



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

LAÍS ARYEL ANDRADE DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS (Verde,
Vermelha e Marrom)**

MOSSORÓ-RN

2019

LAÍS ARYEL ANDRADE DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS (Verde,
Vermelha e Marrom)**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA,
Centro de Ciências Agrárias para a obtenção
do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Patrícia de Oliveira Lima.

MOSSORÓ-RN

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

O11a OLIVEIRA, LAÍS ARYEL ANDRADE DE.

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DOS EXTRATOS DE
PRÓPOLIS (Verde, Vermelha e Marrom)/ LAÍS ARYEL
ANDRADE DE OLIVEIRA. - 2019.

36 f. : il.

Orientadora: PATRÍCIA LIMA DE OLIVEIRA.

Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Zootecnia, 2019.

1. Potencial antimicrobiano. 2. Própolis. 3.
Apis mellifera. 4. Compostos fenólicos I. LIMA DE
OLIVEIRA, PATRÍCIA, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas

da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, que iluminou e guiou meus passos durante esta caminhada, e que em meio a tantas dificuldades enfrentadas, em nenhum momento me deixou desamparada.

Aos meus pais, Ana Teresa Andrade Costa de Oliveira e Jocelito Moraes de Oliveira, que não mediram esforços para que eu pudesse chegar até esta etapa da minha vida.

A minha avó Maria Marlene Andrade Costa e minha família que sempre me incentivaram a lutar por meus sonhos, por todo cuidado e dedicação.

Ao meu namorado, melhor amigo e companheiro de todas as horas, Henrique Fontes, pelo carinho, compreensão, amor e muita paciência, me apoiando e ajudando através de palavras de otimismo nos momentos em que me vi desmotivada.

Aos colegas de turma e grandes amigos, Marília Tavares, Nayane Valente, Nyanne Oliveira, Nicolas Lima e Leandro Alves, pelo comprometimento e companheirismo nos momentos que sempre precisei, vocês têm minha eterna gratidão.

À minha amiga Vivianne Azevedo, por todas palavras de apoio e carinho nessa fase final.

À minha orientadora Patrícia, pela oportunidade de fazer parte do grupo do PET que me acolheram com todo carinho, e também pelo apoio para minha formação acadêmica.

À Ana Paula e Carla Campelo por toda ajuda durante o experimento.

Por fim, a todos aqueles que de alguma maneira fizeram parte da minha vida durante os anos de graduação e de forma direta ou indireta ajudaram e acreditaram em mim, quero deixar meu muito obrigada, porque sem vocês nada disso teria sido possível.

Minha gratidão!

*“A felicidade pode ser encontrada
mesmo nas horas mais difíceis, se você
lembrar de acender a luz. ”*
Albus Dumbledore

RESUMO

A própolis, produzida pelas abelhas possui diversas funções na colmeia, dentre elas a ação defensiva, contra invasores e insetos, além de promover o ambiente asséptico da mesma. Desse modo, objetivou-se avaliar o potencial antibacteriano dos extratos de própolis (verde, vermelha e marrom) frente a cepas de dez microrganismos selecionados. Foi utilizado o extrato das própolis verde, vermelha e marrom nas concentrações de 8%; 6%; 4% para cada extrato, as quais correspondem a 34,28 mg/ml, 25,714 mg/ml, e 17,142 mg/ml respectivamente. Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de própolis contra os microrganismos selecionados, foi realizado o teste de microdiluição de acordo com o CLSI (2015) utilizando placas de 96 poços de fundo chato, foi feito o teste de concentração bactericida mínima (CBM) com o intuito de avaliar o efeito dos extratos se seria bactericida ou bacteriostáticos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste Tukey, ao nível de 5% de significância utilizando o programa SISVAR versão 5.6. Diante disso, o extrato de própolis vermelha apresentou uma taxa de inibição de 40% sobre os microrganismos testados. Onde a concentração de 34,28 mg/ml (8%) do extrato de própolis vermelha, mostrou-se mais efetiva contra os microrganismos testados. Os resultados obtidos demonstraram valores de CIM próximos aos encontrados na literatura. Para os extratos de própolis verde e marrom, ambas não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, não havendo diferença estatística entre esses.

Palavras-chave: Potencial antimicrobiano, própolis, *Apis mellifera*, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Propolis, produced by bees has several functions in the hive, among them defensive action against invaders and insects, as well as promoting the aseptic environment of the same. In this way, the objective was to evaluate the antibacterial potential of the propolis extracts (green, red and brown) against strains of ten selected microorganisms. The extracts of green, red and brown propolis were used in concentrations of 8%; 6%; 4% for each extract, which corresponds to 34.28 mg / ml, 25.714 mg / ml, and 17.142 mg / ml respectively. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the propolis extracts against the selected microorganisms, the microdilution test according to the CLSI (2015) was performed using 96-well flat bottom plates, the minimum bactericidal concentration test (CBM) in order to evaluate the effect of extracts if it would be bactericidal or bacteriostatic. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means were compared using the Tukey test, at a level of 5% of significance using the SISVAR program version 5.6. Therefore, the red propolis extract had a 40% inhibition rate on the tested microorganisms. Where the concentration of 34.28 mg / ml (8%) of the red propolis extract was shown to be more effective against the tested microorganisms. The results showed MIC values close to those found in the literature. For extracts of green and brown propolis, both had no antimicrobial activity at the concentrations tested, and there was no statistical difference between them.

Keywords: Potential antimicrobial, propolis, *Apis mellifera*, phenolic compounds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da própolis brasileira de acordo com as características físico-químicas.	16
Tabela 2. Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato alcoólico de própolis vermelha frente às bactérias Gram-positivas, número de colônias por concentração.....	30
Tabela 3. CBM do extrato de própolis vermelha frente a bactérias Gram-negativas, número de colônias por concentração.	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação de alguns estudos sobre as diversas atividades terapêuticas da própolis..... 19

Quadro 2 - Resultado do teste da atividade antimicrobiana do extrato de própolis vermelha - Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre amostras de microrganismos selecionados 28

Quadro 3 - Resultado do teste da CIM para o extrato de própolis marrom em diferentes concentrações sobre amostras de microrganismos selecionados..... 29

Quadro 4 - Resultado do teste da CIM para o extrato de própolis verde em diferentes concentrações sobre amostras de microrganismos selecionados..... 29

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amostras a serem diluídas nos poços.....	25
Figura 2. Poços semeados com caldo BHI.	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

CIM – Concentração Inibitoria Mínima

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

BHI – Caldo infusão cérebro-coração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1 A PRÓPOLIS	15
2.2 TIPOS DE PRÓPOLIS E SEUS BENEFÍCIOS	17
2.2.1 PRÓPOLIS VERDE	17
2.2.2 PRÓPOLIS VERMELHA	17
2.2.3 PRÓPOLIS MARROM	17
2.2.4 BENEFÍCIOS DO PRÓPOLIS	18
2.3 PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA	20
2.4 FORMAS DE DETERMINAR AÇÃO ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 OBTENÇÃO DAS PRÓPOLIS	24
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	24
4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	24
4.4 PREPARO DAS CEPAS	24
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	25
4.6 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	27
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AOS EXTRATOS	28
5.2 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA	30
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa natural produzida pelas abelhas, através da colheita de diversas partes das plantas e exsudatos, utilizada como material defensivo da colmeia contra insetos e invasores, além de contribuir para assepsia da mesma (MACHADO, 2016). É também utilizada pelo homem por possuir propriedades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante, antisséptica, entre outras (SILVA et al., 2013).

As características da composição química da própolis, varia de acordo com as condições climáticas e de vegetação no local onde a colmeia é formada (PORTILHO et al., 2013). De acordo com Gómez-Caravaca et al., (2006), a própolis é basicamente constituída por 50 a 60% de resinas e bálsamos, 30 a 40% de ceras, 5% de pólen, substâncias minerais, e vitaminas em pequenas proporções. Estes valores referem-se à espécie *Apis mellifera* L., cuja própolis é a mais estudada entre as abelhas. Dentre essas substâncias destacam-se os compostos fenólicos, ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas de grande interesse biológico, indicados como responsáveis pelo desempenho antimicrobiano e antioxidante da própolis (FERNANDES JUNIOR et al., 2006).

De todos esses grupos de compostos, certamente o que mais vem chamando a atenção dos pesquisadores é o dos flavonoides (HAVSTEEN, 2002). Os flavonoides são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (MANACH et al., 2004). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonoides. A presença e a concentração destes compostos são utilizadas como índice de qualificação de amostras de própolis (LU et al., 2005). A ingestão de flavonoides interfere em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e ação de vitaminas, atuando nos processos de cicatrização como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune (WILLIAMS et al., 2004).

Na medicina, o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos têm levado à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004).

Nesse contexto, os produtos gerados pelas abelhas *Apis mellifera* vêm sendo amplamente estudados em virtude da importância econômica desses compostos, uma vez que o Brasil desempenha papel importante na produção de distintas variedades de mel e própolis usualmente comercializada na forma de seu extrato alcoólico (BACAXIXI et al., 2011).

A resina contida na própolis é coletada na vegetação das cercanias da colmeia. O espectro de voo de uma abelha *Apis mellifera* abrange um raio de cerca de 4-5 km em torno da colmeia, de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, bem como resina para a própolis. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta (TEIXEIRA et al., 2005). Possivelmente, esta escolha esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como um antisséptico (SAHINLER & KAFTANOGLU, 2005).

De acordo com Diedrich (2015), a atividade antimicrobiana vem sendo determinada em diversos tipos de própolis em diferentes regiões do Brasil. Sendo a própolis responsável pelo ambiente asséptico da colmeia, espera-se desta alguma atividade frente a microrganismos, sendo a própolis responsável pelo ambiente asséptico da colmeia, espera-se desta alguma atividade frente a microrganismos.

Tratando-se da atividade antibacteriana da própolis, as bactérias são organismos simples, unicelulares procariontes, autótrofas ou heterótrofas, aeróbias ou anaeróbias. Embora algumas espécies de bactérias sejam de grande importância industrial, outras são patogênicas a outros organismos vivos, inclusive ao ser humano, ocasionando infecções de diferentes níveis (PINTO et al., 2000). Por este motivo, faz-se necessário o desenvolvimento de materiais que possam inibir seu crescimento, contendo assim estas infecções.

Diante do exposto, objetivou-se no presente estudo, avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos da própolis (verde, vermelha e marrom).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A PRÓPOLIS

A própolis é uma substância resinosa, elaborada por abelhas a partir de partes de plantas, compreendendo cera, pólen e resinas, além de secreções das glândulas da cabeça das abelhas (MELO, 2014). É destinada a diferentes propósitos, na colmeia, tais como selar fissuras ou vedar espaços e embalsamar insetos invasores, evitando sua decomposição e o crescimento de micro-organismos que possam infectar a colônia (ZUNINI et al., 2010).

Há relatos de que a própolis vem sendo utilizada há séculos e por diferentes povos, como os egípcios, utilizando-a para embalsamar os mortos e evitando a putrefação dos corpos. Os gregos e romanos, atribuíram seu uso como agente antisséptico e cicatrizante; e pelos incas, como antipirético (SFORCIN & BANKOVA, 2011).

Na indústria farmacêutica, a própolis vem sendo largamente utilizada no preparo de extratos etanólicos e usualmente comercializados como tal (PEREIRA, 2008). Em relação a indústria de cosméticos, a própolis tem seu uso principal na formulação de creme dental, cremes cosméticos de antienvelhecimento (SOUZA e GONÇALVES, 2008), sabonetes e outros produtos com ação antimicrobiana.

No que se diz respeito ao uso na indústria de alimentos, a própolis é largamente utilizada como aditivo antioxidante de produtos de origem animal (SANTOS et al., 2003) e vegetal (PEREIRA, 2008), além do uso como antimicrobiano em ração animal (FREITAS et al., 2009).

No Brasil, os índios usavam a própolis elaborada por abelhas nativas melíponas na fabricação de ferramentas e como dádiva em sepultamentos (BARTH et al., 2009).

Segundo Melo (2014), as propriedades biológicas da própolis estão relacionadas à presença de uma variedade de compostos biologicamente ativos, cuja ação tem sido amplamente estudada. Diversas pesquisas atribuem a esses compostos ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticarcinogênica, anti-HIV, entre outras (MONTPIED, 2003; ALENCAR et al., 2007; SAWAYA et al., 2011). Essas propriedades variam de acordo com as espécies de abelhas e plantas das quais é coletada a matéria-prima para sua elaboração (SALATINO et al., 2005), além de fatores como sazonalidade e tipo de coletor utilizado nas colmeias (LIMA, 2006).

Desse modo, existem diversos tipos de própolis cada qual com suas propriedades. A própolis brasileira foi classificada em 13 grupos divididos de acordo com as sua composição

fenólica, coloração e região de produção. Os estudos realizados por Park et al., (2000) promoveram a coleta de mais de 500 amostras de própolis provenientes das regiões sul, sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil.

Identificaram-se compostos de coloração amarela, marrom, verde, vermelha e o geoprópolis, coletados de botões florais ou resinas de plantas como a *Populus spp* (Grupo 6), *Baccharis dracunculifolia* (Grupo 12) e de *Dalbergia ecastophyllum* (Grupo 13) (PARK, 2000; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; PARK et al., 2004).

Tabela 1. Classificação da própolis brasileira de acordo com as características físico-químicas.

Extrato etanólico de Própolis			
Grupos	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Origem Geográfica
1 (RS)	Amarelo	63,0	Sul
2 (RS)	Castanho claro	57,5	Sul
3 (PR)	Castanho escuro	65,0	Sul
4 (PR)	Castanho claro	54,5	Sul
5 (PR)	Marrom esverdeado	58,7	Sul
6 (BA)	Marrom avermelhado	45,9	Nordeste
7 (BA)	Marrom esverdeado	43,8	Nordeste
8 (PE)	Castanho escuro	41,3	Nordeste
9 (PE)	Amarelo	46,7	Nordeste
10 (CE)	Amarelo escuro	24,1	Nordeste
11 (PI)	Amarelo	23,1	Nordeste
12 (SP, MG)	Verde/marrom esverdeado	61,0	Sudeste
13 (AL, BA, PB)	Vermelha		Nordeste

(RS: Rio Grande do Sul; PR: Paraná; BA: Bahia; PE: Pernambuco; CE: Ceará; PI: Piauí; SP: São Paulo; MG: Minas Gerais; AL: Alagoas; BA: Bahia; PB: Paraíba).

Fonte: adaptado de PARK et al., 2000.

Cinco dessas própolis são produzidas na região Sul, uma do Sudeste e seis do Nordeste. De acordo com Park et al. (2002), a *Hyptis divaricata* é a principal fonte de resina da própolis nordestina, a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) da própolis do Sudeste e *Populus nigra* (álamo) da própolis do Sul. Cada própolis tem suas particularidades de cor, odor, consistência e composição.

2.2 TIPOS DE PRÓPOLIS E SEUS BENEFÍCIOS

2.2.1 PRÓPOLIS VERDE

A própolis verde, identificada para o grupo 12 é originária do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) e destaca-se pela composição de cerca de 16 compostos fenólicos com a presença majoritária dos flavonoides artepelin C e bacarina, os quais não são encontrados em outros grupos de própolis (FUJIMOTO, 2016). Este grupo destacou-se por apresentar múltiplas atividades biológicas incluindo: antioxidante (MELLO, 2012); imunossupressora (CHEUNG et al, 2011); anticarcinogênica (HATTORI et al., 2011) e antimicrobiana (MUTTON et al., 2014). O potencial de atividade antimicrobiana de extratos de própolis em geral, constitui uma das atividades biológicas mais estudadas deste produto. Isso se deve a efeitos relacionados a sua baixa toxicidade e a possibilidade de sua utilização como antimicrobiano alternativo à inibição de micro-organismos resistentes à antibióticos (RESENDE et al., 2007; ROBLES-ZEPEDA et al., 2012).

2.2.2 PRÓPOLIS VERMELHA

Própolis normalmente é uma resina amarela escura ou amarronzada. Recentemente, foi encontrada uma própolis vermelha em colmeias localizadas ao longo do mar e costas de rios no nordeste brasileiro que foi classificada então como própolis do grupo 13 (FUJIMOTO, 2016). Ainda segundo Fujimoto (2016), foi observado que as abelhas coletavam o exsudato vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae). Através de análises químicas e histológicas foi comprovado a existência de um novo grupo de própolis de origem botânica *Dalbergia ecastophyllum* com alta atividade antimicrobiana e anti-radical livre.

2.2.3 PRÓPOLIS MARROM

A própolis marrom, conhecida como tradicional ou própolis comum, é amplamente encontrada e produzida em todo o território nacional, é coletada pelas abelhas em diversos tipos de vegetação e não apresenta nenhuma característica botânica predominante conhecida,

além disso, possui uma coloração que pode variar entre o marrom claro ou marrom esverdeado e preto, dependendo de sua origem (PARK, 2002).

Em sua composição podemos encontrar diversas enzimas, flavonoides, compostos fenólicos, entre outros, em concentrações mais baixas se comparadas com a própolis verde ou vermelha (PICOLI, 2016). Por isso, a própolis tradicional também é usada para tratar diversas doenças, porém com resultados menos satisfatórios.

2.2.4 BENEFÍCIOS DO PRÓPOLIS

Os benefícios da própolis tem sido alvo de estudos pelo mundo, hoje é possível encontrar o produto própolis em diversas formas no mercado, seja ela em capsulas, balas, ou extrato de própolis (versão mais concentrada da própolis).

Segundo Menezes et al. (1997), as caracterizações das propriedades biológicas, juntamente com o crescente estímulo da utilização de produtos naturais, têm resultado no aumento da demanda de própolis e seus derivados, como extratos etanólicos, tabletes, cápsulas, sprays ou pomadas (apud PINTO, 2000, p.19).

Do aspecto farmacológico, a própolis é um dos poucos "remédios naturais" que vêm sendo utilizados por um longo período de tempo por diferentes civilizações (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Embora já existam relatos atribuindo à própolis as mais variadas aplicações em medicina popular e em veterinária (GACS et al., 1993; HEINZE et al., 1998), os estudos científicos vêm corroborando que a própolis possui um grande potencial terapêutico, principalmente, em relação às atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante.

O melhor conhecimento de suas propriedades visa, além da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, a agregação de valor econômico à própolis bruta, a fim de gerar uma fonte econômica de exploração agrícola e extrativismo autossustentável (MENEZES, 2005).

Quadro 1 - Relação de alguns estudos sobre as diversas atividades terapêuticas da própolis.

ATIVIDADE OBSERVADA	EXTRATO - ORIGEM/TIPO	REFERÊNCIA
Antiviral	França/ Etanólico	AMOROS et al. (1992a)
	França/ Etanólico	AMOROS et al. (1992a)
	Alemanha/ Etanólico	HEINZE et al. (1998)
Antifúngica	Cuba/Aquoso e Etanólico	VALDES et al. (1987)
	Polônia/ Tabletes	DOBROWOLSKI et al. (1991)
	Brasil/ Etanólico	HOFFMANN et al. (1998)
Antiprotzoário	Sigma®/ Etanólico e Dimetilsulfóxido	HIGASHI e CASTRO (1994)
	Sigma®/Aquoso e Etanólico	CASTRO e HIGASHI (1995)
	Brasil/Aquoso	MORONI et al. (1999)
Antioxidante	Polônia/ Etanólico	KROL et al. (1990)
	Brasil/ China/ Japão/ EUA/ Metanólico	YAMAUCHI et al. (1992)
	Brasil/Aquoso e Metanólico	MATSUSHIGE et al. (1996)
	Brasil/ Aquoso	MATSUNO et al. (1997)
Hepatoprotetora	Brasil/ Aquoso	SAID (1998)
Antitumoral	Brasil/ Aquoso	MATSUNO et al. (1997)
Imunomodulatória	Bulgária/ Aquoso	IVANOVSKA et al. (1995)
	Brasil/ Aquoso	TATEFUJI et al. (1996)
	Brasil/ China/Japão Aquoso e Etanólico	MIYATAKA et al. (1998)
Anti-inflamatória	Polônia/ Tabletes	DOBROWOLSKI et al. (1991)
	Brasil/ China/Japão Aquoso e Etanólico	MIYATAKA et al. (1997)
Analgésica	Brasil/ Etanólica	MARCUCCI et al. (1999c)
	Brasil/ Etanólico	OKUYAMA et al. (1999)
Broncodilatadora	Brasil/ Etanólica	MARCUCCI et al. (1999c)
Cicatrizante	Brasil/Etanólico	DAMIAN et al. (1999)
Outras	Brasil/Aquoso e Metanólico	MATSUSHIGE et al. (1996)
	Brasil/ Compostos identificados	RAICHASKI et al. (1999)

Fonte: Pinto. (2000, p. 21).

2.3 PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA

Entende-se por antimicrobianos aqueles compostos que possuem atividade inibitória sobre o crescimento de um microrganismo. A síntese desses compostos se dá de forma natural, como os antibióticos, ou de forma química, como os quimioterápicos (PASTORE, 2014). A atividade antimicrobiana pode ser definida como a capacidade de uma substância que, uma vez adicionada ao meio em que determinado microrganismo se encontra, inibe ou inviabiliza o seu crescimento (PELISSARI, 2008).

A própolis é vista como importante agente antimicrobiano, estudos comprovam a influência da sazonalidade na própolis e suas características específicas variadas de acordo com a flora encontrada na região onde a colmeia se encontra (ROSALEN et al, 2007). É garantida à própolis a sua ação antimicrobiana, independentemente de sua origem, pois a mesma age na proteção e desinfecção da colmeia, garantindo um ambiente asséptico, na proteção contra fungos e bactérias (MENDONÇA, 2011). Entretanto, o mecanismo de atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonoides, hidroxiácidos e sesquiterpenos. A proporção destas substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma, logo a origem geográfica da própolis é importante no controle de qualidade inclusive para sua efetiva aplicação terapêutica (PARK et al., 2002).

O efeito da atividade antimicrobiana, irá depender da resistência dos microrganismos, por exemplo, no caso de bactérias, estas são organismos simples encontradas em todos os tipos de ambiente, desde que haja condições de umidade e temperatura para que a sua reprodução aconteça, elas podem ser classificadas em dois grandes grupos: bactérias Gram positivas e bactérias Gram negativas (DIEDRICH, 2015).

Segundo Vargas (2004), a diferença entre essas bactérias é estrutural: as bactérias denominadas Gram positivas possuem uma grossa camada de um composto denominado peptidoglicano em suas paredes celulares, já as bactérias classificadas como Gram negativas possuem pequena quantidade desse composto na sua parede celular e são mais complexas.

Essa diferença é importante porque os estudos relatam que as bactérias Gram positivas são mais sensíveis ao extrato de própolis quando comparadas as bactérias Gram negativas e essa maior sensibilidade possivelmente é devido as diferenças estruturais entre esses dois grupos (VARGAS, 2004).

Embora algumas espécies de bactérias sejam de grande importância industrial, outras são patogênicas a outros organismos vivos, inclusive ao ser humano, ocasionando infecções

de diferentes níveis (PINTO et al., 2000). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de materiais que possam inibir seu crescimento, contendo assim estas infecções.

Tratando-se da atividade antibacteriana da própolis, pesquisas utilizando distintos tipos de própolis indicam a ação mais eficiente de seus extratos quando frente a bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus cereus*) do que quando comparadas com as gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aerobacter aerogenes* e *Escherichia coli*) (FERNANDES JR et al, 2006; PINTO et al, 2000).

Estudos realizados por Alencar et al (2009), apresentaram a alta atividade antibacteriana da própolis frente a bactéria *Staphylococcus aureus*. O trabalho apresentado por Vargas et al (2004), por sua vez, mostrou a eficácia do extrato etanólico de própolis quando no combate a bactérias, sendo que cerca de 92% das gram-positivas e aproximadamente 43% das gram-negativas foram identificadas como sensíveis ao extrato (DIEDRICH, 2015). Entre as espécies sensíveis estão as dos gêneros *Staphylococcus*, *Nocardia*, *Streptococcus*, *Rhodococcus* (gram-positivas) e *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia* (gram-negativas).

2.4 FORMAS DE DETERMINAR AÇÃO ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS

A ação antimicrobiana de um composto é constatada pelo estabelecimento de determinada substância capaz de impedir ou desacelerar o crescimento de determinado microrganismo (DIEDRICH, 2015). A quantidade necessária para que essa inibição ocorra é denominada Concentração Inibitória Mínima - CIM (OSTROSKY et al., 2008), ou seja, em qual concentração do extrato o microrganismo teve seu crescimento inibido.

Segundo Ostrosky et al. (2008), entre os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana de uma amostra estão os métodos de difusão em placas e de diluição em caldo.

Os métodos de difusão em placas consistem na utilização de disco de papel filtro, onde são embebidos de solução inibidora em placa de Petri contendo meio de cultura inoculado do microrganismo de estudo e posterior medida do halo de inibição formado (PORTILHO et al., 2013), e também através do método de difusão em ágar (caldo), onde o crescimento do microrganismo pode ser observado através de um orifício no ágar acrescido de solução inibidora (PACKER, 2007; TRINDADE et al., 2007).

De acordo Rozatto (2012), esses métodos são de fácil execução e reprodutíveis, porém limitam-se a microrganismos de crescimento rápido (ROZATTO, 2012).

Os métodos de diluição em caldo são utilizados em macro e micro diluição, suas vantagens são o fornecimento de resultados quantitativos não influenciados pela velocidade de crescimento do microrganismo, enquanto que o método de difusão em placas se mostra mais trabalhoso e menos preciso (OSTROSKY et al., 2008). A macro diluição é empregada quando o número de amostras e réplicas é pequeno, pois este utiliza mais recursos e requer mais tempo de preparo de bancada. Carpes et al. (2009) utilizaram a técnica na caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen da região sul do Brasil.

O método de microdiluição em caldo, por sua vez, é de baixo custo e tem reprodutibilidade, além de ser considerado 30 vezes mais sensível que os outros métodos descritos (OSTROSKY et al., 2008; ROZATTO, 2012). Essa técnica utiliza placas de 96 poços com volume entre 0,1 e 0,2 mL e permite a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através do uso de absorbâncias conhecidas ou reveladores como a resazurina, que se reduz na presença de células de microrganismos vivos, perdendo a coloração azul intensa e passando por tons de violeta até a coloração rosa, de acordo com a concentração de células viáveis (ROZATTO, 2012). Na determinação da CIM, é considerado inibitória a concentração do extrato quando não há mudança na coloração azul da resazurina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos de própolis (Verde, Vermelha e Marrom).

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Verificar a menor concentração dos extratos das própolis capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados, e definir qual será mais eficaz no controle de microrganismos;
- Avaliar a ação bacteriostática e bactericida das três própolis contra os microrganismos testados;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS PRÓPOLIS

As amostras de própolis foram fornecidas por apicultores do Rio Grande do Norte (própolis marrom), Minas Gerais (própolis verde) e de Alagoas (própolis vermelha).

4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

A própolis bruta foi submetida à pré-limpeza para retirada de fragmentos e eventuais impurezas, como abelhas, pedaços de madeira, de favo, folhas, traças e outras inclusões, foi lavada com água fria e secada em estufa a 60°C por 10 horas. A própolis foi embalada em sacos de polietileno e armazenada em freezer à temperatura de -5 °C durante 12 horas.

Em seguida, 300 g do material foram fragmentados e acondicionado em um recipiente de vidro âmbar, e o volume completado para um litro com álcool etílico de cereal de arroz a 70%, foram dissolvidos 300g de própolis em 700 ml de álcool 70%.

A mistura foi agitada manualmente, por um minuto, a cada três dias, durante um mês, e armazenado em temperatura ambiente. Após este período, filtrou-se a suspensão em filtro de papel e o extrato hidroalcoólico de própolis está pronto para ser utilizado.

4.3 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

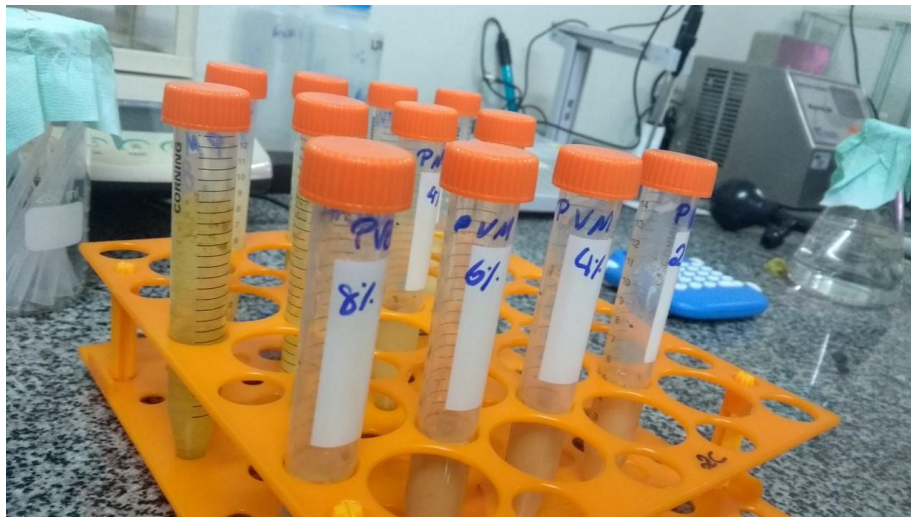
Para a determinação da atividade antibacteriana da própolis foram realizados testes de microdiluições em microplaca de 96 cavidades, seguindo o protocolo estabelecido pelo CLSI 2015 (Clinical and Laboratory Standards Institute), com finalidade de identificar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM).

4.4 PREPARO DAS CEPAS

Inicialmente foi realizado o teste de viabilidade celular com placas de 96 poços para inocular os microrganismos. O período experimental consistiu em 4 dias, a partir da ativação dos microrganismos. Todas as cepas foram reativadas em caldo BHI por 24h para obter

turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala *Mc Farland* de acordo com CLSI (2015).

Figura 1. Amostras a serem diluídas nos poços.



Fonte: Própria

Os ensaios foram realizados sobre bactérias padrões (10 cepas ATCC), cedidas pelo Laboratório de inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da UFERSA – Mossoró/RN. Sendo 5 bactérias Gram-positivas: *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615); *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). E 5 bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603); *Shigella flexneri* (ATCC 12022); *Escherichia coli* (ATCC 25922).

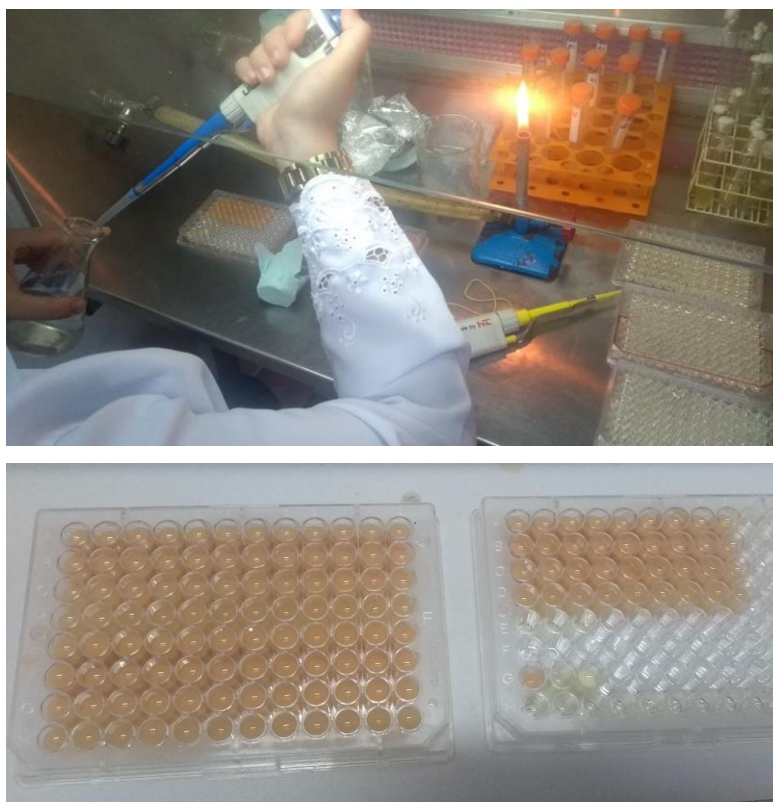
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A fim de descobrir qual a menor concentração das própolis capazes de inibir os microrganismos testados. Foi utilizado o extrato das própolis verde, vermelha e marrom na concentração de 8%; 6% e 4% de cada própolis. O teste foi realizado em triplicata/microrganismo/tratamento.

Para determinar a concentração inibitória mínima dos extratos de própolis (verde, vermelha e marrom) contra os microrganismos selecionados, foi realizado o teste de microdiluição de acordo com o CLSI (2015) utilizando placas de 96 poços de fundo chato.

Cada poço recebeu 100 μL de *Mueller-Hinton Infusion* caldo, 20 μL do inoculo ajustado pela escala de *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC) e 100 μL dos extratos de própolis em concentrações, variando de 8%; 6% e 4%, que correspondem a 34,28 mg/ml, 25,714 mg/ml, e 17,142 mg/ml, respectivamente. Nos poços-controle foram adicionados o meio de cultura e inoculo do microrganismo (controle positivo), e água destilada para o controle negativo. As placas foram incubadas por 24h/37°C.

Figura 2. Poços semeados com caldo BHI.



Fonte: Própria

A leitura foi realizada visualmente através de um teste qualitativo, no qual foi adicionada a resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona-10-óxido) (Sigma®, Steiheim, Alemanha), trata-se de um indicador redox. Após o período de incubação, 10 μL de solução de 0,01% de resazurina em solução aquosa foram adicionados aos poços. Após a adição deste corante as placas foram mantidas em estufa à 37°C por duas horas, e em seguida, lidas.

Na leitura visual foi observada a mudança da cor azul (original da resazurina) para rosa, caracterizando redução desse corante nos poços onde haverá viabilidade bacteriana, e nos poços onde a cor permanecer azul irá se entender que não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana, consequentemente inibição dos microrganismos.

4.6 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Nos poços do CIM em que não houve crescimento bacteriano, de acordo com o resultado observado com a adição de resazurina na etapa anterior, foi feito o teste de concentração bactericida mínima (CBM) para avaliar se as concentrações dos extratos eram bactericidas ou bacteriostáticas.

Para isso, foi retirado 10 µL do poço onde não houve crescimento bacteriano visível, e semeou-se na superfície do ágar *Mueller-Hinton*. Após 48h de incubação a 37°C, foi definida a concentração bactericida mínima como a menor concentração dos extratos em estudo, capaz de causar a morte do microrganismo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste Tukey, ao nível de 5% de significância utilizando o programa SISVAR versão 5.6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS MICRORGANISMOS AOS EXTRATOS

A sensibilidade bacteriana foi visualizada a partir de um corante redox denominado rezasurina, em que não houve mudança de cor nos poços. Os resultados do teste da CIM dos extratos sobre as cepas, estão expressos no (Quadro 2).

Quadro 2 - Resultado do teste da atividade antimicrobiana do extrato de própolis vermelha - Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre amostras de microrganismos selecionados

[] dos extratos (mg/ml)	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9	Cepa 10
34,28 – 8%	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+
25,71 – 6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17,14 – 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[]: Concentração do extrato de própolis vermelha em mg/ml seguido pela concentração em percentual; +: presença de colônia; -: ausência de colônia.

Observa-se que para a cepa 1 (*Pseudomonas aeruginosa*) e 8 (*Streptococcus pyogenes*), a CIM de 34,28 mg/ml (8%) inibiu o crescimento dos microrganismos, apresentando atividade bactericida desta variedade de própolis para essas concentrações testadas.

Siqueira et.al. (2014), obteve resultado semelhante ao testar a própolis vermelha em cepas de *Enterococcus faecalis*, em concentrações de 1%, 2,5%; 5% e 7,5%. Onde, a partir dos resultados obtidos com o teste de inibição, mostraram que não houve crescimento de microrganismo quando se utilizou o extrato de própolis a 7,5%. O extrato de própolis vermelha foi mais eficiente na redução do crescimento de colônias com a concentração de 34,28 mg/ml (8%).

Quadro 3 - Resultado do teste da CIM para o extrato de própolis marrom em diferentes concentrações sobre amostras de microrganismos selecionados.

[] dos extratos (mg/ml)	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9	Cepa 10
34,28 – 8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25,71 – 6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17,14 – 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[]: Concentração do extrato de própolis marrom em mg/ml seguido pela concentração em percentual; +: presença de colônia; -: ausência de colônia.

Os resultados acima corroboram com os estudos de Silva et al. (2017), os extratos de própolis marrom não mostraram atividade antimicrobiana contra as cepas bacterianas testadas. No mesmo estudo afirma que os extratos de própolis verde apresentaram atividade antimicrobiana moderada a fraca (valores de CIM variando de $(250 \text{ a } 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ para a maioria das amostras, diferindo dos resultados encontrados no presente estudo, no qual o mesmo extrato mostrou-se ineficaz.

Esta variação dos resultados sobre a atividade antibacteriana da própolis pode ser explicada por muitos fatores, que podem influenciar decisivamente no resultado dos testes.

Quadro 4 - Resultado do teste da CIM para o extrato de própolis verde em diferentes concentrações sobre amostras de microrganismos selecionados.

[] dos extratos (mg/ml)	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5	Cepa 6	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 9	Cepa 10
34,28 – 8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25,71 – 6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17,14 – 4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[]: Concentração do extrato de própolis verde em mg/ml seguido pela concentração em percentual; +: presença de colônia; -: ausência de colônia.

Para o extrato de própolis verde, os resultados obtidos para CIM não se mostrou eficaz nas concentrações testadas. De modo que não apresentou diferença significativa da MIC do extrato de própolis marrom.

5.2 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Observa-se a diferença da ação antimicrobiana dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas das Gram-negativas.

Tabela 2. Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato alcoólico de própolis vermelha frente às bactérias Gram-positivas, número de colônias por concentração.

Bactérias	N° de isolados	%Extrato		
		8%	6%	4%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	30	42	42
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	48	7	31
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0	2	1
<i>Streptococcus mutans</i>	1	>50	>50	>50
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	>50	18	>50

Tabela 3. CBM do extrato de própolis vermelha frente a bactérias Gram-negativas, número de colônias por concentração.

Bactérias	N° de isolados	%Extrato/N° de colônias		
		8%	6%	4%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	1	50
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	17	>50	>50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	21	43	>50
<i>Shigella flexneri</i>	1	16	22	3
<i>Escherichia coli</i>	1	3	12	2

Os resultados encontrados foram diferentes aos de Vargas et al. (2004), onde verificaram maior sensibilidade das bactérias gram-positivas aos extratos etanólico do que as bactérias Gram-negativas.

Silva et al. (2017), testou a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis vermelha, verde e marrom, na qual a própolis vermelha apresentou maior atividade antimicrobiana contra *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella sp.* com valores de CIM de 62,5 e 31,3µg/mL⁻¹.

As bactérias negativas não apresentam nenhuma sensibilidade aos extratos da própolis marrom e verde. Segundo Pinto (2000), este comportamento, de certa forma, era esperado, uma vez que muitos relatos ilustram que a própolis detém maior poder antibacteriano sobre as espécies Gram positivas, sendo pouco eficaz ou incapaz de inibir o crescimento de bactérias Gram negativas (BRUMFITT et al., 1990; FUENTES e HERNANDEZ, 1990; GRANGE e DAVEY, 1990; WOISKY et al., 1994).

As diferenças observadas nos níveis de atividade antimicrobiana da própolis estão intimamente relacionadas à sua composição química que varia de acordo com a região que é produzida, com a planta fornecedora de resina e a espécie de abelha coletora, portanto, de natureza sazonal (PEREIRA, 2011).

Outro fator a ser considerado é a estrutura da parede celular desses microrganismos. As paredes celulares das bactérias Gram-negativas são mais complexas quimicamente, sendo constituídas de lipopolissacarídeos, que, segundo Vargas et al. (2004), determinam a toxicidade e patogenicidade das bactérias.

Devido as diferenças na composição da parede celular dessas bactérias, os componentes fenólicos da própolis, que são os maiores responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano, segundo os relatos na literatura, não consigam interagir com a parede celular das bactérias Gram negativas da mesma maneira que interagem nas espécies Gram positivas (PINTO, 2000).

As condições de extração também influenciam na ação biológica, sendo que alguns estudos apontam que a própolis verde apresenta potencial antimicrobiano contra *E. faecalis* (SIQUEIRA et al., 2014), o que não condiz com os resultados do presente estudo.

Além das origens diferentes das amostras de própolis estudadas, e por consequência, as suas composições químicas, fatores como, as diferentes estirpes de bactérias de uma mesma espécie, a concentração e metodologia adotada no processo de extração da própolis e, finalmente, o método de avaliação da inibição do crescimento bacteriano (condições de temperatura, tipos de meios de cultura, tempo de incubação, técnicas diferentes de análise) podem alterar completamente o resultado de um experimento em relação ao encontrado por outros pesquisadores (PINTO, 2015).

6 CONCLUSÃO

O extrato de própolis vermelha apresentou potencial antimicrobiano, com a melhor resposta para concentração de 34,28 mg/ml correspondente a maior concentração do extrato utilizado.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- BACAXIXI, Pamela et al. A importância da apicultura no Brasil. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*, São Paulo, n. 20, 2011.
- BARTH, O. M.; BARROS, M. A.; FREITAS, F. O. Análise palinológica em amostras arqueológicas de geoprópolis do vale do Rio Peruaçu, Januária, Minas Gerais, Brasil. *Arquivos do Museu de História Natural e Jardim Botânico*, Belo Horizonte, v. 19, n. 1, p. 277-290, 2009.
- BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. M.; FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. *Microbios*, v. 62, n. 250, p. 19-22, 1990.
- CARPES, S. T.; CABRAL, I. S. R.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Caracterização do Potencial Antimicrobiano dos Extratos de Pólen Apícola da Região Sul do Brasil. *Revista Alimentos Nutrição*. v.20, n.2, p.271-277, 2009.
- CASTALDO, S. & CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2002.
- CHEUNG, K. W. et al. Brazilian green propolis and its constituents, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4T cells expansion and activation. *Journal of Ethnopharmacology*, n.138, p.463-471, 2011.
- CUNHA, M.H. et al. Composição química e atividade biológica do extrato hidroalcoólico de própolis preta. 2018.
- DIEDRICH, C. Atividade Antimicrobiana De Extratos De Própolis Produzidas Por Abelhas Apis Mellifera Seleccionadas. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.
- FERNANDES JÚNIOR, A. LOPES, M.M.R.; Colombari, V.; MONTEIRO, A.C.M. et al. Atividade antimicrobiana de própolis de Apis mellifera obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.1, p.294-297, jan-fev, 2006.
- FREITAS, J. A. de.; ANTONANGELO, R. P.; RIBERITO, J. L.; JOSLIN, M.; NOGUEIRA, S. R. P.; SOUZA, J. C. Extrato Etanólico de Própolis na Alimentação de Vacas Leiteiras. *Revista Brasileira de Saúde. Prod. Ani.* v.10, n.2, p. 333-343, 2009.
- FUENTES, A. M. O.; HERNÁNDEZ, N. R. Accion antimicrobiana de los extractos alcoholicos de propoleo. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 24, n. 1, p. 34-44, 1990.
- FUJIMOTO, Graciela et al. Própolis verde: caracterização, potencial de atividade antimicrobiana e efeitos sobre biofilmes de *Enterococcus* spp. 2016.
- GACS, M.; HUSZENICZA, G.; KE G, T.; VIGH, Z.; STOLLAR, Z.; OLAH, O.; JONSSON . J.; OPPEL, K. Experiences on the effectiveness of an intramammary infusion without containing antibiotics .1. Incidence and clinical-features of mastitis with different bacteriological backgrounds on 7 largescale dairy farms. *Magyar Allatorvosok*, v.48, n.8, p.473- 478, 1993.
- GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1220-34, 2006.
- GRANGE, JM; DAVEY, RW Propriedades antibacterianas da própolis (cola de abelha). **Jornal da Sociedade Real de Medicina** , v. 83, n. 3, p. 159-160, 1990.
- HATTORI, H. et al. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1 modulating compounds from Brazilian green propolis. *Bioorganic & medicinal Chemistry*, n.19, p.5392-5401, 2011.

HAVSTEEN BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Farmacology & Therapeutics**, 96:67-202, 2002.

HEINZE, W.; HOLZ, J.; NATTERMANN, H.; BLANKENSTEIN, P. Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance. *Tierärztliche Umschau*, v.53, n.6, p.321-326, 1998.

Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI) (2015) Padrões de desempenho para teste de susceptibilidade antimicrobiana; Vigésimo quinto suplemento informativo. Documento CLSI M100-S25. CLSI, Wayne, PA, EUA.

LIMA, M. G. A produção de própolis no Brasil. São João da Boa Vista: Unifeob, 2006.

Lu L, Chen Y, Chou C 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* 102: 213-220.

MACHADO B.A.S. et al. Chemical Composition na Biological Activity of Extracts obtained By Supercritical Extractions and Ethanol Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *Plos One*, v.11, n.1, 2016.

MANACH, C.; CALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American J. Clin Nutr.* May, 2004.

MELO, A. A. M. et al. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesqui. Agropecu. Trop.** Goiânia, v. 44, n. 3, p. 341-348, Sept. 2014. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632014000300004&lng=en&nrm=iso>. access on 28 Nov. 2018.

MELLO, B. C. B.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *International Journal of Food Science and Technology*, no 47, p.2510-2518, 2012.

MENEZES, H. et al. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**, v. 28, n. 2, p. 71-76, 1997.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 72, p. 405-411, 2005.

MENDONÇA, Lucyana S. de. Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em saúde e ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

MONTPIED, P. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Molecular Brain Research*, Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 111-120, 2003.

MUTTON, M.J.R. et al. Green and brown propolis: efficient natural biocides for the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation of distilled beverage. *Food Science and Technology*, Campinas, v.34, no4, p.767-772, 2014.

OSTROSKY, Elissa A., MIZUMOTO, Miriam K., LIMA, Marcos, E. L., KANEKO, Telma, M., NISHIKAWA, Suzana O., FREITAS, Beatriz R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacologia*. v. 18, n.2, p.301-307. 2008.

PACKER, J.F.; LUZ, M. M. S. da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v.17, p. 102-107. Mar 2007.

PARK, Y. K. et al. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no 52, p. 110-1103, 2004.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, no 40, p. 2502-2506, 2002.

- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem doce**, v. 58, n. 9, p. 3-7, 2000.
- PASTORE, G.M. O efeito da digestão in vitro sobre a atividade antioxidante de extratos de frutas (*Carica papaya*, *Artocarpus heterophyllus* e *Annona marcgravii*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 59 (2): 1247-1251. DOI: 10.1016 / j.lwt.2014.05.040. 2014.
- PELISSARI, Grace P. Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (rich. in pers.) dc. (asteraceae). 2008. 176 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.
- PEREIRA, D. A. Extração Aquosa de Própolis e Secagem em Leito de Espuma para Uso em Alimentos. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, 2008.
- PEREIRA, I. N. Própolis: matéria-prima de potencial aplicação farmacêutica. 2011. 55p. (Trabalho de conclusão de estágio). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2011.
- PICOLI, T. Caracterização química e ação antibacteriana de extrato de própolis marrom da região sul do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 4, p. 365-371, 2016.
- PINTO, M.S. Efeito antimicrobiano de própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- PINTO, M.S. Curva de sobrevivência de bactérias isoladas do leite de vacas com mastite a três extratos etanólicos de própolis. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 10, n. 1, 2015.
- PORTILHO, D.R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. *Revista Científica do ITPAC*, v. 6, n. 2, abr. 2013.
- RESENDE et al. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. A pilot clinical study. *Helicobacter*, no 12, p.572-574, 2007.
- ROBLES-ZEPEDA et al. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, n.131, p.645-651, 2012.
- ROSALEN, P. L.; CASTRO, M. L.; ALENCAR, S. M., IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudoeste e do Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. *Revista Química Nova*. V.30, n.7, p. 1512-1516, 2007.
- ROZATTO, Mariana R. Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. Dissertação 34 (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP. Araraquara, 2012.
- SAHINLER, N. & KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. *Natural Product Research*, v.19, n.2, p.183-188, 2005.
- SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, New York, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.
- SANTOS, A. V. dos; TEIXEIRA, A. S.; RODRIGUES, P. B. et al. Valor Nutritivo do Resíduo de Própolis Para Frangos de Corte. *Revista Ciência Agrotecnológica*. v.27, n.5. 2003.
- SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, London, v. 27, n. 5, p. 1-10, 2011.
- Sforcin, J.M. & Bankova, V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol*, 133: 253–260.
- SILVA, R.P.D. et al. Propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiparasitárias e citotóxicas de diversos extratos de própolis brasileiros. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172585>>. Publicado em: 30 de março de 2017. Acesso em: 10 de Fev. 2019.

SIQUEIRA, A. L. et al. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, n. 6, p. 359-366, 2014.

SOUZA, J. A. M.; GONÇALVES, G. M. S. Avaliação da Ação Antioxidante de Substâncias Ativas Cosméticas Destinadas à Prevenção do Fotoenvelhecimento Cutâneo. Anais do XIII Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas. Campinas, 2008.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.; MESSAGE, D. & Salatino, A. 2005. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2: 85–92.

TRINDADE, R.C.; NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A.L.C.; RODRIGUES, A.R. A.; SANTOS, A.M. B. J. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. Revista Brasileira de Farmacologia. n. 17, p. 108-113, 2007.

VARGAS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE -EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. Free Radical Biology and Medicine, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

WOISKY, R.G.; GIESBRECHT, A. M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. **Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo**, v. 30, n. 1, p. 19-21, 1994.

ZUNINI, M. P. et al. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. Journal of the Chilean Chemical Society, Concepción, v. 55, n. 1, p. 141-146, 2010.