tempo superior a 24 h (36).</p>	<p>Pode causar conjuntivite química e danos na córnea. A recuperação geralmente é completa, mas em casos graves, podem ocorrer danos permanentes como uma densa nebulosidade branca da córnea.                      Pele: Causa irritação na pele e possíveis queimaduras. O contato com a pele pode causar manchas marrons na área, e possível endurecimento da camada externa da mesma.                      Ingestão: Pode causar danos no fígado e nos rins. Pode causar perfuração do trato digestivo. Pode causar efeitos no sistema nervoso central. Em altas doses, o manganês pode aumentar a anemia interferindo na absorção de ferro.                      Inalação: Causa irritação do trato respiratório com possíveis queimaduras. A menor concentração de exposição de manganês em que os efeitos precoces sobre o sistema nervoso central e os pulmões podem ocorrer ainda é desconhecida. No entanto, uma vez que os sinais neurológicos estão presentes, tendem a continuar e piorar após o término da exposição. Exposições extremas podem resultar em um acúmulo de fluido nos pulmões (edema pulmonar) que pode ser fatal em casos graves.                      Crônica: A inalação crônica ou ingestão pode resultar em manganismo caracterizado por sintomas neurológicos como dor de cabeça, apatia e fraqueza das pernas, seguidos de psicose e sintomas neurológicos semelhantes aos da doença de Parkinson.                      Dose oral em camundongos: DL<sub>50</sub> = 2157 mg/kg; Dose oral em ratos: DL<sub>50</sub> = 750 mg/kg;</p>

\*Ficha de segurança DPPH, Calbiochem; Ficha de segurança KMnO<sub>4</sub>, Fisher.

Pode-se estabelecer faixas de C(20 s) para o teste do KMnO<sub>4</sub>, conforme verificado na **tabela 4** a seguir.

**Tabela 4.** Faixas de C(20s)\* em µg/mL para os diferentes tipos de própolis, no teste do KMnO<sub>4</sub>.

Própolis	C(20 s) em µg/mL
BRPX	≤ 70,00
BRP1	Verde e seus subtipos 80,00 a 120,00
BRP2	
BRP3	
BRP(PR)	
BRG	≥ 135,00
Vermelha	≥ 150,00
Marron	≥ 130,00
	≥ 170,00

\*Concentração de própolis que reage com todo o KMnO<sub>4</sub> em 20 segundos.

pode-se considerar a toxicidade de ambos os reagentes (**tabela 3**) sendo que a do KMnO<sub>4</sub> é menor.

Observa-se que, segundo os tipos de própolis, a C(20 s) varia, permitindo estabelecer as faixas de concentração de própolis que reagem totalmente com o KMnO<sub>4</sub>, por tipo.

## CONCLUSÃO

Utilizou-se um método de índice de oxidação por KMnO<sub>4</sub>, o qual é qualitativo, e permite verificar a capacidade antioxidante da própolis, ou seja, o tempo medido para a oxidação completa

da solução de  $\text{KMnO}_4$ , por meio da verificação visual da alteração da cor. Essa reação colorimétrica, é bastante controversa, pois induz a muitos erros de medida porque, na presença da própolis, o tempo de descoloração do reagente é muito rápido. A proposta desse trabalho foi a de tornar a metodologia do  $\text{KMnO}_4$  quantitativa, medindo-se a concentração de própolis que leva a descoloração do  $\text{KMnO}_4$  em 5 s, 10 s e 20 s. O resultado mostrou uma correlação linear (R) de 0,95 para o tempo de 20 s, em comparação com a atividade antioxidante medida pelo DPPH, indicando que o método redesenhado é confiável e pode ser utilizado em vez desse último. As vantagens são que o método quantitativo do  $\text{KMnO}_4$  não necessita de nenhum equipamento para a sua análise, ao contrário da atividade antioxidante medida pelo DPPH, que utiliza um espectrofotômetro ou colorímetro. Além disso, o  $\text{KMnO}_4$  é um reagente de custo muito inferior ao DPPH, além de ser menos tóxico. Todas estas vantagens tornam o método confiável e no seu redesenho, quantitativo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa Apis Brasil Green Propolis, Apis Flora, Beeva e ao prof. Dr. Jairo K. Bastos (USP-RP) pelo fornecimento das amostras de própolis.

## REFERÊNCIAS

- Marcucci MC. **Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity**. *Apidologie*. 1995; 26: 83-99.
- De Carvalho C, Fernandes WHC, Moutinho TBF, De Souza DM, Marcucci MC, D'Alpino PHP. **Evidence-based studies and perspectives of the use of Brazilian green and red propolis in dentistry**. *Eur J Dent*. 2019; 13: 453-463.
- Torres MLM, De Lima BPN, Marcucci MC, Negrão V. **Uso de pomada com própolis brasileira tipificada e DMSO para tratamento de feridas cirúrgicas**. *Braz J Nat Sci*. 2021; 4(2): E1422021, p. 1-9.
- Cañedo AD. **Está na hora de profissionalizar a produção de própolis no RS, 04/12/2017**. Disponível em <https://sebraers.com.br/apicultura/esta-na-hora-de-profissionalizar-a-producao-de-propolis-no-rs/>. Acesso em: 05 jan.2022.
- Veiga RS, Mendonca S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro Netto AA, Lira IS, Cassina-Lopez BG, Negrão V, Marcucci MC. **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.
- Barreiras DG, Ruiz FM, Gomes JEG, Souza BMS. **Eficácia da ação antimicrobiana do extrato de própolis de abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**. *Cad Ciênc Agr*. 2020; 12:1-5.
- De-Melo AA, Matsuda AH, De Freitas AS, Barth OM, Almeida-Muradian LB. **Capacidade antioxidante da própolis**. *Pesq Agrop Trop*. 2014; 44: 341-348.
- De Lima ABS, Batista AS, Santos MRC, Da Rocha RS, Da Silva MV, Ferrão SPB, De Almeida VVS, Santos LS. **Spectroscopy NIR and MIR toward predicting simultaneous phenolic contents and antioxidant in red propolis by multivariate analysis**. *Food Chem*. 2022; 367: 130744, 8 páginas. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130744>.
- Pobiega K, Kras'Niewska K, Derewiaka D, Gniewosz M. **Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods**. *J Food Sci Technol*. 2019; 56: 5386-5395.
- 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 Rev Internat*. 2019; 429-455. doi:10.1080/87559129.2019.1649692.
- Mojarab S, Shahbazzadeh D, Moghbeli M, Eshraghi Y, Bagheri KP, Rahimi R, Savoji MA, 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**. *Microb Pathogen*. 2020; 140: 103932, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103932>.
- Nani BD, Sardi JCO, Lazarini JG, Silva DR, Massariolli AP, Cunha TM, De Alencar SM, Franchin M, Rosalen PL. **Anti-inflammatory and anti-Candida effects of Brazilian organic propolis, a promising source of bioactive molecules and functional food**. *J Agric Food Chem*, 2020; 68 (10): 2861-2871.
- Reis TC, Emiliano AS, Costa FEC, Marcucci M.C. **Atividade antimicrobiana de própolis de diferentes origens**. *Braz J Nat Sci*. 2021; 4(1): 630-645.
- Búfalo MC, Figueiredo AS, De Sousa JPB, Candeias JMG, Bastos JK, Sforcin JM. **Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR**. *J Appl Microbiol*. 2009; 107: 1669-1680.
- Pobiega K, Gniewosz M, Kraśniewska K. **Antimicrobial and antiviral properties of different types of propolis**. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*. 2017; 589: 69-79.
- Kai H, Obuchi M, Yoshida H, Watanabe W, Tsutsumi S, Park, YK, 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)**. *J Func Food*. 2014; 8: 214-223.
- Ito J, Chang F-R, Wang H-K, Park YK, 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**. *J Nat Prod*. 2001; 64: 1278-1281.
- 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**. *E-CAM*. 2011; Article ID 254914, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2011/254914>
- El-Mahalaway AM, Selim AA, Mahboub FAR. **The potential protective effect of propolis on experimentally induced hepatitis in adult male albino rats**. *Histological and*

- immunohistochemical study.** J Histol Histopathol. 2015; 2: Article 14. <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2055-091X-2-14.pdf>
20. 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 antiherpetic efficacies.** E-CAM. 2011; Article ID 976196, 9 páginas. <https://doi.org/10.1155/2011/976196>
21. Sartori G, Pesarico AP, Pinton S, Dobrachinski F, Roman SS, 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 Biochem Func. 2011; 30: 1-10.
22. Soroy L, Bagus S, Yongkie IP, Djoko W. **The effect of a unique propolis compound (Propoelix™) on clinical outcomes in patients with dengue hemorrhagic fever.** Infect Drug Resist. 2014; 7: 323–329.
23. Fernandes MHV, Ferreira LN, Vargas JÁ, Fischer G, Hübner SO. **Efeito do extrato aquoso de própolis marrom sobre a produção de IFN- $\gamma$  após imunização contra parvovirus canino (CPV) e coronavírus canino (CCoV).** Ciênc An Bras. 2012; 16: 235-242.
24. Berretta AA, Silveira MAD, Capcha JMC, De Jong D. **Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease.** Biomed Pharmacother. 2020; 131: 110622, 16 páginas.
25. Ali AM, 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: 1232-1253.
26. Fiorini AC, Scorza CA, Almeida ACG, Fonseca MCM, Finsterer J, Fonseca FLA, Scorza FA. **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 páginas. <https://doi.org/10.6061/clinics/2021/e2357>
27. Refaat H, Mady FM, Sarhan HA, Rateb HS, Alaaeldin E. **Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19.** Int J Pharm. 2021; 592: 120028, 14 páginas. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120028.
28. Ripari N, Sartori AA, Honorio MS, Conte FL, Tasca KI, Santiago KB, Sforcin JM. **Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment.** J Pharm Pharmacol. 2021; 73: 281–299.
29. Pereira JS, Bicalho L, Silva DA. **Uso de própolis associada a outros componentes no tratamento de feridas oncológicas após excisão.** Acta Biom Bras. 2012; 3(2): 15-25.
30. Marcucci MC, Salatino A, Oliveira LFAM, Gonçalves CP. **Metodologias acessíveis para a quantificação de flavonoides e fenóis totais em própolis.** Rev Virtual Quim. 2021; 13: 61-73.
31. Soós A, Bodi E, Varallyay S, Molnar S, Kovacs B. **Element composition of propolis tinctures prepared from Hungarian raw propolis.** LWT Food Sci Technol. 2022; 154: 112762, 8 páginas. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112762>
32. Alves E, Kubota EH. **Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais.** Rev Ciênc Farm Básica Aplic. 2013; 34: 37-41.
33. Ibrahim MEE, Alqurashi RM. **Anti-fungal and antioxidant properties of propolis (bee glue) extracts.** Int J Food Microbiol. 2022; 361, 109463, 7 páginas. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109463>
34. Sulaeman A, Fikri AM, Mulyati AH. **Chapter 32 - The bee propolis for preventing and healing non-communicable diseases.** Funct Foods Nutr Met Non-Comm Dis. 2022; 465-479. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819815-5.00043-4>
35. Marcucci MC, Sawaya ACHF, Custodio AR, Paulino N, Eberlin MN. **HPLC and ESI-MS typification: new approaches for natural therapy with Brazilian propolis.** In: Oršolić, N.; Bašić, I. Sci Ev Use Prop Ethnomed. 2008: 33-54.
36. Zhang Z, Jin J, Shi L. **Acute liver toxicity induced by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) in ICR mice.** Toxicol Mechan Meth. 2008; 18: 615–622.