

# Evaluación la acción antibacteriana de tres extractos etanólicos de propóleos de los municipios de Sevilla, Cartago y Armenia, Colombia contra MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina)

Antibacterial activity of three ethanolic extracts of propolis from the municipalities of Sevilla, Cartago, and Armenia, Colombia, against MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*)

Luz Elena Triana<sup>1</sup>, Armando Lucumi<sup>2</sup>

## Resumen

**Introducción.** El *Staphylococcus aureus* es un patógeno comúnmente asociado con infecciones hospitalarias y comunitarias, especialmente cepas meticilina-resistentes que limitan las opciones de tratamiento. La resistencia de estas cepas a los antibióticos beta-lactámicos ha motivado la búsqueda de nuevas fuentes antimicrobianas, y los productos naturales, como los extractos de propóleos, han demostrado eficacia contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. La actividad antimicrobiana del propóleo está vinculada a su diversidad química, que depende de la flora utilizada por las abejas para su elaboración. **Objetivo.** El presente estudio tiene como objetivo determinar la acción antibacteriana de tres extractos etanólicos de propóleos de los municipios de Sevilla, Cartago y Armenia, Colombia *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. **Metodología.** La metodología incluyó la obtención de extractos etanólicos de propóleos recolectados en diferentes regiones colombianas, seguida por el fraccionamiento e identificación del propóleo con mayor actividad bactericida. Posteriormente, se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para identificar el compuesto predominante en las fracciones seleccionadas. **Resultados.** Los tres propóleos evaluados en este estudio demostraron actividad bactericida a una concentración de 10 mg/mL, con el propóleo de Cartago se encontraron concentraciones inferiores a 5 mg/mL.

1. Docente en la Facultad de Salud, programa de medicina, Universidad Libre, Seccional Cali, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-000330194742>

2. Docente en la Facultad de Salud, programa de medicina, Universidad Libre, Seccional Cali, Colombia.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0411-3654>

Correspondencia: [elehi@yahoo.es](mailto:elehi@yahoo.es)

El análisis cromatográfico identificó 3-Hexadeciloxiocarbonilo-5-(2-hidroxietil) como el compuesto predominante. **Conclusión.** Finalmente, se resalta la necesidad de investigaciones adicionales para comprender el potencial farmacológico de los propóleos colombianos, específicamente la actividad bactericida del propóleo de Cartago contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

**Palabras clave:** MRSA, propolios colombianos, actividad antimicrobiana.

## Abstract

**Introduction.** *Staphylococcus aureus* is a pathogen commonly associated with hospital and community-acquired infections, particularly methicillin-resistant strains that impose limitations on treatment options. The resistance of these strains to beta-lactam antibiotics has spurred the search for new antimicrobial sources, and natural products such as propolis extracts have demonstrated efficacy against *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. The antimicrobial activity of propolis depends to the flora used by the bees to make the propolis.

**Aim.** This study aims to determine the antibacterial activity of three ethanolic extracts of propolis from the municipalities of Sevilla, Cartago, and Armenia, Colombia, against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

**Methodology.** The methodology involved obtaining ethanolic extracts of propolis collected from different regions of Colombia, followed by fractionation and identification of the propolis with the highest bactericidal activity. Subsequently, an analysis using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) was identified the predominant compound in the selected fractions.

**Results.** All three propolis samples evaluated in this study demonstrated bactericidal activity at concentration of 10 mg/mL, with the Cartago propolis showing concentrations below 5 mg/mL. Chromatographic analysis identified 3-Hexadecyloxycarbonyl-5-(2-hydroxyethyl) as the predominant compound. **Conclusion.** In conclusion, the need for additional research to understand the pharmacological potential of Colombian propolis, specifically the bactericidal activity of Cartago propolis against *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** MRSA, Colombian propolis, antimicrobial activity.

## Introducción

*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) es un patógeno habitual causante de infecciones de origen hospitalario y comunitarias, especialmente las cepas MRSA. Estas bacterias son resistentes a prácticamente todos los antibióticos beta lactámicos, lo cual limita significativamente las opciones de tratamiento (1).

Es así como, a nivel mundial se viene explorando y valorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos agentes antimicrobianos (2). Numerosos estudios han demostrado que los extractos de propóleos inhiben eficazmente el crecimiento de MRSA (3), los mecanismos de acción bactericida asociados al propóleo son dos principalmente, por inhibición de la enzima RNA polimerasa o disrupción de la pared celular y/o membrana del patógeno (4–6).

La actividad antimicrobiana del propóleo está íntimamente relacionada con los compuestos químicos que lo constituyen, como flavonoides, ácidos fenólicos, ésteres, aldehídos y cetonas; esta diversidad química depende de la flora que utilicen las abejas para elaborarlo (7). La mayoría de los propóleos colombianos son de color marrón oscuro y son típicos de las familias Anacardiaceae, Asteraceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Rutaceae y Rubiaceae (8).

Con base a la gran diversidad de flora colombiana y con el propósito de determinar el potencial farmacéutico del propóleo, el presente estudio tiene como objetivo determinar la acción antibacteriana de tres extractos etanólicos de propóleos de los municipios de Sevilla, Cartago y Armenia, Colombia contra MRSA.

## Metodología

### **Obtención del extracto etanólico del propóleo**

Se recolectaron 200 gr de propóleo de tres fincas apicultoras de los Municipios de Armenia, Sevilla y Cartago, en Colombia, que se encuentran ubicadas en tres altitudes diferentes: 1612, 1551 y 917 m.s.n.m. respectivamente. A las tres muestras de 500 mg (cada una), se les retiraron manualmente restos pequeños de astillas de madera, hojas u otros, obteniendo una muestra final de 150 gr y fueron almacenados en frascos estériles bajo refrigeración, hasta su uso.

Para la obtención del extracto etanólico de propóleo (EEP) se cortó el propóleo en trozos pequeños, posteriormente se colocó 100 gr de propóleo y se diluyeron en 500 mL de alcohol al 96%, se secó a baño maría a 34°C. El sobrenadante se filtró con papel Wathman N° 42.

### ***Ensayo dosis-respuesta de concentraciones alta, media y baja (20-10-5 mg/ml) del extracto etanólico total de propóleo***

Inicialmente, se llevó a cabo un tamizaje de la actividad bactericida de las muestras, evaluando cada propóleo a concentraciones de 20-10-5 mg/ml. El propóleo seleccionado para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) y el fraccionamiento fue aquel que presentó actividad bactericida a 5 mg/mL.

La cultura bacteriana (cepa de referencia bacteriana MRSA ATCC 25923) se homogeneizó en 10 mL de medio de caldo Laurie (LB) y se incubó durante 12 horas a 37 °C. La densidad óptica se ajustó al estándar de Mac Farland 1.4. Las bacterias se trataron con el extracto etanólico en una dosis experimental seleccionada durante un período de 24 horas a 37 °C con agitación constante. Al final del tiempo de incubación, se sembraron 100 microlitros de bacterias tratadas en agar sangre durante 24 horas a 37 °C. El control negativo de bacterias consistió en aquellas tratadas con una concentración final del 1% de DMSO.

### ***Fraccionamiento del propóleo con actividad bactericida***

Utilizando la metodología de cromatografía de absorción en columna, fue fraccionado 1 mg del extracto etanólico de propóleo pro-

veniente de Cartago, a partir de la actividad bactericida a una concentración de 0.05mg/mL. Se empleó como fase móvil un gradiente de polaridad con etanol 90-60-30 % v/v de etanol y como fase estacionaria 30 g de silica gel 60 (0.063-0.200mm), 45 % de altura de la columna. Las fracciones colectadas manualmente, enumeradas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, se dejaron secar a temperatura ambiente y fue determinado el MIC de cada fracción.

Como resultado de la elusión con etanol al 90%, la fracción 7 fue seleccionada para fraccionamiento, al mostrar un % inhibición de MRSA a 1.25 mg/mL y 0,05 mg/mL, como se describe en la tabla 3.

Seguidamente, 0,01 g de material seco recolectado; fue fraccionado empleando como fase móvil un gradiente de polaridad con 15 % acetato de etilo y 85 % Hexano y como fase estacionaria silica gel (0.063-0.200mm), Se colectaron 12 fracciones manualmente; enumeradas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, se dejaron secar a temperatura ambiente, seguidamente se cuantificó el material obtenido y se determinó si inhibía o no el crecimiento bacteriano.

### ***Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS)***

Para el análisis por GC-MS, se utilizó el sistema GCMS-QP-2010 ULTRA de SHIMADZU, con un rango de masas de

30-700 masa/carga, relación de división 0.0, voltaje de 70eV y un flujo total de 5.0 ml/min. El método consistió en una temperatura inicial de 80 °C durante 1 minuto, seguido de un aumento de 5 °C/min hasta 120 °C durante 1 minuto, y luego un aumento de 8 °C/min hasta 300 °C durante 4 minutos, para una posterior limpieza. El tiempo total de ejecución de la GC fue de 40 minutos.

Calculamos el porcentaje relativo de cada componente comparando su área promedio de pico con el área total utilizando el software Turbo Mass (versión 5.2). Para la identificación de compuestos, comparamos los picos aislados del extracto de la planta con espectros conocidos en la Base de Datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, que contiene 62,000 estándares.

## Resultados

### **Tamizaje de la actividad bactericida de los tres extractos etanólicos de propóleos, proveniente de los municipios de Armenia, Sevilla y Cartago, en Colombia**

Inicialmente, se realizó un tamizaje con el fin de seleccionar el extracto etanólico que presentara actividad bactericida contra MRSA a 5 mg/mL. Se encontró que el extracto de propóleo de Cartago presentó actividad a 5 mg/mL (tabla 1).

**Tabla 1** Tamizaje de la actividad bactericida de los extractos etanólicos de los municipios de Sevilla, Armenia y Cartago.

Extract concentration (mg/mL)	20	10	5
<i>Propóleo Sevilla</i>	I	I	NI
<i>Propóleo Armenia</i>	I	I	NI
<i>Propóleo Cartago</i>	I	I	I

I: Porcentaje de inhibición de MRSA  
NI: No inhibición de MRSA

**Tabla 2** Tamizaje de la actividad bactericida del extracto etanólico del municipio de Cartago.

Extract concentration (mg/mL)	5	2,5	1,25	0,6
<i>Propóleo Cartago</i>	I	I	I	NI

I: Porcentaje de inhibición de MRSA  
NI: No inhibición de MRSA

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico del propóleo de Cartago**

Como se puede observar en la tabla 2, se encontró que el extracto etanólico del propóleo de Cartago presentaba una MIC de 1,26 mg/mL

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las fracciones del extracto etanólico de propóleo de Cartago**

El extracto completo fue fraccionado empleando como fase móvil un gradiente de polaridad con etanol 90-60-30 % v/v de

etanol y como fase estacionaria silica gel; se obtuvieron 7 fracciones en total y fue evaluada la capacidad bactericida a 2,5 y 1,26

mg/mL (tabla 3). Se encontró que la fracción número 7 presentó actividad bactericida a 1,26 mg/mL.

**Tabla 3.** MIC de las fracciones del extracto etanólico de propóleo de Cartago.

Concentración de etanol utilizada para elusión (% v/v)	Fracción	1,25 mg/mL	0,5 mg/mL
30	1	I	NI
	2	I	NI
	3	NI	NI
	4	NI	NI
60	5	NI	NI
	6	NI	NI
90	7	I	I

I: Porcentaje de inhibición de MRSA

NI: No inhibición de MRSA

**Tabla 4.** Actividad bactericida de la fracción número 7 del extracto etanólico de propóleo de Cartago.

Fracción	Concentración final en el medio mg/mL	Actividad Bactericida
1	0,35	NI
2	0,45	NI
3	0,45	NI
4	0,25	NI
5	1,05	NI
6	0,2	NI
7	0,1	NI
8	0,3	NI
9	0,05	NI
10	0,5	NI
11	0,05	I
12	0,05	I

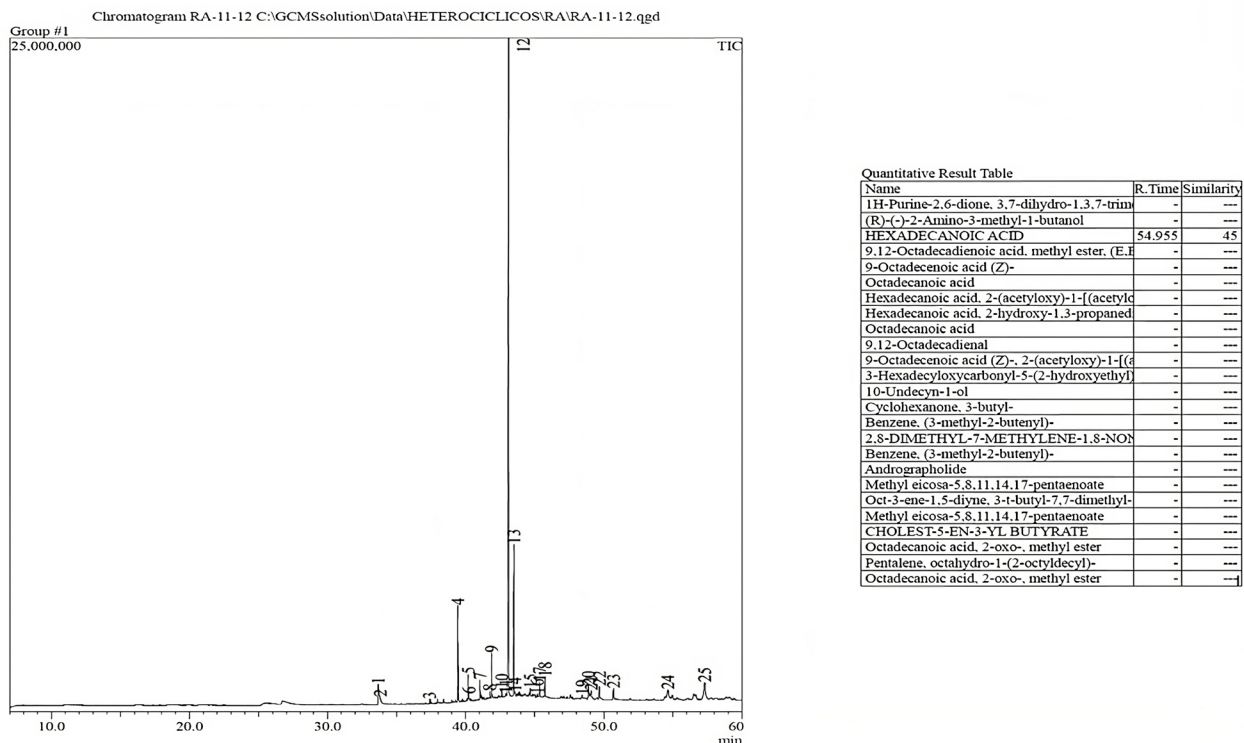
I: Porcentaje de inhibición de MRSA

NI: No inhibición de MRSA

## Análisis cromatográfico

Las fracciones 11 y 12, obtenidas con la mezcla de hexano al 85% / etil etanoato al 15%, fueron sometidas a análisis cromatográfico acoplado a espectrometría de masas. Se identificaron un total de 25 com-

puestos, con base en el tiempo de retención (RT) y el área de pico de los compuestos individuales. El compuesto predominante, del pico número 12, fue identificado como 3-Hexadeciloxiocarbonilo-5-(2-hidroxiethyl) (Figura 1).



**Figura 1.** Cromatograma de las fracciones 11 y 12, obtenidas a partir de la fracción número 7 del extracto etanólico de propóleo de Cartago. Se confirmó la presencia de varios compuestos con diferentes tiempos de retención (TR). El pico 12 es el predominante.

## Discusión

Diversos estudios han reportado la actividad bactericida del propóleo contra cepas MRSA (3), en concordancia encontramos que los tres propóleos evaluados presentaban actividad bactericida a una concentración de 10 mg/mL; resaltando que el propóleo del municipio de Cartago consiguió inhibir el

crecimiento bacteriano a concentraciones menores a 5 mg/mL. Este resultado por un lado, evidencia la relación estrecha entre la variedad química y la bioactividad de los propóleos con los territorios donde son colectados (4) y por el otro, señala que la capacidad antimicrobiana del propóleo está asociada al sinergismo de los compuestos activos que lo conforman (2,9).

Igualmente, se sugiere, la disrupción de la membrana bacteriana, como el principal mecanismo de acción bactericida de los propóleos. Estudios como el realizado por Zhang *et al.* (2022) han reportado daños en la pared y membrana celular de MRSA, tratadas con 0,1 mg/mL de propóleo; observando cambios en las concentraciones de los metabolitos intracelulares, reducción de la expresión génica y autólisis.

Nuestro estudio encontró que, el extracto total de propóleo de Cartago presenta un CMI de 1,26 mg/mL; sin embargo, al realizar un primer fraccionamiento con un gradiente 90-60-30 % v/v de etanol, fue posible obtener una fracción (número 7) con un CMI de 0,5 mg/mL. Estos resultados coinciden con los MICs reportados para propóleos europeos que se encuentran entre 0,06 y 1,2 mg/mL (4).

Posteriormente, realizamos un segundo fraccionamiento eluyendo con 15 % acetato de etilo y 85 % Hexano; obtuvimos dos fracciones la número 11 y 12, ambas con un MIC de 0,05 mg/mL; este valor es similar al encontrado por Zhang *et al.* (2022) en el propóleo rojo Chino, donde se reporta un CMI de 0,05 mg/mL contra MRSA; y cercanas a CMIs reportadas para propóleos brasileros con valores que varían entre 0,0156 y 0,2955 mg/mL (10–12).

Adicionalmente, los resultados del análisis cromatográfico, identificaron 3-Hexade-

ciloxioxocarbonilo-5-(2-hidroxietyl) como el compuesto predominante en la muestra. Esta molécula, es la primera vez que se describe en la composición química de propóleos, estructuralmente presenta una cadena alquílica larga compuesta por 16 átomos de carbono (Hexadecil). Su estructura incluye el grupo funcional oxioxocarbonilo, que denota la presencia de un carbonilo enlazado a un oxígeno y a otro carbonilo. Además, la designación 5-(2-hidroxietyl) indica la existencia de un grupo etileno con un grupo hidroxilo (OH) unido al carbono 5. Desde la perspectiva de la interacción con organismos vivos, la presencia del grupo hidroxilo es significativa, ya que es un grupo funcional reactivo en procesos biológicos. Este grupo hidroxilo, al ser soluble en agua y poseer la capacidad de formar enlaces de hidrógeno, puede influir en la interacción de la molécula con componentes biológicos como proteínas, enzimas o membranas celulares; sin embargo, se sugieren más estudios para determinar su actividad contra MRSA.

Comparando el 3-Hexadeciloxioxocarbonilo-5-(2-hidroxietyl) con los compuestos químicos predominantes en el propóleo rojo, que se distribuye ampliamente en Brasil, Cuba, México, China y Venezuela, observamos igualmente la presencia de moléculas alifáticas como benzofenonas poliisopreniladas como fitoquímicos activos (15-22).



Por otro lado, investigaciones como las realizadas por Pamplona-Zomenhan *et al.* (2011) en Brasil y Chen *et al.* (2018) en Taiwán, han reportado MICs más bajas a las encontrados en el presente estudio. Por ejemplo, Pamplona-Zomenhan *et al.* (2011) observaron que propóleos de la región de Paraná, presentaban CMI de bajo de 0,00142 mg/mL frente a MRSA y MSSA (*S. aureus* susceptible a la meticilina), sugiriendo adicionalmente, que el mecanismo de resistencia a la meticilina no interfiere en la actividad antimicrobiana del propóleo (13,6).

A la par, Chen *et al.* (2018) determinaron un CMI inferior a 0,002 mg/mL frente a MRSA, indicando que la sensibilidad de las bacterias gram-positivas, a las bajas concentraciones de propóleo, se debe principalmente a la composición química de la pared celular de estos microorganismos (6,23,24).

Adicionalmente, Zhang *et al.* (2022), determinó CMI alrededor de 200 µg/mL, esta diferencia en la capacidad inhibitoria contra MRSA se relaciona adicionalmente a su diversidad química, con el pH de la muestra al realizar los ensayos microbicidas (14,25).

Finalmente, este estudio representa un primer acercamiento al potencial farmacológico de los propóleos colombianos, estableciendo que el propóleo colectado en el municipio de Cartago presenta una mayor actividad bactericida contra

MRSA; además, de mostrar claramente la asociación del potencial bactericida con la zona de colecta.

## Conclusión

Este es el primer acercamiento que evalúa la capacidad bactericida contra MRSA, de propóleos presentes en el Valle del Cauca y Armenia; se encontró que el propóleo proveniente del municipio de Cartago con un CMI de 0,05 mg/mL, presenta la mayor actividad bactericida, en comparación a las muestras de propóleo provenientes de los municipios de Sevilla y Armenia. Esta diferencia en la eficacia antibacteriana entre las distintas muestras, resalta la influencia directa del entorno geográfico en la bioactividad del propóleo. Sin embargo, se sugiere profundizar entre la relación entre la composición química del propóleo, la distribución y las variaciones ambientales que podrían influir en su eficacia farmacológica.

## Agradecimientos

Al profesor PhD Rodrigo Abonia por sus valiosas orientaciones.

## Conflicto de intereses y financiación:

Se declara que no existe conflicto de intereses, ni financiación para este proyecto.

## Referencias

- Foster TJ. Can  $\beta$ -Lactam Antibiotics Be Resurrected to Combat MRSA? *Trends Microbiol.* 2019;27(1):26–38.
- Sforcin JM. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phyther Res.* 2016;30(6):894–905.
- Ripari N, Beatriz Toti M, Kenupp Bastos J, Sforcin JM. Can bee propolis help us fight against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)? *RPS Pharm Pharmacol Reports.* 2022;1:1–9.
- AL-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Antimicrobial activities of european propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines.* 2018;5(1):2.
- Zhang W, Margarita GE, Wu D, Yuan W, Yan S, Qi S, *et al.* Antibacterial activity of chinese red propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Molecules.* 2022;27(5):1–17.
- Chen YW, Ye SR, Ting C, Yu YH. Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. *J Food Drug Anal.* 2018;26(2):761–8.
- Bankova V, Popova M, Trusheva B. Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. *Chem Cent J.* 2014;8(1):1–8.
- Salamanca Grosso G. Propóleos: Flora asociada. In: *Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo.* Ibagué-Tolima: Sello Editorial Universidad del Tolima; 2017. p. 99–138.
- Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial properties of propolis. *Molecules.* 2019;24(11):1–17.
- Ribeiro VP, Arruda C, Aldana-Mejia JA, Bastos JK, Tripathi SK, Khan SI, *et al.* Phytochemical, antiplasmodial, cytotoxic and antimicrobial evaluation of a southeast brazilian brown propolis produced by *Apis mellifera* bees. *Chem Biodivers.* 2021;18(9):1–11.
- Ripari N, Flávia A, Pereira M, Júnior AF, Lúcia V, Rall M, *et al.* Brazilian red propolis in combination with  $\beta$ -lactams exerts an efficient antibacterial action over methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ( MRSA ) strains. *J Appl Microbiol.* 2023;134:1–12.
- Veiga RS, De Mendonça S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro Netto AA, *et al.* Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol.* 2017;122(4):911–20.
- Pamplona-Zomenhan L, Pamplona B, da Silva C, Marcucci M, Jenné L. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of an ethanol extract of brazilian classified propolis strains of *Staphylococcus aureus*. *Brazilian J Microbiol.* 2011;42:1259–64.
- Zhang W, Gomez M, Yuan W, Qi S, Xue X, Wu L. Antibacterial Activity of Chinese Red Propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Molecules.* 2022; 27(5):1692.
- Bouchelaghem S. Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2022; 29 (4): 1936-1946.
- Dezmirean D, Pașca C, Moise A, Bobi O. Plant Sources Responsible for the Chemical Composition and Main Bioactive Properties of Poplar Propolis. *Plants.* 2021; 10:22.
- Djais A, Putri N, Rahmania Putri A, Angky Soekanto S. Description of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Candida albicans* biofilms after exposure to propolis dentifrice by using OpenCFU method. *The Saudi Dental Journal.* 2019; 32:129-134.
- Da Silva J, Souza M, Vidal F. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry.* 2006; 99 (3):431-435.
- Daikh A, Segueni N, Dogan N, Arslan S. Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis. *Journal of Apicultural Research.* 2020; 59:160-169.
- Dantas Silva P, Machado, Gupta V. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS ONE.* 2017;12 (3).
- Nascimento Araújo C, Mayworm M, Yatsuda R. Campos Chemical composition and antimycoplasma activity of a brown propolis from southern. *Brazil J Food Sci Technol.* 2020; 57 (11):4228-4235.

22. Duarte C, Leme E, Delarmelina C, Soares A, Figueira G, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 111 (2):197-201.
23. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100:114-117.
24. Béji-Srairi R, Younes I, Snoussi M, Yahyaoui K. Ethanolic extract of Tunisian propolis: chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative properties. *Journal of Apicultural Research*. 2020; 59 (5): 917-927.
25. Goncalves R, Cunha Pinto M. A review of the plant origins, composition and biological activity of red propolis. *Natural products: Structure, bioactivity and applications*. Nova Science Publishers. 2012; 1:83-96.