



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MARIA CARLA DA SILVA CAMPÊLO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS DE ABELHA
SEM FERRÃO FRENTE A CEPAS BACTERIANAS PATOGÊNICAS**

MOSSORÓ-RN
2014

MARIA CARLA DA SILVA CAMPÊLO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS DE ABELHA
SEM FERRÃO FRENTE A CEPAS BACTERIANAS PATOGÊNICAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Universidade Federal
Rural do Semi-Árido – UFERSA,
Campus Mossoró para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jean Berg Alves
da Silva

MOSSORÓ-RN
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)

Setor de Informação e Referência

C193a Campelo, Maria Carla da Silva.

Avaliação da atividade antimicrobiana de própolis de abelha sem ferrão frente a cepas bacterianas patogênicas / Maria Carla da Silva Campelo. -- Mossoró, 2014.

33f.: il.

Orientador: Profº. Dr. Jean Berg Alves da Silva.

Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Graduação.

1. Antibiógrama. 2. Bactérias. 3. Meliponicultura. 4. Própolis. 5. Resistência. I. Título.

RN/UFERSA/BCOT /287-14

CDD: 615.1

Bibliotecária: Vanessa Christiane Alves de Souza Borba

MARIA CARLA DA SILVA CAMPELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS DE ABELHA
SEM FERRÃO FRENTE A CEPAS BACTERIANAS PATOGÊNICAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Federal Rural do Semi-Árido –
UFERSA, Campus Mossoró para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

APROVADA EM: 07/03/2014

BANCA EXAMINADORA

[Redacted]

[Redacted]

~~Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva~~
Presidente

[Redacted]

Msc. Maria Rociene Abrantes
Primeiro Membro

[Redacted]

Esp. Francisco Alexandre de Araújo Almeida
Segundo Membro

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por ter me proporcionado a realização de um sonho, por me fortalecer na fé e por estar em todos os momentos desta caminhada me dando forças para continuar, por que a luta não foi fácil e nunca será.

Aos meus pais, João Eudes Campelo e Maria Zulene da Silva, e ao meu irmão José Ricardo da Silva Campelo que me apoiaram em todas as minhas decisões, foram verdadeiros refúgios nos momentos de angústia e de saudade de casa, que não mediram/medem esforços para que eu consiga alcançar meus objetivos. A toda a minha família, em especial aos meus avós Zé Baixinho e Francisca, que estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, mostrando-me sempre o valor da vida e me ensinando a ser mais humana. Amo-os.

Ao meu noivo, Lázaro, melhor amigo e companheiro, pelo carinho, compreensão e incentivo nos momentos que pensei em desistir, sem você eu não teria conseguido chegar até aqui!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva, pelos conselhos, paciência e disponibilidade, por confiar em mim, e me proporcionar à oportunidade de crescimento profissional e intelectual no momento em que eu estava mais perdida, me encontrei! Hoje sei que ele não foi apenas um orientador, mas peça-chave para que eu pudesse chegar ao fim dessa caminhada e ao início de outra jornada. Muito Obrigada!

A toda família LIPOA, em especial a Rociene, Êlika e Carol que não mediram esforços para me ensinar tudo que sei hoje e para que este trabalho fosse realizado.

A Débora Alves que esteve presente em todos os momentos, desde o primeiro dia do curso de Biotecnologia, me apoiando nos dias de angústia e nos dias de alegria. Juntas estamos conseguindo chegar ao fim desta caminhada. Valeu Debrinha, estamos nos Formando!!!

Aos meus amigos e colegas de faculdade, Emanuela, Lorena, Hebert, Joelma, Mario Luan, Luã Mota, Caio, Darlene, Waleska e Mirna, aprendi muito com cada um, levo-os no meu coração.

Por fim, a todos que participaram direta e/ou indiretamente da minha caminhada, e que torceram pela minha vitória, muito obrigada!

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o mundo pertence a quem se atreve, e a vida é muito para ser insignificante.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana da própolis das espécies de abelhas sem ferrão, Cupira (*Partamona* sp) e Jatí (*Plebléia* sp), frente a cepas de *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Foram produzidos extratos hidroalcoolicos a partir de própolis de abelhas Jati e Cupira. Para a análise da atividade antimicrobiana das própolis foi utilizada a técnica de difusão em discos. Utilizando o método Kirby-Bauer, as cepas *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp e *Escherichia coli* foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton e em seguida os extratos, em diferentes concentrações (100mg/mL, 75 mg/mL e 50 mg/mL), foram inseridos nas placas. As placas foram lidas com 12 e 24 horas. O extrato da própolis de Cupira, com 12 e 24 horas de incubação, conseguiu inibir na concentração de 100 mg/mL todas as cepas bacterianas testadas, porém apenas *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* tiveram seus crescimentos bacterianos inibidos nas demais concentrações (75 mg/mL e 50 mg/mL do extrato). Já o extrato da própolis da espécie Jatí, com 12 horas de incubação foi capaz de inibir apenas cepas de *Staphylococcus aureus* quando puro. No entanto, com 24 horas as bactérias, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* foram inibidas na concentração de 100 mg/mL e *E. coli* não sofreu nenhuma inibição pelo extrato. Portanto, os extratos avaliados obtiveram ação antimicrobiana relevante contra as cepas testadas, porém não tão eficientes quando comparados com o antibiótico ciprofloxacina.

Palavras-chave: Antibiógrama; Própolis; Bactérias; Resistência; Meliponicultura.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the antimicrobial activity of propolis of stingless bee species, Cupira (*Partamona* sp) and Jati (*Plebléia* sp) against strains of *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Hydroalcoholic extracts were made from propolis bee Jati and Cupira. For the analysis of the antimicrobial activity of propolis disc diffusion technique was used. Using the Kirby-Bauer method, *Enterobacter aerogenes* strains, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp and *Escherichia coli* were seeded in Petri plates containing Mueller Hinton agar medium and then the extracts at different concentrations (100mg/mL, 75 mg / ml and 50 mg / ml) were placed on the plates. Plates were read at 12 and 24 hours. The extract of propolis Cupira, with 12 and 24 hours of incubation, could inhibit the concentration of 100 mg / mL all tested bacterial strains, but only *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were inhibited their growth in other bacterial concentrations (75 mg / mL and 50 mg / mL of extract). Have the extract of propolis from Jati species, with 12 hours of incubation was only able to inhibit *Staphylococcus aureus*, pure. However, after 24 hours the bacteria *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* were inhibited at a concentration of 100 mg / mL and *E. coli* suffered no inhibition extract. Therefore, the extracts evaluated had significant antimicrobial activity against the tested strains, but not as efficient when compared with the antibiotic ciprofloxacin.

Keywords : Antibiogram ; Propolis ; Bacteria ; Resistance ; Meliponiculture .

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Analogia do efeito da própolis de Cupira em diferentes concentrações frente as cepas bacterianas testadas após 12 horas de incubação.....	24
Gráfico 2. Analogia do efeito da própolis de Cupira em diferentes concentrações frente as cepas bacterianas testadas após 24 horas de incubação.....	25
Gráfico 3. Comparação do efeito do extrato da própolis de Jatí nas diferentes concentrações sobre as quatro cepas patogênicas com 12 horas de incubação.....	26
Gráfico 4. Comparação do efeito do extrato da própolis de Jatí nas diferentes concentrações sobre as quatro cepas patogênicas com 24 horas de incubação.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade de <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> frente a diferentes antimicrobianos de uso farmacêuticos.....	23
Tabela 2. Perfil de suscetibilidade de <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> frente a extrato de própolis Cupira nas diferentes concentrações.....	24
Tabela 3: Perfil de suscetibilidade de <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> frente a extrato de própolis Jatí nas diferentes concentrações.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. MELIPONICULTURA	15
2.1.1. Abelhas Sem Ferrão.....	16
2.1.2. Própolis De Abelhas Indígenas Sem Ferrão	16
2.1.3. Atividade Biológica da Própolis.....	18
2.2. BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM ESTUDO.....	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GERAL	21
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
4. METODOLOGIA	22
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS	22
4.2. PREPARO DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS.....	22
4.3. PREPARAÇÃO DAS CEPAS.....	22
4.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ANTIBIÓTICOS <i>IN VITRO</i>	22
4.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS <i>IN VITRO</i> ...	23
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
7. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

A meliponicultura vem sendo praticada desde os tempos remotos, e no Brasil começou a ser desenvolvida pelos índios. Ao longo dos anos, agricultores começaram a criá-las com o intuito de auxiliar na polinização de suas lavouras, por se tratarem de abelhas que não oferecem riscos a saúde de quem as cria. Ao longo dos tempos esta prática passou a ser difundida de forma tradicional por pequenos e médios agricultores, principalmente por aqueles onde a mão de obra familiar era a empregada nas atividades do campo, sendo considerada uma atividade econômica complementar (COLETTTO-SILVA, 2005). A criação de meliponíneos no Brasil é uma atividade bastante difundida, especialmente mantida pela região Norte e Nordeste do país, tendo o mel, assim como na apicultura, como principal produto valorativo de exploração (ALVES et al., 2007).

Além da visita às flores e os benefícios no incremento nos serviços da polinização, os meliponíneos apresentam produtos e subprodutos bastante valorizados economicamente, tais como, mel, pólen, cera, própolis e geoprópolis. Sendo estes os principais atrativos para a sua criação racional e manejo (PALAZUELOS, 2008).

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas, cerosas e balsâmicas, que são coletadas pelas abelhas, de diferentes partes de plantas tais como: botões, flores, brotos e exsudatos resinosos, por isso possuem consistência, textura e coloração variada. Este material é utilizado pelas abelhas dentro da colmeia com a finalidade de manter o ambiente asséptico, desinfetar os favos, revestir as paredes internas, embalsamar insetos mortos e proteger a entrada contra intrusos (FUNARI; FERRO, 2006; NOGUEIRA-NETO, 1997; BURDOCK, 1998; CASTALDO; CAPASSO, 2002; CUNHA et al., 2004).

Pinto (2011) refere-se à própolis como um produto natural, que passou a ser utilizada em diferentes regiões do Brasil e do mundo para diversas finalidades medicinais entre elas a cicatrização de feridas e antimicrobiana.

A própolis vem apresentando uma variada atividade biológica demonstrando também composição química diferente em regiões distintas do país. Certos compostos estão presentes em todas as amostras, ao contrário de outras substâncias encontradas em algumas amostras. Tal variação é facilmente explicada pela enorme diversidade biológica, vasta flora brasileira e adversidades temporais de cada região onde são criadas, bem como pela capacidade bioquímica das abelhas em modificar a composição natural e/ou adicionar outros componentes à própolis (FUNARI, FERRO, 2006). Devido a isso, várias são as atividades

biológicas relatadas na literatura, tais como antimicrobiana, anticarcinogênica, citotóxica, anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante e antitumoral (CABRAL et al., 2009).

No entanto, pouco ainda é conhecido quanto à constituição química e às ações terapêuticas da própolis de abelhas sem ferrão, especialmente quanto aos mecanismos de ação a nível celular, o que poderia representar novas formas de tratamento de várias doenças, com a possibilidade de seu uso também como coadjuvante de outros medicamentos (SANCHES, 2012).

Atualmente, tem-se buscado intensamente a descoberta de novos medicamentos que venham a auxiliar no combate a doenças, entre elas as infecciosas. A utilização de medicamentos sem a prescrição médica tem proporcionado o desenvolvimento de resistência bacteriana contra várias classes de antibióticos de uso farmacológico, gerando um grande aumento no número de pesquisas relacionadas a produtos naturais que possam ser utilizados para combater tais enfermidades, e a própolis de *Apis mellífera* ganhou destaque como medicamento (SANCHES, 2012).

Portanto, devido a falta de estudos relacionados com as espécies de abelhas nativas e seus produtos, bem como a grande utilização da própolis de *Apis mellífera* como agente medicinal, utilizado para diversas finalidades farmacológicas, observou-se a necessidade de estudar mais profundamente a própolis de espécies de abelhas sem ferrão, avaliando a ação por ela desempenhada, podendo ser ou não caracterizada com atividade biológica. Assim, o referente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de própolis de abelhas sem ferrão frente a cepas patogênicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MELIPONICULTURA

O Brasil é rico em espécies de abelhas sociais nativas, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão ou meliponíneos. Atualmente são criadas comercialmente em agrupamentos de colônias, denominados meliponários, que constituem a meliponicultura (SILVEIRA et al., 2002). A meliponicultura é de fácil manejo e necessita de pouco investimento para a sua criação. É uma atividade que pode ser integrada a plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto, podendo contribuir, através da polinização, com o aumento da produção agrícola e regeneração da vegetação natural (SOARES; JONG, 1992; HEARD, 1999).

Atividades como a meliponicultura têm um papel importante nas economias de subsistência de muitas localidades da região semiárida do Brasil, e essas atividades contribuem para o desenvolvimento regional sustentável, utilizando recursos naturalmente fornecidos pela flora e fauna característica do bioma Caatinga (SANTOS, 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

A prática de meliponicultura no Brasil ainda é carente de tecnologias que aprimorem o processo de extração dos produtos, tornando-os mais difíceis de serem extraídos e, portanto, mais caros, e principalmente, pela ausência de uma legislação condizente com as suas necessidades (COLETTTO-SILVA, 2005). A criação de abelhas indígenas sem ferrão sofre de um vazio legal, particularmente na parte físico-química, o que dificulta a ampliação do mercado desse produto, especialmente no que se refere à exportação e comercialização (LOPES et al., 2005).

Embora as abelhas sem ferrão possam estar relacionadas às atividades econômicas bem estabelecidas, como produção de mel, cera e própolis, a grande importância desses insetos é também a que eles desempenham nos processos ecossistêmicos em que estão envolvidos, como sua participação na polinização (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2004). Sendo esse um processo ecológico de grande importância não somente para a reprodução sexuada das angiospermas, mas também, para a produção de frutos, outros alimentos, a manutenção e conservação das redes de interações entre plantas e animais (YAMAMOTO et. al., 2010).

2.1.1. Abelhas Sem Ferrão

As abelhas nativas caracterizam-se por possuírem o ferrão atrofiado, impossibilitando seu uso, sendo conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão. São encontradas mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão conhecidas em todo mundo, muitas destas nativas do Brasil. Devido à exploração predatória dos enxames, várias espécies destas abelhas encontram-se ameaçadas de extinção (FREITAS, 2001).

Abelhas indígenas sem ferrão ocupam grande parte das regiões de clima tropical, temperado e subtropical do planeta. Estas abelhas constroem os seus ninhos com materiais diversos, que são encontrados na natureza. A partir da polinização da flora da região, as abelhas produzem diversos produtos para auxiliar em sua sobrevivência, protegendo-as e alimentando-as, destaca-se a produção de mel, pólen, própolis, o geoprópolis e batume (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Entre as diversas espécies melíponas, as mais facilmente encontradas são as Jandaíras, Jataí, Uruçu, Mandaçaia e Irapuã, estando presente em todas as regiões do Brasil, em especial as tropicais e as regiões subtropicais do mundo. Estas são encontradas em sua maioria com porte minúsculo a médio. O gênero *Melipona* é o que possui maior número de espécies, e ocorre em toda a região neotropical, sendo mais diversificada na bacia amazônica (SILVEIRA et al., 2002).

As populações de abelhas sem ferrão estão em declínio em vários habitats alterados, inclusive naqueles fragmentados. Atividades antrópicas e o corte de madeira que levam à destruição de árvores usadas na nidificação de abelhas nativas são apontadas como importantes causas deste declínio. Em algumas regiões do nordeste brasileiro, principalmente na caatinga, os extratores de mal têm destruído sistematicamente várias árvores para obter os produtos produzidos pelas abelhas que podem vir a serem utilizados, seja como alimento, ou para medicamento, e/ou alternativa de renda (CASTRO, 2001; 2005).

2.1.2. Própolis De Abelhas Indígenas Sem Ferrão

Apesar da tradição que envolve o país por criações de abelhas europeias *Apis mellífera* e o consumo de seus produtos, sendo ainda a mais conhecida entre os brasileiros. O Brasil despertou para a criação racional das abelhas sem ferrão, com cerca de 190 espécies de meliponíneos. A meliponicultura tem passado por novos ciclos de valorização, e esse

redescobrimto da atividade tem levado ao desenvolvimento de grande número de estudos voltados para o conhecimento de aspectos da biologia e comportamento, como também, daqueles que visam à caracterização dos produtos das colônias em relação a seus constituintes nutricionais e farmacológicos (SOUZA, 2007; LOPES, 2005; ALVES, 2007).

A própolis é uma substância resinosa coletada em árvores pelas abelhas, que mastigam, adicionando enzimas salivares e misturando com cera, pólen e materiais inorgânicos. A palavra "própolis" vem do grego "pro", em favor de, e "polis", cidade, significando em defesa da colmeia. Sua constituição a faz uma substância pegajosa, altamente adesiva que é usado pelas abelhas para preencher as fendas das colmeias, proteger contra a entrada de invasores. Outro uso da própolis pelas abelhas é durante o processo de embalsamamento de insetos mortos dentro da colmeia. Ela é usada também como agente antimicrobiano diminuindo a presença de micro-organismos dentro da colmeia (LUSTOSA et. al., 2008).

O homem tem utilizado a própolis desde o antigo Egito onde fazia parte juntamente com outras substâncias, do embalsamamento dos mortos. Existem, registros de uso da própolis pelos gregos, romanos, árabes, na Idade Média e entre os Incas (BRUMFITT et al., 1990).

Própolis tem um cheiro característico e mostra propriedades adesivas porque ele interage fortemente com óleos e proteínas da pele. Em geral, quando *in natura* é composta de 30% cera, 50% resina e bálsamo vegetal, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e de outras substâncias (BURDOCK, 1998).

No Brasil, a própolis é coletada durante todo o ano e, portanto, existem variações sazonais na sua composição. Estas variações são importantes para a aplicação prática da própolis, orientando a sua coleta para as estações onde existe uma maior concentração de compostos biologicamente ativos. Por outro lado, as variações sazonais podem fornecer informações acerca das plantas utilizadas como fonte da própolis brasileira (BANKOVA et al., 1998).

Existem grandes variações na composição qualitativa das frações voláteis da própolis de *Apis mellífera* de zonas temperadas e de regiões tropicais. A própolis de regiões de clima temperado pode ser classificada em dois tipos, conforme o constituinte volátil majoritário seja o β -eudesmol ou o benzoato de benzila. Nos países de clima tropical existem grandes diferenças na composição química dos voláteis de própolis obtidos a partir de diferentes localidades, dificultando a sua caracterização, o que não é muito diferente da própolis de abelhas nativas sem ferrão. (PETRI et al., 1988)

A constituição dos compostos voláteis de própolis depende, também, das espécies de abelhas que a elaboraram. Os compostos voláteis da própolis oriunda de abelhas *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão *Melipona beechei* da mesma região (península de Yucatán, no México) foram comparados, tendo sido identificados 120 substâncias, 21 delas presentes apenas na própolis de *A. mellifera* e outras 15 encontradas unicamente na própolis de *M. beechei*. Observaram-se diferenças acentuadas na composição de cada amostra, embora a vegetação existente nas regiões onde elas foram coletadas seja similar, o que indica que diferentes espécies de abelhas apresentam preferência por variadas fontes botânicas para a elaboração da própolis (PINO et al., 2006).

A composição de uma própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (KUMAZAWA et al., 2004). Entretanto, a composição da própolis também varia sazonalmente em uma mesma localidade (SFORCIN et al., 2000). Não só a composição química da própolis é determinada pelas características da vegetação da região, mas também as reservas de pólen e mel. Como consequência desta composição química diferenciada da própolis, ocorre também uma variação nas suas atividades farmacológicas (MENEZES, 2005).

2.1.3. Atividade Biológica da Própolis

Pinto (2011) refere-se à própolis como um produto natural, que passou a ser utilizada em diferentes regiões do Brasil e do mundo para diversas finalidades medicinais entre elas a cicatrização de feridas e antimicrobiana.

A própolis tem sido bastante estudada devido as suas propriedades biológicas, levando-a a ser caracterizada por possuir atividade antibacteriana, antifúngica e propriedade cicatrizante. Com isso, tem sido incentivado o seu alto uso pela medicina popular no tratamento de feridas e infecções das vias orais, também como anti-micótico e cicatrizante (UZEL et al., 2005).

A composição química da própolis depende de vários fatores que podem estar relacionados também com as atividades por ela desempenhada. Segundo Da Silva et al., (2013), a própolis apresenta em sua constituição química diversos componentes, entre eles os flavonoides, compostos fenólicos em geral, compostos aromáticos, polifenóis, ésteres, entre outros. Esta composição depende diretamente da localização geográfica em que estas colmeias estão sendo cultivadas, das condições climáticas do ambiente e da vegetação que as abelhas retiram os alimentos e substâncias necessárias para o desenvolvimento adequado das

colmeias. Portanto, a composição química é variável de região para região, modificando também os compostos bioativos da própolis (PEREIRA, 2011).

A variabilidade das propriedades físicas e químicas da própolis cria dificuldades para o controle de qualidade, a grande parte destas dificuldades está relacionada à ausência de controle da origem da própolis. Esta informação é crucial para determinação da composição química e, conseqüentemente, sua atividade farmacológica (BANKOVA, 2000).

A procedência da própolis define um perfil químico específico (tipagem) que é normalmente determinado por técnicas de separação como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG). Estes métodos são geralmente laboriosos e exigem a utilização de solventes durante a extração dos compostos. Para um eficiente controle de qualidade, é desejável determinar a tipagem da própolis, o que irá permitir à indústria farmacêutica e cosmética fazer um uso mais específico dos seus derivados (CUNHA et al., 2009).

Própolis de abelhas sem ferrão são utilizadas popularmente para tratamento de diferentes doenças, com várias atividades biológicas já comprovadas (VELIKOVA et al., 2000; MACIEL, 2005; BANKOVA; POPOVA, 2007; ASSUNÇÃO, 2008; FARNESI et al., 2009; LIBERIO et al., 2009), porém, para o uso no sistema de saúde pública, é necessária a padronização química do produto natural na garantia da qualidade, eficácia e segurança (CUNHA et al., 2009).

Por apresentar ação antisséptica, representando um mecanismo de defesa das abelhas contra micro-organismos, a própolis coletada da produção meliponícola no Brasil, deve suas ações antimicrobianas à presença de ácidos p-cumáricos, prenilados e diterpenos (BANKOVA et al., 2005).

Segundo Sanches (2012), a própolis extraída de várias espécies de melíponas diferentes apresentam atividade antibacteriana como, por exemplo, Tiúba (*M. compressipes*), Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), Borá (*Tetragonaclavipes* sp.), Iraí (*Nanotrigona testaceicornis*), Jataí (*Trigona angustula*), Arapuá (*Trigona spinipennis*), Tubi (*Scaptotrigona* sp.), Uruçu (*Melipona. scutellaris*), Manduri (*Melipona orbignyi*).

Em relação a suas propriedades farmacológicas, estudos mostraram sua atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* e *Streptococcus* spp.) e Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*), protozoários (*Trypanosoma cruzi*), fungos (*Candida albicans*) e vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana-HIV). A própolis apresenta também efeitos anti-inflamatórios em casos agudos e crônicos *in vitro*, imunoestimulatórios e imunomodulatórios, efeitos hepato-protetores e ação

contra radicais livres. Além desses, a própolis apresenta efeito anestésico similar ao da cocaína e efeito regenerativo nos tecidos (CASTALDO et al., 2002). Estudos realizados por Bankova (2007) mostraram que a própolis das abelhas Jataí inibem o crescimento de micro-organismos.

A atividade antimicrobiana da própolis tem sido estudada e relatada por vários autores, que concluem que a ação contra micro-organismos patogênicos está relacionada com as propriedades biológicas da própolis. Estas propriedades fazem com que a própolis tenha uma atividade limitada contra bactérias Gram negativas e seja mais ativa contra bactérias Gram positivas (GARCIA et al., 2004; ANDRADE et al., 2010) .

Krol et al., (1993) estudando as frações isoladas do extrato de própolis, observou que não teve atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, mas quando juntas inibiram o patógeno, comprovando que o sinergismo torna-se responsável pelo potencial terapêutico da própolis. Estudos relataram a atividade antimicrobiana da própolis frente a *Enterococcus* sp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (PINTO et al., 2001; 2003).

2.2. BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM ESTUDO

Uma das principais causas das doenças de cunho infeccioso humano está relacionada com a presença da espécie de bactéria *Escherichia coli*, que é caracterizada pela produção de enterotoxinas que causam principalmente a diarreia, e por isso tem sido amplamente estudada, sendo uma das principais causas de doenças infecciosas humanas (TINTINHO et al., 2013).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são distribuídas e encontradas na natureza. Algumas espécies de *Staphylococcus*, como por exemplo, *Staphylococcus aureus* são frequentemente reconhecidas como agentes causadores de infecções oportunistas em animais e humanos (COUTINHO et al., 2009).

Bactérias patogênicas em geral estão cada vez mais demonstrando o aumento da resistência a antibacterianos de uso farmacológico devido ao uso indiscriminado e irracional dos mesmos. Portanto, tem-se incentivado pesquisadores a buscarem novas técnicas de manejo de fármacos e produtos naturais como fontes viáveis de novos medicamentos que sejam capazes de impedir ou reduzir o crescimento bacteriano de cepas patogênicas resistentes (TINTINHO et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato da própolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão criadas no Rio Grande do Norte.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Verificar a ação antimicrobiana da própolis das espécies Cupira (*Partamona* sp), Jati (*Plebléia* sp), frente às cepas de *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
- Comparar os resultados obtidos com antibióticos de uso farmacológico.

4. METODOLOGIA

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de própolis de abelhas indígenas sem ferrão das espécies Cupira e Jatí foram coletadas, assepticamente, entre os meses de junho de 2013 a janeiro de 2014, de meliponicultores do estado do Rio Grande do Norte. Em seguida foram levadas para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), localizado na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, onde decorreram as etapas subsequentes.

4.2. PREPARO DOS EXTRATOS DA PRÓPOLIS

Para a produção dos extratos, as amostras de própolis bruta foram pesadas em balança de precisão, posteriormente foram maceradas e transferidas para erlenmeyer onde foi adicionado o solvente extrator que nesse estudo foi utilizado o etanol 70%, nas proporções de 3:7 (p/v) respectivamente.

A extração foi feita em 45°C em banho Maria por sete dias sob agitação vigorosa uma vez ao dia. Posteriormente foram levados a filtração em papel filtro.

A partir dos extratos hidroalcóolicos das própolis, foram obtidas as diluições dos extratos: 100 mg/mL, 75 mg/mL e 50 mg/mL adicionando água destilada estéril.

4.3. PREPARAÇÃO DAS CEPAS

Foram utilizadas quatro cepas padrão, sendo elas, *Enterobacter aerogenes* (ATCC 1304), *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Estas foram reativadas em caldo Brain Heart Infusion –BHI por 24h para obter turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala *McFarland* de acordo com CLSI (2011)

4.4. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ANTIBIÓTICOS *IN VITRO*

Para comparação posterior com o potencial antimicrobiano dos extratos de própolis das abelhas sem ferrão de diferentes espécies foi realizado a técnica de difusão em discos, com algumas drogas antimicrobianas de uso farmacológico. Foram utilizadas as quatro cepas padrão reativadas e suspendidas. O procedimento foi realizado em triplicata, em placas de

petri contendo meio Ágar Mueller-Hinton. A suspensão foi inoculada nas placas com auxílio de swabs esterilizados, pelo método de Kirby-Bauer, com posterior inserção dos discos de antibióticos, sendo os utilizados no experimento: Amicacina (30µg), Ampicilina (10µg), Amoxicilina (20µg), Ciprofloxacina (5µg), Cefalexina (30µg), Gentamicina (10µg), Neomicina (30µg), Eritromicina (15µg), Oxacilina (1µg) e Penicilina G (10U). As placas foram incubadas invertidas a 37°C em estufa por um período de 24h. Em seguida mediu-se, com auxílio de paquímetro, o diâmetro dos halos de inibição.

4.5. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS *IN VITRO*

Para analisar o potencial antimicrobiano dos extratos de própolis, foi utilizada a técnica de difusão em discos (GROOVE; RANDALL, 1955). As placas contendo Ágar Muller Hilton foram semeadas, em triplicata, com as cepas padrão de *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A semeadura foi realizada com o auxílio de swabs, pelo método de Kirby-Bauer. Foram adicionados em cada placa discos de papel filtro contendo as concentrações do extrato hidroalcóolico de própolis utilizadas no experimento, são elas: 100 mg/mL, 75 mg/mL e 50 mg/mL, o controle positivo contendo o antibiótico que apresentou maior halo de inibição no experimento anterior e o controle negativo, água destilada estéril. As placas foram incubadas invertidas a 37° C durante 24h em estufa. E posteriormente, foram realizadas as medições dos halos de inibição com o auxílio de paquímetro com 12 e 24 horas de incubação.

A interpretação dos resultados seguiu de acordo com os dados sugeridos pela Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2011), onde os halos de inibição formados foram comparados com a tabela de referência, sendo os micro-organismos classificados como resistentes, intermediários e sensíveis.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise da diferença significativa entre os halos formados pelos extratos sob as bactérias, nas concentrações avaliadas, foi utilizado o teste de Tukey a 5% para comparação das médias. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ (Software estatístico GraphPad Prism 6 for Windows versão 6.01, setembro 21, 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos na análise da atividade antibacteriana dos antibióticos *in vitro*.

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade de *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* frente a diferentes antimicrobianos de uso farmacêuticos.

Halos de inibição (mm) pelo antibiograma				
	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>
Amicacina	13,0 ^R	20,0 ^S	10,0 ^R	13,0 ^R
Ampicilina	14,0 ^I	*	22,0 ^S	*
Amoxicilina	18,0 ^S	15,0 ^I	27,0 ^S	*
Cefalexina	*	*	*	*
Ciprofloxacina	20,0 ^I	22,0 ^S	24,0 ^S	28,0 ^S
Eritromicina	*	15,0 ^{**}	15,0 ^{**}	*
Gentamicina	12,0 ^R	19,0 ^S	16,0 ^S	14,0 ^I
Neomicina	19,0 ^{**}	15,0 ^{**}	18,0 ^{**}	16,0 ^{**}
Oxaciclina	*	*	*	*
Penicilina G	0	0	23,0 ^{**}	0

*Não houve formação de halo significativo. S-sensível; I-intermediário ;R-resistente. ** = Dados não encontrados na tabela da CLSI para comparação.

Em comparação com a tabela de formação de halos padronizada pela Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, (2011), os resultados obtidos demonstraram que o antibiótico Ciprofloxacina foi o único fármaco que inibiu o crescimento das quatro bactérias em estudo, tendo formação de halos com 20 mm a 28 mm, concluindo que a *Enterobacter aerogenes* demonstrou sensibilidade intermediária e *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram sensíveis ao fármaco. Deste modo a Ciprofloxacina foi o antibiótico escolhido para ser posto em comparação com a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis testados.

Souza et al., (2002) relataram em seus estudos, corroborando com este trabalho, que o antibiótico Ciprofloxacina é eficaz contra a maioria das bactérias Gram negativas e Gram positivas que causam infecções. Campos et al., (2006) também descreve em seus experimentos que a ciprofloxacina demonstrou-se o melhor antibiótico utilizado contra *E. coli*, dentre vários antimicrobianos testados.

Os resultados das análises da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis estão apresentados na tabela 2 e 3.

Tabela 2: Perfil de susceptibilidade de *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* frente ao extrato de própolis de Cupira nas diferentes concentrações.

Extrato de própolis de Cupira										
	12hs					24hs				
	100mg/ mL	75mg/m L	50mg/m L	C N	CP	100mg/ mL	75mg/mL	50mg/ mL	CN	CP
<i>E. aerogenes</i>	9	*	*	*	28	7,33	*	*	*	26
<i>E.coli</i>	9,6	*	*	*	24,5	6,66	*	*	*	25,3
<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	9	7	9	*	20	10,3	7,33	6,33	*	20
<i>S. aureus</i>	11,6	8,33	8,33	*	26	10,6	8	9,33	*	27

*Não houve formação de halo de inibição significativo (considerou-se apenas o diâmetro do disco de papel, * = 6,0 mm).

Com 12 horas de incubação, observou-se que para a espécie Cupira houve formação de halo para as quatro cepas patogênicas testadas. Para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., a formação de halo se deu em todas as diluições do extrato da própolis de Cupira, apresentando os maiores halos respectivamente de 11,6 e 10,3. Entretanto, as bactérias *Enterobacter aerogenes* e *E. coli* apenas foram inibidas com a concentração de 100 mg/mL como observado no gráfico 1.

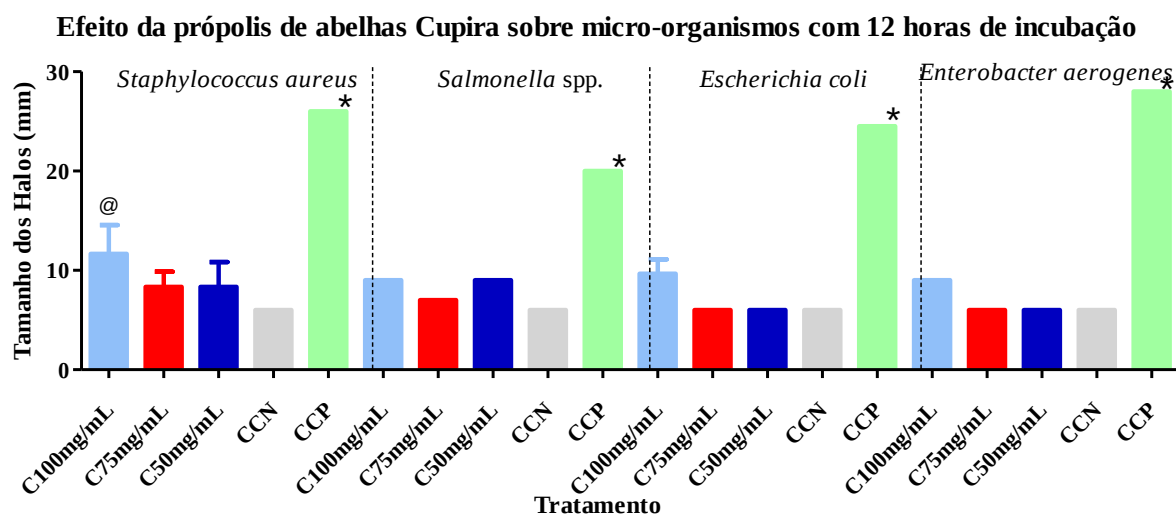


Gráfico 1: Analogia do efeito do extrato da própolis de Cupira em diferentes concentrações frente as cepas bacterianas testadas após 12 horas de incubação. *- maior resultado encontrado no estudo referente ao antibiótico Ciprofloxacina. @- maior resultado encontrado referente as concentrações do extrato testados.

Após 24 horas de incubação, observou-se que a espécie Cupira, inibiu as cepas patogênicas testadas. A *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* foram sensíveis, ou seja, formaram halos de inibição, ao própolis nas concentrações de 100 mg/mL, 75 mg/mL e 50 mg/mL, semelhante a primeira leitura. As demais, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*, o extrato formou halo superior apenas na concentração de 100 mg/mL (Gráfico 2).

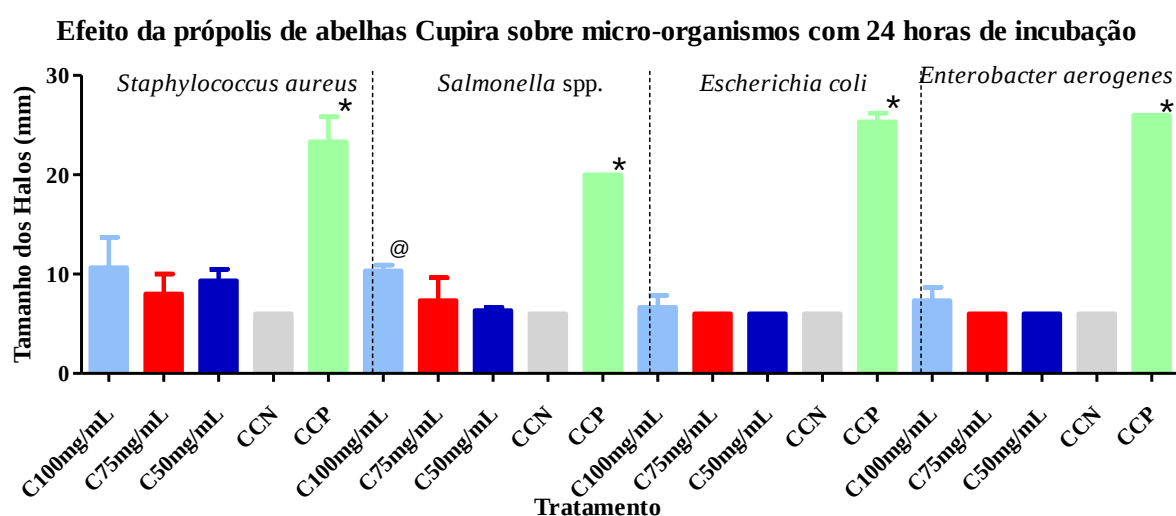


Gráfico 2: Comparação do efeito do extrato da própolis de Cupira em diferentes concentrações frente as cepas bacterianas testadas após 24 horas de incubação. *- maior

resultado encontrado no estudo referente ao antibiótico Ciprofloxacina. @- maior resultado encontrado referente as concentrações do extrato testados.

Em relação ao extrato da própolis da espécie Jatí, com 12 horas de incubação, as bactérias *Salmonella* spp., *Enterobacter aerogenes* e *E. coli* testadas não mostraram formação de halo significativo, apenas *S. aureus* foi inibida na concentração de 100mg/mL (Tabela 3; Gráfico 3).

Tabela 3: Perfil de susceptibilidade de *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* frente a extrato de própolis Jatí nas diferentes concentrações.

Extrato de própolis Jatí										
	12hs					24hs				
	100mg /mL	75mg/m L	50mg/m L	C N	C P	100mg/m L	75mg/m L	50mg/m L	C N	C P
<i>E. aerogenes</i>	*	*	*	*	25	7	*	*	*	22
<i>E.coli</i>	*	*	*	*	24	*	*	*	*	27
<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	*	*	*	*	12	11,33	*	*	*	19
<i>S. aureus</i>	10,33	*	*	*	28	11,33	*	*	*	27

*Não houve formação de halo de inibição significativo (considerou-se apenas o diâmetro do disco de papel, * = 6,0 mm).

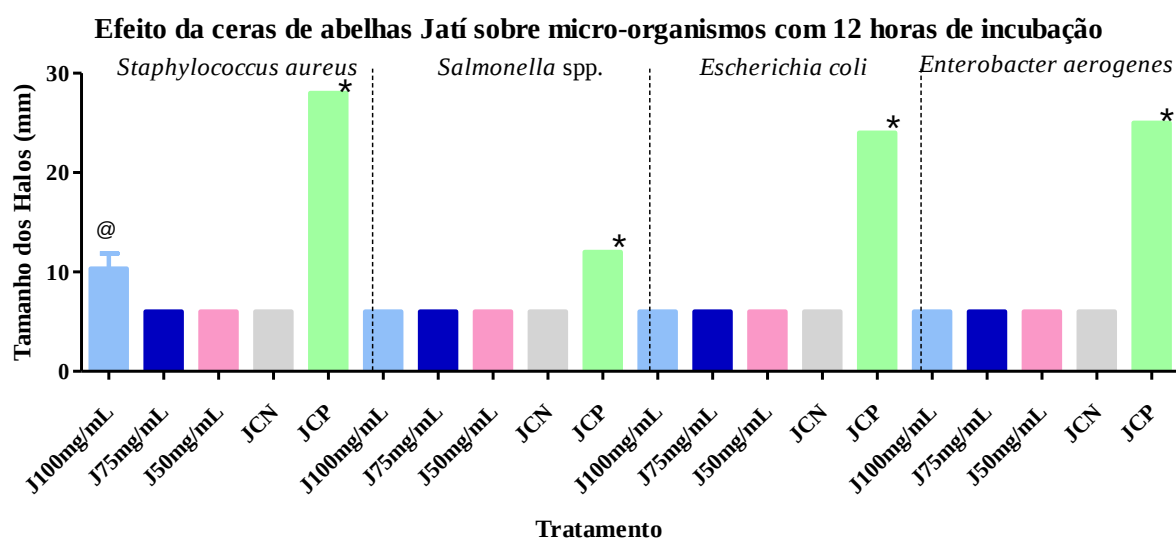


Gráfico 3: Comparação do efeito do extrato da própolis de Jatí nas diferentes concentrações sobre as quatro cepas patogênicas com 12 horas de incubação. *- maior resultado encontrado no estudo referente ao antibiótico Ciprofloxacina. @- maior resultado encontrado referente as concentrações do extrato testados.

Já com 24 horas de incubação, foi verificado resultados positivos para *Salmonella* spp., *S. aureus* e *E. aerogenes* com formação de halo na concentração de 100mg/mL com média de 11,3 mm para as duas primeiras e 7 mm. para a *E. aerogenes*. A *E. coli* não demonstrou nenhuma inibição significativa (Gráfico 4).

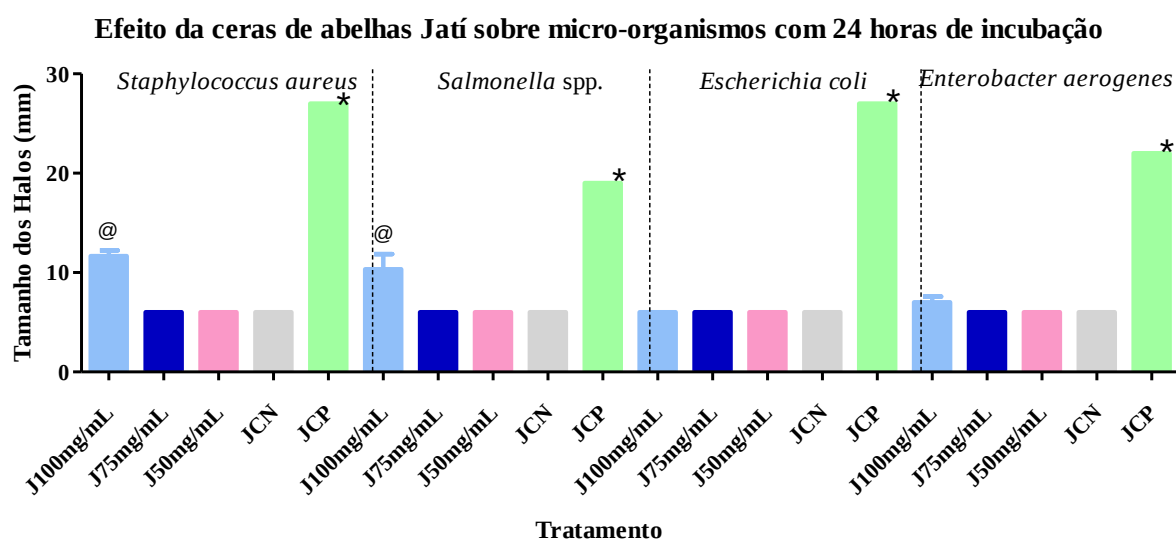


Gráfico 4: Comparação do efeito do extrato da própolis de Jatí nas diferentes concentrações sobre as quatro cepas patogênicas com 24 horas de incubação. *- maior resultado encontrado no estudo referente ao antibiótico Ciprofloxacina. @- maior resultado encontrado referente as concentrações do extrato testados.

Pinto et al., (2001) diz que bactérias Gram negativas são mais resistentes a ação da própolis deixando-a pouco eficaz ou incapaz de inibir o crescimento das bactérias Gram negativas quando comparadas com as Gram positivas, isto acontece devido as diferenças na constituição química e conteúdo lipídico encontrado nas paredes celulares dos dois grupos de bactérias. Fato observado neste experimento, onde das quatro cepas três eram Gram negativas e destas apenas uma foi sensível, o que corrobora com Pinto et al., (2001), uma vez que apenas *Salmonella* spp., bactéria Gram negativa, mostrou-se sensível a ação dos extratos sendo inibida em todas as concentrações do extrato da própolis de Cupira em ambas as horas de medição do halo de inibição. Já o extrato de Jatí apenas foi capaz de inibir a bactéria na concentração de 100mg/mL com 24 horas de incubação. Para *Staphylococcus aureus*, caracterizado como cocos Gram positivos, foi observado inibição do crescimento da bactéria pela própolis de Jatí na concentração de 100mg/mL, tanto com 12 quanto com 24 horas, e a própolis de Cupira conseguiu inibi-la em todas as concentrações com 12 horas de incubação e persistindo o mesmo resultado após 24 horas.

Fianco et al., (2013), observaram em seus estudos, a comparação da atividade antimicrobiana de extratos da própolis das espécies Jataí (*Tetragonisca angustula*) e *Scaptotrigona*, frente a *S. aureus* e *E. coli*, que a própolis de *Scaptotrigona* conseguiu inibir as bactérias, porém, a de Jataí não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma das espécies bacteriana testadas. Já Farnesi (2007) não encontrou resultados de inibição quando testou as própolis das espécies de Jataí e *Scaptotrigona* frente as mesmas cepas utilizadas por Fianco et al., (2013) que atribui as contradições dos resultados encontrados às diferenças na constituição química da própolis, uma vez que as condições climáticas, sazonais e geográficas podem exercer influência nas plantas que são fontes dessas substâncias.

No presente estudo, o extrato da própolis de Jatí não demonstrou nenhuma inibição frente a cepa de *E. coli*, porém, inibiu as cepas de *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *E. Aerogenes*. No entanto, a Cupira apresentou resultados positivos frente as mesmas bactérias.

Orsi et al., (2005) comparou em seus estudos extratos alcoólicos de própolis de duas regiões brasileiras diferentes frente a isolados de *Salmonella* spp. onde foi verificado após 24 horas de incubação que o extrato de Mossoró-RN demonstrou melhor ação do que a de Urubici- SC. Concluindo que a atividade desempenhada pela própolis depende da região geográfica que ela foi coletada.

Castro et al., (2007) atribuiu a variação da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis a diversidade vegetal em que as abelhas coletam seu material para produção de própolis, bem como a estação climática em que os compostos em questão estão sendo produzidos e coletados uma vez que a ação da própolis em relação as bactérias está diretamente relacionada com os constituintes bioativos da própolis.

Comparando os resultados obtidos dos extratos de própolis com o melhor antibiótico testado para as cepas bactérias, foi possível observar, através da formação dos halos de inibição, que os extratos não demonstraram atividade antimicrobiana tão eficiente quanto o antibiótico ciprofloxacina bem como todos os outros testados, todavia, Lustosa, (2008) relata que a atividade sinérgica da própolis associada a diversos antibióticos, tem sido bastante estudada nos últimos anos inclusive contra cepas resistentes a benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina, podendo, a própolis, ser uma alternativa terapêutica para a resistência microbiana, porém dependente da sua composição.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos da própolis das espécies de abelhas sem ferrão Jatí e Cupira mostraram-se capazes de inibir de forma significativa as bactérias avaliadas, porém quando comparadas com o antibiótico ciprofloxacina demonstraram halos de inibição contra as quatro cepas testadas.

Assim, estudos mais aprofundados são necessários para que novas metodologias possam ser empregadas para favorecer a biodisponibilidade dos compostos bioativos da própolis, bem como para que estes possam ser realmente comprovados cientificamente como compostos com atividade antimicrobiana. Estes também podem ser estudados associados a outras substâncias, onde o sinergismo pode fazer com que sua atividade seja desempenhada de forma mais eficiente.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, R.M.O, SOUZA, B.A, CARVALHO, C.A.L, ANDRADE J.P Substratos vegetais utilizados pela abelha urucu (*Melipona scutellaris*) no litoral norte do Estado da Bahia. **Mensagem Doce** 100: 44-45. 2009.

ALVES. R. M. O; SOUZA, B. A; SODRE, G. S.; FONSECA, A. A.O. Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. **Mensagem Doce** 91: 2-8. 2007

ANDREDE, N. P.C. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis sobre cepas de aeromonas spp. isoladas de peixes. **(Dissertação Mestrado)** Curso de pós-graduação em Ciência Animal. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina- PE. 2010

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V., Popova M. Propolis of Stingless Bees: a Promising Source of Biologically Active Compound. **Pharmacognosy Reviews**, Bulgaria, Vol. 1, 2007.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.; **Apidologie**, 29, 361. 1998

BANKOVA, V.; **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization.** Journal of Ethnopharmacologyv.100, p.114–117. 2005

BRUMFITT, J.M., HAMILTON, M, FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1 – **Propolis**. Microbios V. 62, pag. 19-22. 1990.

BURDOCK, G.A.; Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**. V. 36, pag. 347–363. 1998

CABRAL, R. S. I. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, Vol.32, Nº 6 2009.

CAMPOS, J.P.; TRINDADE, C.S.P.C.; EBERHARDT, G.N.; DALBOSCO, S.; BALESTIERI, J.B.P.; NEGRÃO, F.J.; SOUZA, K.P.; SANTOS, E.L. Potencialantifúngico da própolis de *Meliponaorbigny* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) contra *Candidaalbicans*. **Congresso Brasileiro de Entomologia**, Uberlândia , 22, 2008.

CAMPOS, M.R.H.; KIPNIS, A; BORGES, M.A.D.P.; VIEIRA, C. A. S.;JAYME, L.B. SANTOS ,P; SERAFINI, A. B.. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli*isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, 2006.

CARVALHO, C. A. L.; Mel de abelha sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1-S6, 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P.L.; Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, Vol. 30, No. 7, 1512-1516, 2007.

CASTRO, M. S. Ecologia de nidificação de abelhas eusociais (Apidae) na caatinga. In: _____. A Comunidade de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) de uma área de caatinga arbórea entre os inselbergs de Milagres (12°53'S; 39°51'W), Bahia. 2001. 191 f. **Tese (Doutorado em Ecologia)** - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. p. 106-136. 2001.

CLSI publication M100-S21 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2011.

COLETTTO-SILVA, A. Implicações na implantação da meliponicultura e etnobiologia de abelhas sem ferrão em três comunidades indígenas no estado do Amazonas. **Tese de Doutorado**. Curso de Pós-Graduação em Entomologia, Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM). 2005

COUTINHO, H. D. M. Factors Influencing the Virulence of Candida Spp. **West Indian Medical Journal**, Mona, v. 58, n. 2, p. 160-163. Mar. 2009

CUNHA IBS, SAWAYA ACHF, CAETANO FM, SHIMIZU MT, MARCUCCI MC, DREZZA FT, POVIA GS, CARVALHO P.O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **J Braz Chem Soc** 15: 964-970. 2004.

CUNHA, M. S.; DUTRAS, R P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU B. V. DE B. . Padronização De Extrativos De Geoprópolis De *Melipona Fasciculata* Smith (Tíuba). **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 16, n. 3, ago./dez. 2009

DA SILVA, E.C.C.; MUNIZ, M. P. ; NUNOMURA, R.C.R. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, Vol. 36, No. 5, 628-633, 2013

DUAILIBE, S.A.C.; GONÇALVES, A.G.; AHID, F.J.M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. **J. Appl. Oral Sci.** v.15, n.5, p.420-423.2007.

FARNESI, A. P. Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e Meliponíneos em microorganismos. 2007. **Dissertação (Mestrado em Ciências – Genética)** - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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). **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 21, p. 01-112, 2013.

FREITAS, B.M. A vida das abelhas. Fortaleza: **Craveiro & Craveiro**. Cd-rom, 2001

FUNARI CS, FERRO VO. Análise de própolis. **Cienc Tecnol Aliment.** V. 26:171-178, 2006.

- GARCIA, R.C. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* in vitro e em coelhos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, no. 1, p. 69-77, 2004.
- HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop plantation. **Ann. Review of Entomol.**, v. 44, n. 183- 206. 1999.
- IMPERATRIZ-FONSECA VL, CONTRERA FAL, KLEINERT AMP A Iniciativa Brasileira dos Polinizadores e a meliponicultura. In: **Anais do XV Congresso Brasileiro de Apicultura e I Congresso Brasileiro de Meliponicultura**, Natal. 2004
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte : Acangaú, 144p. 1996.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v.84, n.3, p.329-339, 2004.
- LOPES, M.; FERREIRA, J.B.; SANTOS, G.; Abelhas sem ferrão: a biodiversidade invisível. **Agricultura** (2). 7-9. 2005.
- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Recife - PE, v. 18, n. 3, p.447-454, set. 2008.
- MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3a. **Edição, UFC**, Fortaleza, 2009.
- MENEZES, H. ; Própolis: Uma Revisão Dos Recentes Estudos De Suas Propriedades Farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, jul./set., 2005
- NOGUEIRA-NETO P. A criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo, Ed. **Nogueirapis**, 446p. 1997.
- OLIVEIRA, P.P., VANDENBERG, C., SANTOS, F.A.R.,. Pollen analysis of honeys of *Apis mellifera* L. from Caatinga vegetation of Bahia, Brazil. **Grana** 49, 66 e 75. 2010.
- ORSI, R. O.; SFORCIN, J. M.; RALL, V. L. M.; FUNARI, S. R. C. ; BARBOSA, L.; FERNANDES, JR A.. Susceptibility profile of *salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, V. 11, 2005.
- PALAZUELOS, B. J.M.P. Abelhas nativas sem ferrão - Mýg. São Leopoldo, **Oikos**. 2008.
- PETRI, G.; LEMBERCOVICS, E.; FOLALVARI, M.Em Flavors and Fragrances: a World Perspective; Lawrence, B.M.; Mookherjee, B. D.; Willis, B. J.; eds. **Elsevier**: Amsterdam, 1988.
- PINO, J. A.; MARBOT, R.; DELGADO, A.; ZUMÁRRAGA, C.; SAURI, E.; **J. Essent. Oil Res.**, V.18,p. 53. 2006.
- PINTO, L. DE M. A., DO PRADO N. R. T., DE CARVALHO L. B. Propriedades, Usos E Aplicações Da Própolis. **Revista eletrônica de Farmácia**. Vol. VIII (3), 76 - 100, 2011

SANCHES, M. A.; A Própolis De Abelhas Sem Ferrão E Suas Propriedades Terapêuticas. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 9, n. 1, 2012.

SANTOS, F.A.R. (Ed.), *Apium Plantae*. **IMSEAR**, Recife, 2006.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JUNIOR., A.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1-2, p.243-249, 2000.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras, sistemática e identificação**. Belo Horizonte-MG, 253 p. 2002.

SOARES, A. E. E. & JONG, D. de. Pesquisas com abelhas no Brasil. Ribeirão Preto, SP. **Rev. Brasileira Genética**. 688p. 1992.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, B.A. Meliponicultura tradicional e racional. In: VIT, P.; SOUZA, B.A. (Org.). *Evaluación sensorial de miel de abejas sin aguijón*. Mérida: APIBA; CDCHT; Universidad de Los Andes, p. 17-24. 2007.

SOUZA, D.L.; EVANGELISTA –RODRIGUES, A.; PINTO, M.S.C.; As abelhas como agentes polinizadores. *Revista Eletrônica de Veterinária*. 8 (3):1-7. 2007.

TINTINHO, S.R.; GUEDES, G.M.M.; CUNHA, F.A.B.; SANTOS, K.K.A.; et. al., Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e moduladora dos extratos etanólico e hexânico de bulbo de *Costus arabicus*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 3, p. 732-738, May/June 2013.

TRINDADE, C.S.P.C.; CAMPOS, J.F.; EBERHARDT, G.N.S.; NEGRÃO, F.J.; BALESTIERI, J.B.P.; SOUZA, K.P.; SANTOS, E.L. Avaliação da atividade antimicrobiana da própolis de *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Congresso Brasileiro de Entomologia**, V. 22, , Uberlândia. 2008.

UZEL, A., SORKUN, K., ÖNÇAG, Ö, ÇOGULU, D, GENÇAY, Ö, SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research** 160:189-195. 2005

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

YAMAMOTO, M.; BARBOSA, A.A.A.; OLIVEIRA P.; A polinização em cultivos agrícolas e a conservação das áreas naturais: o caso do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deneger). **Oecologia Australis** 14: 174-192. 2010.