



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARA

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM DIFERENTE MATURAÇÃO**

Fabio José Garcia Chada

BELÉM – PA

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM DIFERENTE MATURAÇÃO**

Fabio José Garcia Chada

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Chagas Monteiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA**

---

Chada, Fabio José Garcia.

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de própolis em diferente maturação / Fabio José Garcia Chada; orientadora, Marta Chagas Monteiro. — 2013

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia (FACFAR), Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2013.

1. Própolis – Uso terapêutico. 2. Atividade Antimicrobiana. 3. Colméias - Maturação. I. Título.

CDD 22.ed. : 638.12

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabio José Garcia Chada

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de própolis em diferente maturação.

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre.  
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro  
Instituição: PPGCF/UFPA

Assinatura\_\_\_\_\_

Prof. Dra. Ana Cristina Baetas Gonçalves  
Instituição: UFPA

Assinatura\_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira  
Instituição: UFPA

Assinatura\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Chagas Monteiro, por todos os ensinamentos passados, por todas as horas doadas à este trabalho, por todas as ajudas prestadas e principalmente pela paciência de mãe que teve comigo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yohandra Reys Torres, seus alunos e a UNICENTRO pela colaboração com as amostras analisadas neste trabalho, sem eles isto não seria possível.

À minha querida e amada mãe, Sonia Chada, por todos os puxões de orelha, pelo incentivo, por ser sempre uma luz no fim do túnel e principalmente por ser sempre o maior exemplo que tive na vida.

Ao meu pai e meu irmão, por serem exemplos vivos de tudo aquilo que eu nunca devo fazer e quem nunca devo me tornar.

Aos meus amigos de laboratório, mestrandos e IC's pelo convívio e por toda ajuda prestada.

Aos técnicos da faculdade, que por muitas vezes ajudaram e facilitaram a concretização deste trabalho.

À coordenação do PPGCF por sempre serem solícitos e prestativos.

A minha namorada e aos amigos extra faculdade, que apesar de não entenderem o porquê deste trabalho, sempre me apoiaram a concluí-lo.

À todos que de alguma forma colaboraram para este trabalho ser realizado.

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”*

**Simone de Beauvoir**

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

**Arthur Schopenhauer**

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM DIFERENTES MATURAÇÃO

A descoberta e síntese de antimicrobianos compõem um elemento de suma importância para a saúde, entretanto algumas dessas substâncias tornaram-se obsoletas devido ao surgimento de micro-organismos resistentes à terapêutica convencional. Dentro das formas de tratamento, os produtos naturais são uma fonte inesgotável de substâncias, entre elas a própolis, a qual é conhecida mundialmente devido a sua atividade antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi a análise microbiológica de seis amostras de própolis, coletadas de regiões de Prudentópolis-PR, em tempos distintos de depósito em colmeia, uma com até 40 dias de depósito (Própolis Nova) e outra com mais de 180 dias (Própolis Velha). A atividade antimicrobiana foi verificada frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Enterococcus faecalis*, através do ensaio de microdiluição em placa com teste colorimétrico usando resazurina. Ao fim dos testes obteve-se os valores variando entre 0,38 a 0,68 mg/ml para a CIM da própolis nova e 0,34 a 1,3 mg/ml para a velha, para os micro-organismos *S. aureus* e *M. luteus* tendo valores próximos para ambos assim como a CBM destes, entre 0,38 - 1,62 e 0,67 - 2,6 mg/ml, respectivamente. Da mesma forma, para o *E. faecalis* foram alcançados os valores de CIM entre 0,76 e 2,73 mg/ml para a própolis nova e 1,34 e 2,72 mg/ml para a própolis velha, bem como valores de CBM de 1,5 a 3,07 e 2,68 a 3,11 mg/ml, respectivamente, nas amostras 1V, 2N, 5V e 5N não se verificou CBM para as concentrações estudadas. Os micro-organismos gram-negativos não foram sensíveis ao própolis. Conclui-se que a própolis nova apresentou melhor ação antimicrobiana, principalmente contra *S. aureus* e *M. luteus*. No entanto, os dados também mostram que os valores de CIM e CBM foram bem próximos entre as diferentes própolis, fato que não evidencia razões para que a própolis velha seja descartada.

Palavras-Chaves: Antimicrobiano; Atividade Antimicrobiana; Maturação em colmeia; Própolis.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROPOLIS EXTRACTS IN DIFFERENT MATURATION

The discovery and synthesis of antimicrobial comprise an element of paramount importance to health, however some of these substances have become obsolete due to the emergence of resistant microorganisms conventional therapy. Within the forms of treatment, natural products are an inexhaustible source of substances, including propolis, which is known worldwide due to its antimicrobial activity. The objective of this study was the microbiological analysis of six propolis samples collected from regions Prudentópolis - PR , at different times of deposit hive, with up to 40 days of deposit (New Propolis) and another with over 180 days (Propolis old). The antimicrobial activity was observed against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* and *Enterococcus faecalis* through testing microdilution plate with colorimetric assay using resazurin. At the end of the tests gave values ranging from 0.38 to 0.68 mg/ml to MIC new propolis and 0.34 to 1.3 mg/ml for the old to the microorganisms *S. aureus* and *M. luteus* having values close to both of these as well as the CBM between 0.38 to 1.62 and from 0.67 to 2.6 mg/ml, respectively. Similarly, for *E. faecalis* MIC values between 0.76 and 2.73 mg/ml for the new propolis and 2.72 and 1.34 mg/ml of the propolis old were made, and MBC values of 1.50 to 3.07 and 2.68 to 3.11 mg/ml, respectively, for samples 1V, 2N and 5N 5V CBM not observed for the concentrations studied. Gram- negative microorganisms were not sensitive to propolis. We conclude that the new propolis showed better antimicrobial activity, especially against *S. aureus* and *M. luteus*. However, the data also show that the values of MIC and MBC were very close between the different propolis, which was not evident reasons why the old propolis is discarded.

Key Words: Antimicrobial, Antimicrobial Activity; Maturation honeycomb; Propolis .

## LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS e SIMBOLOS

<b>AMH</b>	Agar Mueller-Hinton
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>Al</b>	Alumínio
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>CAPE</b>	Ácido fenil éster caféico, do inglês <i>Caffeic Acid Phenethyl Ester</i>
<b>CMH</b>	Caldo Mueller-Hinton
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>Cr</b>	Cromo
<b>CRONAT</b>	Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais
<b>Cu</b>	Cobre
<b>DEQ</b>	Departamento de Química
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b><i>E. faecalis</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>EEP</b>	Extrato Etanólico de Própolis
<b>EEPN1</b>	Extrato etanólico de própolis com até 40 dias de maturação, do apicultor 01
<b>EEPN2</b>	Extrato etanólico de própolis com até 40 dias de maturação, do apicultor 02
<b>EEPN3</b>	Extrato etanólico de própolis com até 40 dias de maturação, do apicultor 03
<b>EEPN4</b>	Extrato etanólico de própolis com até 40 dias de maturação, do apicultor 04
<b>EEPN5</b>	Extrato etanólico de própolis com até 40 dias de maturação, do apicultor 05

<b>EEP6</b>	Extrato etanólico de própolis com até 40 dias de maturação, do apicultor 06
<b>EEP1</b>	Extrato etanólico de própolis com mais de 180 dias de maturação, do apicultor 01
<b>EEP2</b>	Extrato etanólico de própolis com mais de 180 dias de maturação, do apicultor 02
<b>EEP3</b>	Extrato etanólico de própolis com mais de 180 dias de maturação, do apicultor 03
<b>EEP4</b>	Extrato etanólico de própolis com mais de 180 dias de maturação, do apicultor 04
<b>EEP5</b>	Extrato etanólico de própolis com mais de 180 dias de maturação, do apicultor 05
<b>EEP6</b>	Extrato etanólico de própolis com mais de 180 dias de maturação do apicultor 06
<b>Fe</b>	Ferro
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>INCQS/FIOCRUZ</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz
<b>Mn</b>	Manganês
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>Mg/ml</b>	Miligrama/mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>NCCLS</b>	<i>National Commitee for Laboratory Standards</i>
<b>ND</b>	Não Detectado
<b>Ni</b>	Níquel
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<b>Si</b>	Silício
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UFPA</b>	Universidade Federal do Pará
<b>UNICENTRO</b>	Universidade Estadual do Centro-Oeste/PR
<b>URSS</b>	União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
<b>V</b>	Vanádio
<b>Zn</b>	Zinco

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01** Abelha *Apis mellífera*, fora da colmeia, fazendo a polinização das flores e coletando o néctar de uma flor, para produção de mel e própolis. 23
- Figura 02** Própolis bruta, sendo mostrada como é encontrada na colmeia artificial e como é feita sua coleta. 24
- Figura 03** Própolis bruta, coletadas de colmeias de várias regiões brasileiras, apresentando tonalidades diferentes, sendo produzidas pela *Apis mellífera* a partir de diferentes tipos de espécies vegetais. 25
- Figura 04** Estruturas dos compostos fenólicos Pinocembrina, Galangina e Apigenina, todos são derivados de flavonoides e podem ser encontrados na própolis. 27
- Figura 05** Estrutura dos compostos fenólicos ácido p-cumárico, ácido cafeico, Artepillina C e o CAPE, todos sendo derivados do ácido cinâmico, e podem ser encontrados na própolis. 28
- Figura 06** Mapa do estado do Paraná, localizado ao sul do Brasil, com a região de Prudentópolis, localizada no sudeste do estado, e os locais de coleta da própolis. No mapa superior encontram-se as localizações dos apiários de onde foram coletadas as amostras analisadas. 39
- Figura 07** Exemplificação de como ficou arranjada a microplaca, depois de finalizado todo o processo da diluição seriada e preparo dos controles positivo e negativo. 43
- Figura 08** Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis. 44
- Figura 09** Esquematisação da metodologia usada para a determinação da CIM. 45

- Figura 10** Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *S. aureus*. Os valores estão expressos em mg/ml 47
- Figura 11** Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia superior a 180 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *S. aureus*. Os valores estão expressos em mg/ml. 48
- Figura 12** Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, frente a *S. aureus*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C. 49
- Figura 13** Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia superior à 180 dias, frente a *S. aureus*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C. 50
- Figura 14** Resultado do teste de controle realizado para amostra de *S. aureus*, com o controle positivo usando cloranfenicol e controle negativo DMSO 50
- Figura 15** Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *E. faecalis*. Os valores estão expressos em mg/ml. 51
- Figura 16** Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia superior a 180 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *E. faecalis*. Os valores estão expressos em mg/ml. 52

- Figura 17** Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, frente a *E. faecalis*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C. 53
- Figura 18** Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia superior à 180 dias, frente a *E. faecalis*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C. 53
- Figura 19** Resultado do teste de controle realizado para amostra de *E. faecalis*, com o controle positivo usando cloranfenicol e controle negativo DMSO. 54
- Figura 20** Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *M. luteus*. Os valores estão expressos em mg/ml. 55
- Figura 21** Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia superior a 180 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *M. luteus*. Os valores estão expressos em mg/ml. 56
- Figura 22** Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, frente a *M. luteus*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C. 57
- Figura 23** Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia superior à 180 dias, frente a *M. luteus*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C. 57

- Figura 24** Resultado do teste de controle realizado para amostra de *E. faecalis*, com o controle positivo usando cloranfenicol e controle negativo DMSO. 58
- Figura 25** Amostra dos resultados de microdiluição com coloração de resazurina, dos extratos EEPN1, EEPV1, EEPN2 e EEPV2 frente a *P. aeruginosa* e *E. coli*, os valores estão expressos em mg/ml. 59

## LISTA DE QUADRO

- Quadro 01** Amostras enviadas pelo CRONAT da UNICENTRO, de 06 apiários localizados na cidade de Prudentópolis/PR, com tempo de depósito na colmeia diferente, a própolis tipo V, têm mais de 180 dias de depósito na colmeia, e a própolis tipo N com menos de 40 dias, sendo recebida uma amostra de cada tipo, perfazendo um total de 12 amostras. 40

## LISTA DE TABELA

- Tabela 01** Resultados encontrados de CIM e CBM, para os micro-organismos testados. 59

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	21
<b>2.1. Produtos Naturais</b> .....	21
2.1.1. PRÓPOLIS.....	22
2.1.2. CONSTITUIÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS.....	24
2.1.3. ATIVIDADE TERAPÊUTICA.....	28
<b>2.2. Micro-organismos</b> .....	31
2.2.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	31
2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
2.2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	33
2.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
2.2.5. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	35
2.2.6. <i>Micrococcus luteus</i> .....	36
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	38
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivo Específico.....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
4.1. Obtenção e preparo da própolis.....	39
4.2. Diluição dos extratos para pesquisa do potencial antimicrobiano da própolis.....	40
4.3. Avaliação do potencial antimicrobiano da própolis.....	41
4.3.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS TESTADAS.....	41
4.3.2. PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA.....	42
4.3.3. PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS.....	42

4.3.4. TESTE DE MICRODILUIÇÃO.....	42
4.3.4.1. Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	43
4.3.4.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	45
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1. Resultados.....</b>	<b>47</b>
5.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
5.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	51
5.1.3. <i>Micrococcus luteus</i> .....	54
5.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	58
<b>5.2. Discussão.....</b>	<b>60</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização em terapias constituem um progresso inquestionável na evolução da medicina do século XX. No entanto, a eficácia dos agentes antimicrobianos foi rapidamente superada pela capacidade desenvolvida pelas bactérias de sobrepujar à sua ação. Estas podem adquirir resistência modificando o seu genoma por mutação ou incorporando genes provenientes de outros micro-organismos por diferentes sistemas de transferência genética, dificultando, assim, o tratamento de doenças com as terapêuticas convencionais (DAZA PÉRES, 1998; INSA, 2011).

Apesar das bactérias possuírem a capacidade de resistir às drogas comumente utilizadas, graças às descobertas de classes farmacologicamente ativas e de modificações feitas nestas moléculas, a medicina sempre esteve um passo à frente. Entretanto, com o passar dos anos e a escassez de antimicrobianos inovadores, a resistência microbiana ganhou força, sendo impulsionada principalmente pelo uso indiscriminado dessas substâncias, sendo então, o uso racional desta classe de medicamento é essencial para que esta situação não se agrave (DUARTE, 2006; CARELLI et al 2011).

Com este crescente aumento da resistência, a descoberta de substâncias com atividade antimicrobiana utilizando fontes naturais, tornou-se imprescindível no combate aos micro-organismos patogênicos (DI BIASE, 2008; SILVA, 2010). No Brasil, conhecido mundialmente pela sua biodiversidade, os produtos naturais são importantes e extensamente utilizados pela população, de acordo com o conhecimento adquirido através dos imigrantes e dos povos indígenas, para várias patologias, incluindo infecções bacterianas (DUARTE, 2006; CARELLI et al 2011). No entanto, são necessárias pesquisas científicas para a comprovação dos efeitos farmacológicos e identificação de moléculas com as ações, que possam ser utilizadas na preparação e desenvolvimento de novos fármacos (BARREIRO, 1990; CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Desta forma, atualmente, uma das alternativas de pesquisa para o tratamento de diversas infecções tem sido a busca por produtos naturais com ação antimicrobiana (CARELLI et al 2011). Dentre estas fontes, encontra-se a própolis, utilizada há séculos pela humanidade para cura e tratamento de enfermidades, entretanto o primeiro relato científico só foi realizado no início do século XIX (PEREIRA et al 2002). A própolis é conhecida mundialmente por apresentar várias atividades biológicas, tais como, atividade antioxidante (MOHAMMADZADEH et al 2007; KALOGEROPOULOS et al 2009; SULAIMAN et al 2011), atividade antitumoral (BURDOCK 1998; SFORCIN 2007), modulação da resposta imune (CUESTA et al 2005; SFORCIN 2007), atividade antifúngica (QUINTERO-MORA et al 2008), atividade antimicrobiana (PEREIRA et al 2002; KUMAZAWA et al 2004; SOUZA et al 2007) entre outras.

Devido à importância da atividade apícola no Brasil, neste trabalho foi proposto à verificação da atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis da abelha *Apis mellifera* obtidos de colmeias da mesma região, mas com diferentes tempos de maturação. Para isso, foi pesquisada a atividade antimicrobiana, em duas amostras distintas de própolis de uma mesma colmeia, uma coletada com o período de depósito na colmeia de pelo menos 180 dias e outra de até 40 dias, desta primeira coleta. Isto se faz necessário, devido à enorme divulgação que a própolis conseguiu no âmbito acadêmico nos últimos anos, sendo imprescindível uma análise aprofundada sobre as suas várias etapas de produção e melhor época de coleta da própolis relacionando as diferentes atividades farmacológicas associadas a esse produto. Esta própolis com um maior tempo depositada na colmeia, em geral é descartada pelos apicultores, por apresentar uma aparência mais escura e ressecada, sendo esteticamente não comercializável.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Produtos Naturais

A utilização de produtos naturais, para fins diversos é tão antiga quanto à própria humanidade e está presente em todas as civilizações e culturas até então existentes. Nesse sentido, os povos primitivos buscavam maneiras para aliviar o sofrimento humano provocado por doenças ou acidentes, ou de uma maneira intuitiva ou através da observação dos animais (SILVA, 2003).

A cada dia, surgem novos adeptos e consumidores de produtos naturais, principalmente entre aqueles desiludidos com os elevados custos e frequentes efeitos indesejáveis das drogas convencionais (BUCHAUL, 2001; DUARTE, 2006). Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, ainda existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso destes produtos, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR et al 2005).

O conhecimento sobre o uso destas fontes naturais é baseado na sua utilização nos rituais de cura médicos-religiosos, cuja informação é disseminada dentro das comunidades e através de gerações (ELISABETSKY, 2003). Os resultados positivos da etnofarmacologia despertou o interesse de muitos pesquisadores, que voltaram suas pesquisas para essa área, em busca de produtos de origem natural que apresentem diversas atividades farmacológicas (BARREIRO, 1990; DUARTE, 2006).

Ao contrário do que se imaginava, existe uma grande variedade de fontes de produtos naturais, não só as plantas medicinais e seus metabólitos secundários que são bastante conhecidos e estudados, mas também os produtos de animais e micro-organismos, tais como antibióticos naturais, como a penicilina e cefalosporina, e mais recentemente a mevinolina (lovastatina) um agente redutor de colesterol,

produzido por organismos marinhos, cujas principais atividades são a antiviral e antitumoral. Além disso, produtos animais como a própolis, produzido pelas abelhas, apresentam atividades farmacológicas e terapêuticas já comprovadas (MARCUCCI 1995; PINTO et al 2002).

### 2.1.1. PRÓPOLIS

A própolis é uma mistura complexa de material resinoso e balsâmico, que é coletado de exsudados de árvores, flores, ramos, pólen e outras partes do tecido vegetal, que estejam próximos do local onde está situada a colmeia, que é misturado e processado com secreções salivares (MARCUCCI, 1995; SOUZA et al 2007).

A própolis é conhecida há muito tempo, tendo o seu uso relatado pelos gregos, romanos, egípcios, incas e outras nações da antiguidade (PEREIRA et al 2002; MARCUCCI, 1996). Os egípcios a utilizavam como um dos constituintes do material usado para embalsamar os mortos, e Hipócrates, na Grécia antiga, a adotou como um cicatrizante interno e externo e Plínio, em Roma, a descreveu como um medicamento com capacidade de reduzir inchaço e aliviar dores (PEREIRA et al 2002; MARCUCCI, 1996). No final do século XIX, foi utilizada na África do Sul como cicatrizante durante uma guerra local e na antiga URSS (União das Repúblicas Socialistas Soviéticas) no combate à tuberculose, e outras aplicações (PEREIRA et al 2002).

No Brasil, atualmente, existem várias espécies de abelhas, tais como as nativas, conhecidas como Meliponídeos, e as abelhas da espécie *Apis mellifera*, que foram trazidas dos continentes Europeu e Africano, sendo que a diferença marcante entre elas é a ausência de ferrão nas abelhas nativas, pois este se encontra atrofiado (FINGER, 2009; RODRIGUESA et al 2004). No entanto, com decorrer dos anos surgiram subespécies híbridas das abelhas europeias e africanas que povoaram e se difundiram no território nacional, adaptando-se a sobreviver nas diferentes condições ambientais brasileiras. Como por exemplo, na região sul, onde são encontradas abelhas com característica predominantes das europeias, e na região norte com características africanas (BURIOL, 2008; FINGER, 2009).

Devido à facilidade de adaptação e sobrevivência da *Apis mellífera* (Figura 01), a mesma é mais comumente utilizada pelos criadores. As abelhas, de qualquer gênero, são muito importantes para o meio ambiente, sendo uma das principais polinizadoras, ajudando assim na manutenção da flora e disseminação das espécies, além de serem produtoras de mel, geleia real e própolis, produtos de grande valor medicinal (BURIOL, 2008; FINGER, 2009).



Figura 01 – Abelha *Apis mellifera*, fora da colmeia, fazendo a polinização das flores e coletando o néctar de uma flor, para produção de mel e própolis. Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Bees-wings.web.jpg>

Própolis é uma palavra derivada do grego *pro*, em defesa de, e *polis*, a cidade, dando significado ao seu uso pelas abelhas, sendo empregado na defesa da colmeia, com o intuito de protegê-la de invasores e também para reparar possíveis frestas e/ou danos que existam, a fim de evitar uma invasão por predadores (Figura 02; GRANGE & DAVEY, 1990; MARCUCCI, 1996; SILVA et al 2006). Além disso, é usada também para embalsamar estes invasores que por ventura morreram dentro da colmeia, evitando assim sua decomposição, sendo que já foram achados pequenos insetos mortos envoltos pela própolis, em perfeito estado de conservação, dentro de colmeias (MARCUCI, 1996; DAUGSCH, 2007). Também é usada como uma forma de manter a temperatura interna satisfatória para as abelhas (SALATINO et al 2005)



Figura 02 – Própolis bruta, sendo mostrada como é encontrada em uma colmeia artificial e como é feita a sua coleta. Fonte: <http://www.apiculturaboavista.com.br>

### 2.1.2. CONSTITUIÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS

Apesar da eficiência comprovada da própolis, existem dificuldades para trabalhar com esse composto, devido a sua alta variabilidade de produção e composição (BANKOVA, 2005a; MARCUCCI, 1996; PEPREIRA et al 2002). Muitos fatores interferem promovendo uma composição físico-química incerta, como por exemplo, a fonte vegetal utilizada na preparação, condições sazonais, região onde está sendo coletada, época da colheita, espécie da abelha produtora, variabilidade genética da abelha rainha, e até mesmo a técnica empregada para a extração da própolis da colmeia e o preparo do extrato são considerados como fatores que influenciam na composição final (PERREIRA et al 2002; ABREU, 2008).

Assim como a composição, a aparência é variável, mostrando uma coloração que pode ser marrom escura, passando por tonalidades esverdeadas e podendo chegar ao marrom avermelhado (Figura 03), dependendo de quais fontes vegetais foram usadas na sua produção (MARCUCI, 1996; KUMAZAWA et al 2004; SILVA, 2006). Entretanto, ao contrário do que muitos pesquisadores supunham, em uma mesma área, a própolis não apresenta uma variação sazonal qualitativa de seus constituintes majoritários, apenas sendo evidenciada uma variação quantitativa da

presença destes compostos, devido à metabolização destes pelas plantas, relacionado com as estações do ano, tendo o verão como a estação onde se obtém a maior quantidade de própolis e o inverno com o efeito oposto (SFORCIN, 2009; VALENCIA et al 2012).



Figura 03 – Própolis bruta, coletadas de colmeias de várias regiões brasileiras, apresentando tonalidades diferentes, sendo produzidas pela *Apis mellifera* a partir de diferentes tipos de espécies vegetais. Fonte: <http://www.apinep.com.br/textopropolisbruto.htm>

A Própolis das zonas temperadas, em relação à brasileira, apresenta uma menor variação dos seus constituintes, devido a menor diversidade de fontes vegetais, sendo o gênero *Populus* sp. considerado o principal local de coleta das abelhas nessa área. No Brasil, devido a sua flora abundante, diferentes localidades produzem diversos tipos de própolis (BURDOCK, 1998; UZEL et al 2005; BANKOVA, 2005; MARCUCCI, 1995). Em 2000, Park e colaboradores obtiveram 500 amostras de diversas regiões brasileiras e conseguiram identificar 12 tipos diferentes de própolis, através das caracterizações físico-químicas destes produtos, e em seguida foram relacionadas às atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória a cada um destes tipos. Mais recentemente, em 2005, foi descoberto o

13º tipo de própolis brasileira, a própolis vermelha (ALENCAR et al 2007; PINTO et al 2011).

Apesar dos diversos biomas existentes no Brasil e das diversas fontes de coletas utilizadas pelas abelhas, alguns vegetais são identificados frequentemente como prováveis colaboradores da composição da própolis, tais como o alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), assa-peixe (*Vernonia polyanthes*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e eucalipto (*Eucalyptus sp*) (BANKOVA, 2005b; PARK et al 2000, PARK et al 2001; SIMÕES et al 2004). No entanto, constatou-se a existência de tipos únicos de própolis, como a própolis verde, cuja principal fonte de coleta para a produção é o alecrim, e o Cipó Rabo de Bugio (*Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub.), que é constituinte essencial na produção da própolis vermelha (PARK et al 2000; ALENCAR et al 2007; ABREU, 2008; PINTO et al 2011).

A constituição da própolis é variável, podendo ter constituintes solúveis como ceras, resinas e balsamos encontrados em maior quantidade, entre 85-90% do total, há também a presença de materiais insolúveis, por exemplo, matéria orgânica, tecido vegetal e grãos de pólen (MARCUCCI, 1995; SILVA, 2006). Mais de 300 compostos já foram identificados, em diferentes amostras de própolis, como por exemplo, vitaminas (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, E), minerais (Mn, Cu, Ca, Al, Si, Fe, V, Ni, Zn e Cr) e os metabólitos secundários, extraídos dos vegetais visitados pelas abelhas, e a estes são atribuídos às atividades biológicas (GRANGE & DAVEY, 1990; MARCUCCI, 1995; PEREIRA et al 2002; KUMAZAWA et al 2004).

Dentre as várias classes de substâncias encontradas se destacam os aminoácidos, ácidos aromáticos e seus derivados, flavonóides, terpenóides, aldeídos, cetonas e açúcares (MARCUCCI, 1995). Sendo que esses grupos são os que mais agregam valor à própolis e a maioria dos estudos os associa diretamente às atividades biológicas da própolis (BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1995; PEREIRA et al 2002). Nesse sentido, dentre a classe dos compostos fenólicos, destacam-se os flavonóides, os quais já foram isolados e identificados várias substâncias pertencentes a este grupo em amostras de própolis e suas atividades farmacológicas comprovadas, tais como a bacarina e drupanina que apresenta elevada atividade antitumoral (KIMOTO, 2001; SOUZA, 2007), a acacetina, ácido

salicílico e apigenina com excelente atividade anti-inflamatória (MARCUCCI, 1996; MENEZES 2005), pinocembrina e galangina com atividade antimicrobiana (MARCUCCI, 1996) e outros compostos fenólicos mostrando atividade antioxidante (Figura 04; VALENCIA et al 2010).

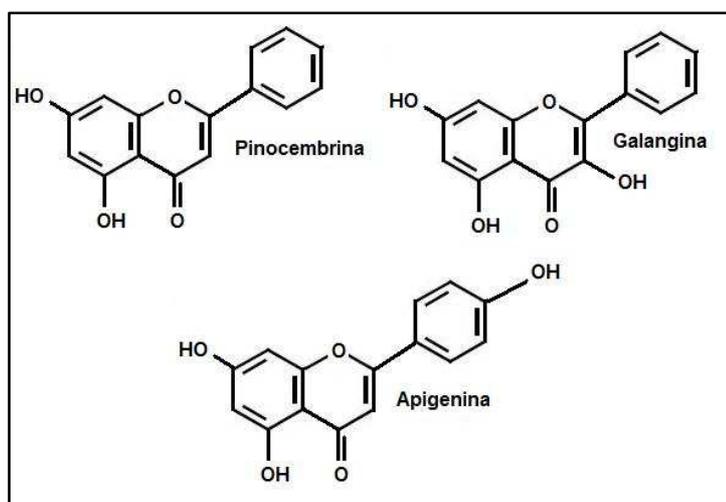


Figura 04 – Estruturas dos compostos fenólicos Pinocembrina, Galangina e Apigenina, todos são derivados de flavonoides e podem ser encontrados na própolis. Fonte: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>

Por outro lado, relatou-se que na própolis brasileira há um maior predomínio dos ácidos fenólicos em relação aos flavonóides, encontrando comumente derivados do ácido cinâmico (BANKOVA, 2005a; POPOVA et al 2005; SFORCIN, 2007). Além dos compostos citados anteriormente, existem ainda o ácido fenil éster caféico (*caffeic acid phenethyl ester* - CAPE) e a Artepillina C, os quais são atribuídos atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-viral e imunomoduladora (CAETANO, 2010; KIMOTO, 2001; MENEZES, 2005; SFORCIN, 2009; SOUZA; 2007), sendo também relacionada a Artepillina C a atividade antitumoral (Figura 05; KIMOTO, 2001; SOUZA; 2007).

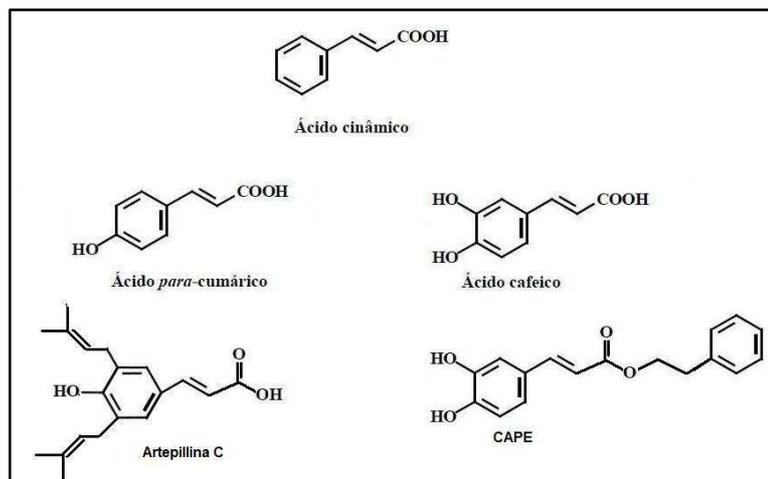


Figura 05 – Estrutura dos compostos fenólicos ácido p-cumárico, ácido cafeico, Artepillina C e o CAPE, todos sendo derivados do ácido cinâmico, e podem ser encontrados na própolis. Fonte: Caetano, 2010; Funari, 2005 (com adaptações).

### 2.1.3. ATIVIDADE TERAPÊUTICA

Alguns pesquisadores afirmam que a ação da própolis é mais eficiente graças à complexa mistura daquelas substâncias encontradas na sua constituição, sendo diminuída ou anulada quando são feitos fracionamentos ou isolamento de substâncias específicas (MARCUCCI, 1996; LUSTOSA et al 2008; SFORCIN, 2009). Embora sejam feitas muitas suposições sobre os mecanismos de ação da própolis, já que não são inteiramente conhecidos, diversas atividades biológicas já foram verificadas, como as atividades antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (LUSTOSA et al 2008).

Dentre as ações farmacológicas da própolis, a atividade antimicrobiana é uma das mais estudadas, sendo que essa é uma das funções inerentes desse produto, visto que a própolis é usada para evitar a invasão da colmeia, e que possíveis invasores já mortos entrem em estado de putrefação dentro desta (MARCUCCI, 1996; MENEZES 2005; LUSTOSA et al 2008; SFORCIN, 2009).

Entretanto, já foi relatado ação da própolis no combate aos protozoários, tais como *Trypanosoma* sp. e *Leishmania* sp., tanto com ações diretas contra os

parasitos quanto amenizando e melhorando sinais e sintomas causados por eles (CUNHA et al 2011; ODA et al 2011). Também já foi relatada ação contra *Giardia lamblia*, diminuindo sua motilidade, aderência e crescimento (SFORCIN, 2009), além de demonstrar efeito contra *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas* spp. e *Trichomonas vaginalis* (MARCUCCI, 1996; LUSTOSA et al 2008).

Outro grupo que apresenta sensibilidade à própolis são os fungos como *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (STEPANOVIC et al 2003; OLIVEIRA et al 2006; FERNANDES JR et al 2006; QUINTERO-MORA et al 2008). Fungos filamentosos como o *Aspergillus sulphureus*, encontrado constantemente em grãos de café, também sofrem ação da própolis, inibindo a produção da Ocratoxina A, micotoxina que apresenta efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos (BATISTA et al 2000; BURDOCK, 1998).

Embora os estudos com outros grupos sejam de grande relevância, a maioria dos relatos envolve ação antibacteriana da própolis (LUSTOSA et al 2008; MENEZES, 2005; MARCUCCI, 1996). Muitas bactérias mostram alguma sensibilidade contra a própolis, sendo que as gram-positivas mais citadas são *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilise*, *S. mutans*, e gram-negativas, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. vulgaris* (LIBÉRIO et al 2009; MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005; VARGAS et al 2004). Apesar da própolis apresentar atividade antimicrobiana mais pronunciada frente às bactérias Gram-positivas, o mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas alguns autores atribuem as diferentes constituições de parede celular entre os grupos, nos quais as bactérias Gram-negativas apresentam a parede celular mais complexa e com maior teor de lipídios (LUSTOSA et al 2008; VARGAS et al 2004).

Nesse sentido, alguns compostos fenólicos, em especial a pinocembrina, galangina e o CAPE, apresentam ação antimicrobiana, cujo mecanismo se baseia na inibição do RNA-polimerase bacteriano. No entanto flavonóides, ácido caféico, ácido benzoico e ácido cinâmico podem causar danos funcionais e estruturais na membrana ou parede celular (LUSTOSA et al 2008; SCAZZOCHIO et al 2006).

Entretanto, por mais terapêutica que a própolis possa parecer, ainda existe a ocorrência de efeitos adversos causados pelo seu uso, como por exemplo, o desenvolvimento de alergia, ocorrendo principalmente através de dermatites de

contato, acometendo sobretudo os apicultores que mantêm contato direto e constante com o produto, assim como músicos que utilizam em seus instrumentos vernizes, os quais podem conter própolis em sua composição, bem como pessoas com hipersensibilidade a alguma substância contida no própolis (DAUGSCH, 2007). O Farnesol é uma das substâncias presente na própolis apontado, por estudos, como causador destas alergias, sendo obrigatória, na Europa, a identificação da presença deste em formulações, através do rotulo do produto (SCHNUCH et al 2004; DAUGSCH, 2007). Assim como os ésteres do ácido caféico e o flavonoide tectocrisina, que também já foram identificados como alérgenos (MARCUCCI, 1995; ADELMANN, 2008)

Além da presença destas alergias desenvolvidas através do contato com a própolis, há a possibilidade de uma reação tóxica da própolis no indivíduo que a utilizar. Entretanto, Reis e cols. (2000), através de estudo usando ratos, constataram a ausência de alterações, em parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos, comparando os resultados obtidos com um grupo controle durante 30 dias.

Devido à inexistência de uma técnica padrão para a extração da própolis, como por exemplo, o uso de vários tipos de solventes como o etanol, acetona, éter e água, existem informações bem divergentes quando se fala de toxicidade, como por exemplo, uma  $DL_{50}$  variando de 2050 mg/Kg até 7340 mg/Kg quando administrado por via oral (BURDOCK, 1998). Além disso, foi verificado em várias pesquisas, que animais tratados com doses de própolis alternando entre 1875 mg/Kg/dia e 4600 mg/Kg/dia com duração de duas semanas até 90 dias, não mostraram mudanças em fatores clínicos, comportamentais e de mortalidade quando comparados aos seus respectivos controles (ADELMANN, 2008; BURDOCK, 1998).

## 2.2. Micro-organismos

### 2.2.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A partir do nascimento, o ser humano é colonizado por micro-organismos em pele e mucosas, primeiramente através do contato com a mãe e em seguida pelo contato com outras pessoas, objetos inanimados e através da ingestão de alimentos (SORIA & CARRACOSA 2007; FREITAS, 2009). A presença destes micro-organismos determina a microbiota normal do indivíduo, que é dependente de fatores ambientais como umidade, temperatura e exposição solar, assim como fatores individuais como idade, sexo, higiene, estado do sistema imune e o uso de antimicrobianos, favorecendo assim a colonização das espécies que se adaptarem a cada local (SORIA & CARRACOSA 2007).

Essa colonização é extremamente benéfica para o hospedeiro, pois os micro-organismos da microbiota estimulam continuamente o sistema imune do indivíduo, estimulando a produção de Imunoglobulina A (IgA) e ativação de linfócitos T, que são importantes mecanismos de defesa em mucosas. Além disso, a microbiota também protege os tecidos de possíveis colonizações de micro-organismos patogênicos, competindo pelos nutrientes existentes e sintetizando metabólitos que inibem o crescimento de outros micro-organismos (SORIA & CARRACOSA 2007).

No entanto, qualquer modificação na microbiota implica em perturbações nesta população, e conseqüentemente no aparecimento de doenças, que pode ser causada pela própria microbiota ou por patógenos oportunistas. As alterações na microbiota podem ser causadas por diversos fatores, tais como o uso irracional de antimicrobianos, lesões na pele e mucosas, queimaduras, desnutrição e o sistema imune comprometido (SOUZA & SCARCELLI, 2000; ARAUJO et al 2004; SORIA & CARRACOSA 2007). Nesse sentido, vários micro-organismos podem ocasionar doenças aos seres humanos, entre as bactérias podem ser citadas a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Micrococcus luteus* (SOARES, 2005; PARADELLA et al 2007; SILVA et al 2007).

### 2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, aeróbio estrito, não fermentador e móvel (VASCONCELOS & CALAZANS, 2006; FERRARA, 2006). É uma das bactérias mais versáteis, visto que são capazes de sobreviver em diversos ambientes como o solo, água e plantas, e outros lugares úmidos (SOARES, 2005; VASCONCELOS & CALAZANS, 2006). Não faz parte da microbiota normal do ser humano, mas pode ser encontrada frequentemente em pacientes internados em hospitais, colonizando o trato gastrointestinal, axilas, mucosa nasal, orofaringe e períneo, com isso são consideradas uma das principais bactérias associadas às infecções hospitalares, acometendo principalmente pacientes imunossuprimidos (SOARES, 2005).

As infecções causadas pela *P. aeruginosa*, fora do ambiente hospitalar, tendem a ser superficiais e localizadas, como a foliculite, otite média e infecções oculares. Nos hospitais, uma grande preocupação é o desenvolvimento de pneumonia causada por *P. aeruginosa*, já que esta pode atingir taxa de mortalidade de 50% (SOARES, 2005). Além disso, essa bactéria poder causar infecções no trato urinário, peritonites, bacterímia, endocardite, infecções de feridas e de pós-cirúrgicos (SOARES, 2005; FALAGAS & KOPTERIDES, 2006).

Além da deficiência imunológica dos pacientes, fatores intrínsecos da bactéria também colaboram para a evolução da infecção, tais como a presença de pili e dos flagelos que ajudando na aderência, a produção de alginato, que atuam como biofilme impedindo a fagocitose, a secreção de enzimas como a elastase, que degradam imunoglobulinas, leucocidina, e inibem a ação e neutrófilos e linfócitos, e a exotoxina A, que promove a destruição tecidual e assim inibindo a síntese proteica (SOARES, 2005).

Um dos principais fatores que aumentam as taxas de infecção por *P. aeruginosa*, são os mecanismos de resistências aos antimicrobianos intrínsecos e adquiridos dessa bactéria, como a bomba de efluxo e a mudança na permeabilidade de membrana, que confere resistência aos antimicrobianos dos grupos

aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e quinolonas (SOARES, 2005; FALAGAS & KOPTERIDES, 2006; FERRARA, 2006; FIGUEIREDO et al 2007). Portanto, para que o tratamento seja eficaz, é necessária a pesquisa de novos compostos com atividade antimicrobiana para aumentar o sucesso do tratamento (FERRARA, 2006; VASCONCELOS & CALAZANS, 2006).

### 2.2.3. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E.coli*) é uma bactéria Gram-negativa da família *Enterobacteriaceae*, não formadora de esporos e fermentadores de lactose, sendo predominantemente classificada como um micro-organismo entérico, devido a sua presença marcante na microbiota normal desta região em diversas espécies de animais, entretanto pode ser encontrado em vegetais, água e solo, podendo causar doenças tanto intestinais quanto extra-intestinais, (COELHO, 2010; DE MELO, 2006). Dentre os males causadas pela *E. coli* as mais comuns são as Infecções do trato urinário, doenças diarrêicas, meningite e a sepse (NATARO e KAPER, 1998).

A patogenicidade deste micro-organismo pode ser classificada como multifatorial, girando entorno da classificação dos grupos aos quais pertencem, tendo os fatores de virulência dispostos em 2 grandes grupos, os fatores de colonização, os quais agem de forma direta na adesão da bactéria à mucosa intestinal, interferindo na remoção destas pelo peristaltismo, e a liberação de toxinas, que atuam sobre processos fisiológicos normal da célula hospedeira (DE MELO, 2006; ROBINS-BROWNE & HARTLAND, 2002).

Após a descoberta da existência de vários sorotipos para a *E.coli*, em 1944 Kauffman esquematizou uma classificação sorológica, usada até os dias atuais, com algumas modificações, sendo sorotipada com base nos antígenos somático (O), flagelar (H), capsular (K) e pili (F). Embora a sorotipagem esteja relacionada à fatores de virulência, ela é primeiramente utilizada para a identificação do sorogrupo a qual pertence a *E. coli* (COELHO, 2010; NATARO & KAPER, 1998).

Apartir dessa identificação, foi possível também a classificação entre as patologias causadas pela *E. coli*, como a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora de toxina tipo *Shiga* (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EaagEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) entre outras, com a sua maior incidência a ETEC (COELHO, 2010; NATARO & KAPER, 1998).

#### 2.2.4. *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* faz parte da microbiota normal da pele e mucosas, podendo se tornar patogênico em indivíduos que estejam com o sistema imune comprometido e os que apresentem algum tipo de lesão que comprometa a integridade da barreira cutânea, além de causar intoxicações alimentares (SILVA et al 2007; GELATTI et al 2009). Os estafilococos são bactérias Gram-positivas, cocos esféricos em que se apresentam em forma de “cachos de uva”, são anaeróbios facultativos, mas se multiplicam com mais rapidez na presença de oxigênio, não possuem flagelos e ou fimbrias (OLIVEIRA 2011; SILVA et al 2007).

Os estafilococos possuem vários fatores de virulência, tais como a presença de cápsula em algumas cepas e a produção da proteína A estafilocócica que dificulta a ação fagocítica dos neutrófilos (SILVA et al 2007). Associado a isto, existe a produção de uma série de enzimas, como a coagulase, catalase, desoxirribonuclease, hialuronidase, lipase e betalactamase, e toxinas extracelulares, como leucocidina, que é capaz de destruir leucócitos, a beta hemolisina, que é responsável pela hemólise, e também a esfoliatina, que causa a síndrome da pele escaldada e da enterotoxina responsável pela síndrome do choque tóxico (SILVA et al 2007).

O *S. aureus* é o principal responsável pelas infecções piogênicas de pele e de regiões mais profundas, tais como a foliculite, carbúnculo, impetigo e hordéolo (SILVA et al 2007; GELATTI et al 2009). Em indivíduos com comprometimento imunológico ou que apresentem uma via facilitada de acesso ao micro-organismo,

podem causar infecções mais graves como a endocardite, osteomielite, bacteremia e pneumonia, sendo causadores ocasionais de artrite bacteriana e meningite (SILVA et al 2007; GELATTI et al 2009).

Apesar do *S. aureus* apresentar sensibilidade a inúmeros antimicrobianos usados contra bactérias Gram-positivas, como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol, algumas cepas desenvolveram resistência a esses antimicrobianos, tal como a meticilina e outros beta-lactâmicos, denominado de *S. aureus* resistente à Meticilina (MRSA). Essa cepa é um dos principais problemas em ambientes hospitalares, com isso há necessidade da avaliação da suscetibilidade antes do início do tratamento (SILVA et al 2007; GELATTI et al 2009).

#### 2.2.5. *Enterococcus faecalis*

Enterococos são bactérias em formato de cocos, pertencentes ao grupo dos Gram-positivos, se apresentam aos pares, aeróbios facultativos e não são produtores de catalase (MATOS NETO, 2007). Fazem parte da microbiota residente do trato gastrintestinal e apresentam poucas exigências para sua sobrevivência, sendo capazes de crescer em temperaturas entre 10 a 45°C e resistir a uma temperatura de 60°C por 30 minutos (PARADELLA et al 2007).

O *E. faecalis* é um micro-organismos oportunista, considerado um grande agente causador de infecções nosocomiais, sendo relacionado a infecções do trato urinário, pós-cirúrgicas e causa também bacteremia, infecções endodônticas e endocardites (PARADELLA et al 2007; JAMET et al 2012). Dentre as doenças causadas por esse gênero, a espécie *E. faecalis* é o agente responsável por 75% das infecções (JAMET et al 2012).

A formação de biofilme, a produção de adesinas, citolisinas, hialuronidase, gelatinases e liberação de superóxido extracelular são os principais fatores de virulência intrínsecos ao *E. faecalis*. Alguns desses fatores também são conhecidos

como substância de agregação, que proporciona a adesão da bactéria nos tecidos, facilitando a invasão da bactéria e dificultando a fagocitose por neutrófilos (PARADELLA et al 2007; YAMANAKA, 2011).

Outro aspecto importante dos enterococos é a grande capacidade de resistências intrínsecas ou adquiridas por elementos móveis, como plasmídeos, que inativam e/ou degradam os antimicrobianos por mecanismos enzimáticos e expulsão através do sistema de bomba de efluxo (YAMANAKA, 2011; JAMET et al 2012). A resistência adquirida se tornou um grande problema, já que a troca de material genético entre esses micro-organismos possibilitou que muitas das cepas de *E. faecalis* adquirissem resistência à antimicrobianos que antes eram eficazes, como a vancomicina (PARADELLA et al 2007; YAMANAKA, 2011; JAMET et al 2012).

#### 2.2.6. *Micrococcus luteus*

São bactérias Gram-positivas, pertencente à família *Micrococcaceae*, a mesma à qual pertence o *Staphylococcus aureus*, sendo difícil a diferenciação morfológica já que ambos formam tétrades (KOOKEN et al 2012), habitando principalmente a pele humana, mas podendo ser encontrado na cavidade oral, assim como em água e no solo. Entre o gênero *Micrococcus* o *M. Luteus* é o mais frequente, seguido pelo *M. varians* (KLOOS & MUSSELWHITE, 1975; KOOKEN et al 2012).

Não é normalmente rotulado como um micro-organismo patogênico, geralmente é ignorado em achados clínicos considerado como contaminação, entretanto vem desenvolvendo resistência a uma série de substâncias, sendo adicionado o fato de ser oportunista, podendo causar choque séptico, artrite séptica, endocardite, infecções endodônticas e pneumonia (MAGEE et al 1990; MONODANE et al 1997; BELAVILEACQUA et al 2004).

Desde a descoberta da própolis pelos povos da antiguidade, e seu consequente uso para tratar e curar doenças, foi verificada atividade biológica sobre várias patologias e agentes infecciosos, entretanto a constatação científica dessas

atividades só foi realizada recentemente através dos estudos realizados por todo o mundo (MARCUCCI, 1996; PEREIRA et al 2002). Dentre essas atividades, a atividade antimicrobiana é considerada uma das funções intrínsecas à própolis, sendo verificada em praticamente todas as amostras até hoje analisadas (MARCUCCI, 1996; PARK et al 2000; PERREIRA et al 2002; LUSTOSA et al 2008).

Embora já existam várias atividades farmacológicas atribuídas à própolis, existem variações intrínsecas do composto, como a genética da abelha produtora, e extrínsecas, como as fontes vegetais utilizadas na produção e estação do ano, que influenciam no produto final, e conseqüentemente na finalidade que esta terá, sendo necessários estudos que comprovem para qual função determinada própolis pode ser empregada (PARK et al 2000; ABREU, 2008; SFORCIN, 2009).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de Extratos Etanólico de Própolis (EEP) da abelha *Apis mellifera*, com diferentes períodos de maturação.

#### 3.2. Objetivo Específico

- I. Avaliar a atividade antimicrobiana de 12 amostras de EEP, sendo 6 com tempo de maturação em colmeia de até 40 dias e 6 com este tempo superior a 180 dias.
- II. Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis através de determinação de CIM e CBM.
  - a. Gram-positivas: *S. aureus*, *E. faecalis* e *M. luteus*
  - b. Gram-negativas: *P. aeruginosa* e *E. coli*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção e preparo do extrato de própolis

As amostras de própolis analisadas foram produzidas por abelhas da espécie *Apis mellifera* em apiários localizados em Prudentópolis, localizada na região sudeste do estado do Paraná (Figura 06). Em seguida, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Cromatografia e Produtos Naturais (CRONAT) do Departamento de Química (DEQ) da UNICENTRO para análise e preparação dos extratos etanólicos de Própolis (EEP), conforme descrito por SCHMIDT, 2010.

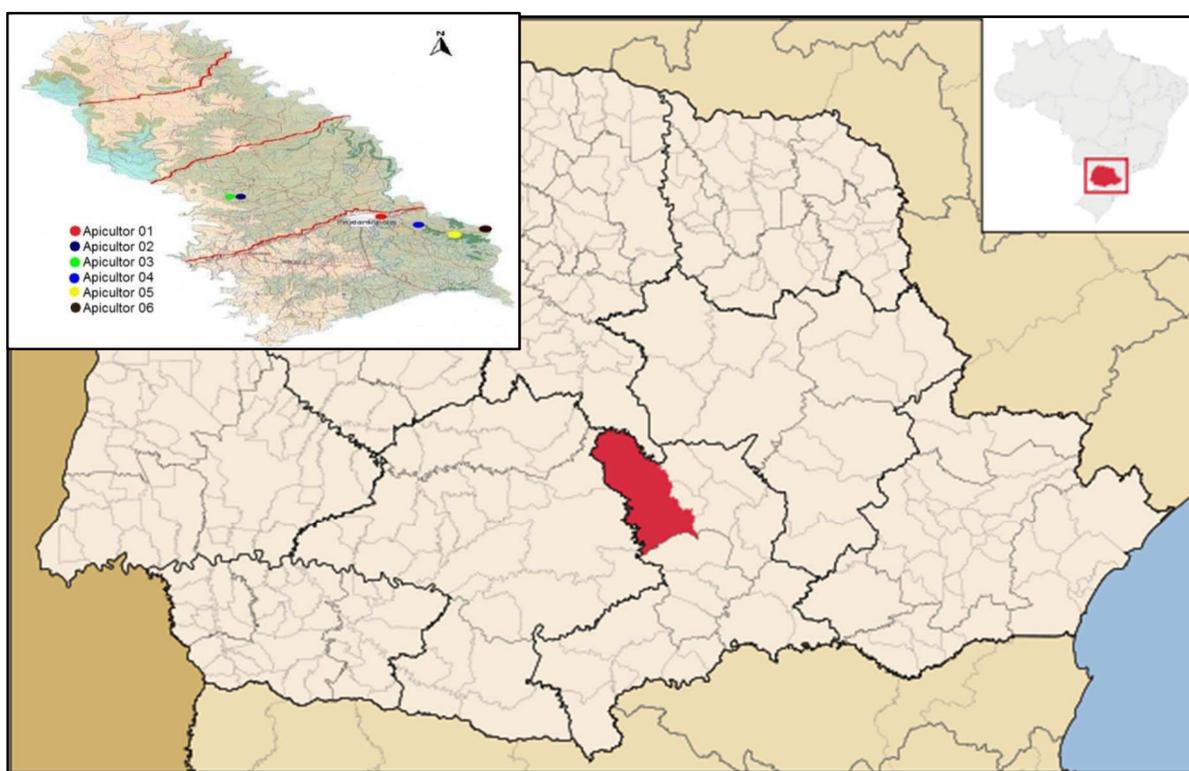


Figura 06 – Mapa do estado do Paraná, localizado ao sul do Brasil, com a região de Prudentópolis, localizada no sudeste do estado, e os locais de coleta da própolis. No mapa superior encontram-se as localizações dos apiários de onde foram coletadas as amostras analisadas. Fonte: SCHMIDT, 2010, modificado.

Para a realização do trabalho, coletaram-se duas amostras de própolis, de cada um dos seis apicultores de localidades distintas de Prudentópolis/PR. A primeira coleta, feita no mês de abril, forneceu a própolis com maior tempo de maturação (Própolis V), com um mínimo de 180 dias de depósito nas colmeias, e a segunda, coletada em maio, até 40 dias de maturação (Própolis N), a contar a partir da primeira coleta, estes tempos de maturação em colmeia são os mesmos utilizados pelos apicultores para classificar a própolis. Após a coleta, foram preparados os extratos de própolis das amostras, utilizando álcool 70% como solvente, e ao final do processo esses extratos foram evaporados, pesados conforme metodologia descrita por SCHMIDT, 2010. Em seguida, foram enviados ao Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFGA para avaliação das atividades biológicas.

	Tempo de maturação na colmeia	
	Mais de 180 dias	Até 40 dias
Amostra 01	EEPV1	EEPN1
Amostra 02	EEPV2	EEPN2
Amostra 03	EEPV3	EEPN3
Amostra 04	EEPV4	EEPN4
Amostra 05	EEPV5	EEPN5
Amostra 06	EEPV6	EEPN6

Quadro 01 – Amostras enviadas pelo CRONAT da UNICENTRO, de 06 apiários localizados na cidade de Prudentópolis/PR, com tempo de depósito na colmeia diferente, a própolis tipo V, têm mais de 180 dias de depósito na colmeia, e a própolis tipo N com menos de 40 dias, sendo recebida uma amostra de cada tipo, perfazendo um total de 12 amostras.

#### **4.2. Diluição dos extratos para pesquisa do potencial antimicrobiano da própolis**

Para a realização dos testes antimicrobianos, inicialmente foram usados os extratos de própolis, sendo diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 75% e homogeneizados em agitador de tubo por 5 minutos. Para a realização dos testes

microbiológicos, foram preparadas diluições, e a partir destas, foram feitas diluições para se chegar às concentrações usadas em cada poço da microplaca. Além disso, cada extrato foi protegido da umidade, luz e do calor, usando-os somente no momento do ensaio, em ambiente estéril.

### **4.3. Avaliação do potencial antimicrobiano da própolis**

#### **4.3.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS TESTADAS**

Para a realização da pesquisa foram utilizadas cepas de referência ATCC (*American Type Culture Collection* - ATCC) dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* ATCC 27175, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 obtidas a partir da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro) que foram mantidas em ágar nutriente, à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Para os ensaios, todas as bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo meio específico de cada bactéria, para certeza de identificação de espécie. *S. aureus* foi semeado em meio ágar manitol; *E. faecalis* e *M. luteus* em ágar sangue; *E. coli* em ágar macconkey e *P. aeruginosa* em o ágar cetrimide. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em estufa para verificação do crescimento, para posterior preparação dos inóculos.

#### **4.3.2. PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA**

Os meios de cultura utilizados foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar cetrimide (HIMEDIA, Índia), ágar nutriente (HIMEDIA, Índia), ágar manitol (HIMEDIA, Índia), ágar

macconkey (HIMEDIA, Índia) e ágar sangue (HIMEDIA, Índia). Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

#### 4.3.3. PREPARO DOS INÓCULOS BACTERIANOS

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas cepas de *S. aureus* (ATCC 6538), *E. faecalis* (ATCC 29212), *M. luteus* (ATCC 27175), *E. coli* ATCC (8739) e *P. aeruginosa* (ATCC 25853). A obtenção dos inóculos seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico” - Norma Aprovada - Nona edição do NCCLS (*National Committee for Laboratory Standards*) de janeiro de 2012. Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas bactérias foram selecionadas e transferidas para tubo estéril contendo 1 ml de meio caldo Mueller-Hinton. Quando necessário, realizou-se ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/ml, sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland. Em seguida, realizou-se a incubação dos tubos, cada um contendo a concentração do inóculo  $1 \times 10^8$  UFC/ml por 1 hora para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo  $1 \times 10^3$  UFC/ml.

#### 4.3.4. TESTE DE MICRODILUIÇÃO

O método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana foi a diluição em caldo, por ser considerado um dos testes mais confiáveis para a determinação da atividade antimicrobiana, quando comparado com as técnicas de difusão em ágar, sendo escolhida o ensaio de microdiluição em placas de 96 poços (ALVES et al 2008). Esse ensaio seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico” - Norma Aprovada - Nona edição do NCCLS (*National Committee for Laboratory Standards*) de janeiro de 2012 e adaptações.

Para os testes antimicrobianos, os extratos foram padronizados com solvente DMSO 7,5%, nas seguintes concentrações: 7,79-0,18 mg/mL. Em seguida, os extratos foram colocados em tubos de plásticos, e 100µL de cada concentração foi adicionada em poços das microplacas juntamente com 100µL de inóculo bacteriano ( $1 \times 10^3$  UFC/mL), obtendo as seguintes concentrações por poço: 10,38-0,09mg/ml. Cada ensaio foi realizado em triplicada para cada concentração de extrato acima descrita e cada bactéria testada. Como controle negativo foi utilizado o DMSO 7,5% (solvente) e para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol contra bactérias gram-positivas (250 µg/mL) e a penicilina-estreptolisina para bactérias gram-negativas (10000UI/10mg). Ao final deste processo a microplaca foi incubada a 35°C por 24 horas (Figura 07).

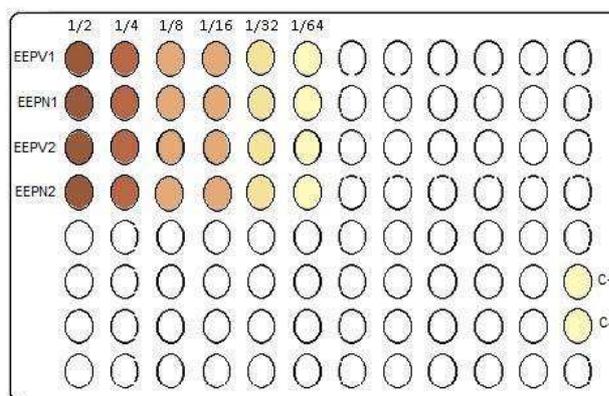


Figura 07 – Exemplificação de como ficou arranjada a microplaca, depois de finalizado todo o processo da diluição seriada e preparo dos controles positivo e negativo. Fonte: Autor.

#### 4.3.4.1. Obtenção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é considerada como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade, sendo esse um parâmetro para avaliar a potência *in vitro* da amostra testada (MENDES, 1997; CLSI, 2012).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi estipulada a partir da menor concentração dos extratos de própolis capaz de impedir o crescimento de pelo menos 50% do micro-organismo avaliado (efeito bacteriostático). Para a obtenção de CIM foi utilizado o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico utilizando a resazurina (MONTEIRO et al 2012). A resazurina é um corante com ótima solubilização em água e apresenta uma coloração azul, utilizado como referência em testes para verificar a viabilidade de células. Na presença destas, sofre uma redução, sendo transformada em resofurina e mostrando uma coloração rosa (Figura 08; MONTEJANO et al 2005; ALVES et al 2008). Sendo assim, o valor da CIM foi definido como a menor concentração encontrada que impediu a mudança de cor, total ou parcial, do meio na microplaca analisada (MALACARNE, 2010; MONTEIRO et al 2012).

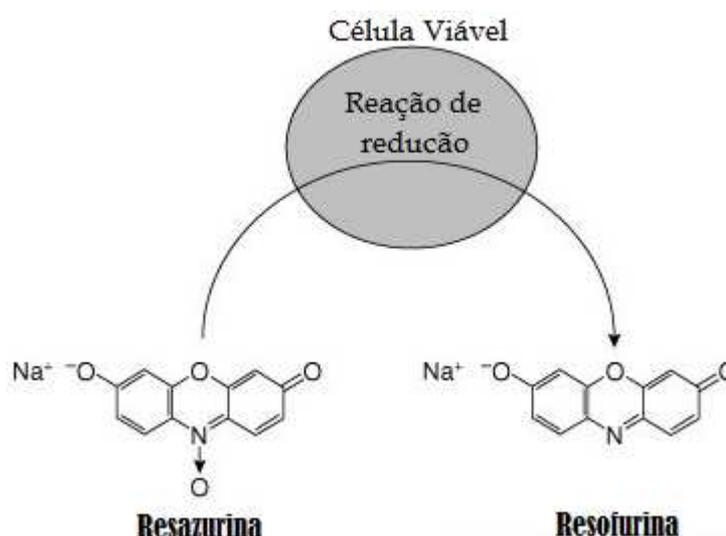


Figura 08: Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis. Fonte: [www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/](http://www.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/) Adaptado.

Para isso, após o término do tempo de incubação anterior, 15µL de resazurina a 0,01% foram acrescentados em cada poço, para identificação da CIM (Figura 09). Um período de 3 horas foi necessário para a reação com a resazurina e então se partiu para a interpretação dos resultados.

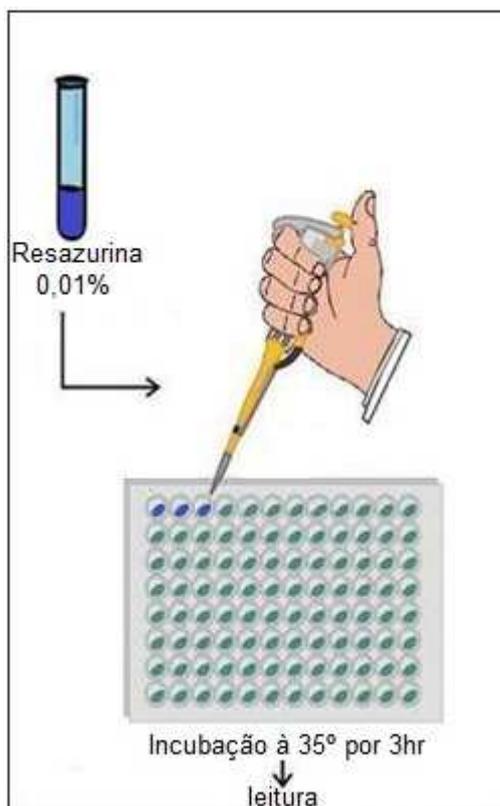


Figura 09: Esquemática da metodologia usada para a determinação da CIM

#### 4.3.4.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração Bactericida Mínima (CBM) é a menor concentração de um agente microbiano capaz de matar 99 a 100% dos micro-organismos testados. A CFM foi obtida a partir da técnica de contagem das UFC, sendo considerada a menor concentração do extrato que resultou em nenhum crescimento ou no crescimento de no máximo três colônias por placas, conforme relatado por Quadros e colaboradores (2011).

Esta metodologia foi realizada após a técnica de microdiluição em microplacas, no qual se obteve o CIM, conforme descrito acima. Para a obtenção do CBM, 10µL de cada poço contendo diferentes inóculos bacterianos e extratos de própolis foram semeados em placas de petri contendo Ágar Miller Hinton (AMH), em seguida incubados por mais 24 horas a 37°C para posterior leitura das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e obtenção da concentração capaz de matar pelo menos 99 a 100% dos micro-organismos. Todos os ensaios foram realizados em

triplicata. Para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol foi utilizado em bactérias gram-positivas na concentração de 250 µg/ml, já para bactérias gram-negativas, penicilina-estreptolisina foi o antibiótico de escolha para controle de positivo, na concentração 10000UI/10mg.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Resultados

#### 5.1.1 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* apresentou sensibilidade a todas as amostras de EEP analisadas. Das 6 amostras de própolis do tipo EEPN a CIM variou entre 0,38 a 0,68 mg/ml (Figura 10). Entre os EEP Novo, as amostras 3 e 6 foram as que apresentaram as melhores atividades antimicrobiana, visto que a CIM foi obtida em uma mesma concentração de 0,38 mg/ml. Para as demais amostras a CIM variou entre 0,40 e 0,39 mg/ml, com exceção da amostra 2, cuja a CIM foi de 0,68 mg/ml.

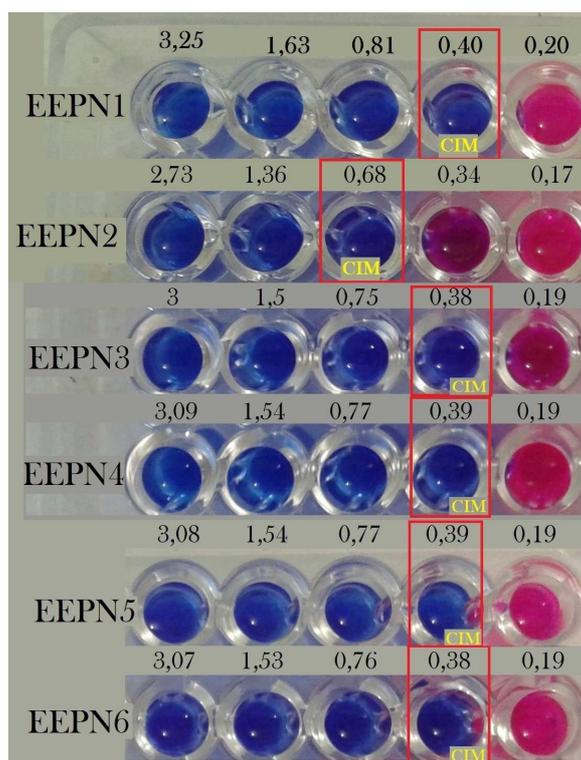


Figura 10 – Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *S. aureus*. Os valores estão expressos em mg/ml.

Para as amostras com um tempo de depósito em colmeia mais prolongado, o *S. aureus* também mostrou sensibilidade, entretanto geralmente em concentrações maiores quando comparadas às EEPN, as quais variaram entre 1,30 à 0,34 mg/ml (Figura 11). Na Figura abaixo, observa-se que as amostras das localidades 3 e 4 apresentaram os melhores resultados, com valores de CIM de 0,34 mg/ml, seguidas pelas amostras 6, 5 e 2, nas quais obtiveram as concentrações de 0,67, 0,69 e 0,78 mg/ml, respectivamente. No entanto, a amostra 1 foi a que apresentou CIM de maior valor com a concentração de 1,30 mg/ml.

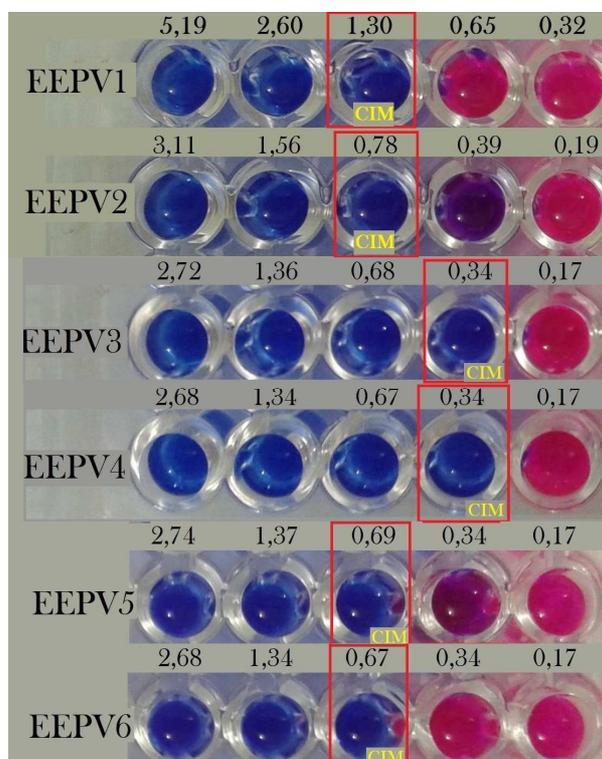


Figura 11 – Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia superior a 180 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *S. aureus*. Os valores estão expressos em mg/ml.

Quando comparadas as amostras de uma mesma área, mas com os tempos de depósito em colmeia diferentes, para o *S. aureus*, os resultados da CIM das EEPN obtiveram resultados quantitativamente melhores em comparação às EEPV. Nas amostras das áreas 1, 2, 5, e 6 os resultados da própolis Nova foi melhor, chegando a ter uma concentração três vezes menor quando comparado à própolis

Velha. Nas amostras das áreas 3 e 4, entretanto, os resultados para as EEPV, com concentração de 0,34 mg/ml, mostrou valores inferiores aos da EEPN, com resultado de 0,38 mg/ml.

Para os valores de CBM, as concentrações para os EEPN variaram de 1,62 até 0,38 mg/ml (Figura 12), cujos melhores resultados foram os encontrados para as amostras 3 e 4 com a CBM de 0,38 mg/ml para ambas. Por outro lado, as outras amostras obtiveram valores maiores de CBM, com concentrações de 0,76, 0,77, 1,36 e 1,62 mg/ml para as amostras 6, 5, 2 e 1, respectivamente.

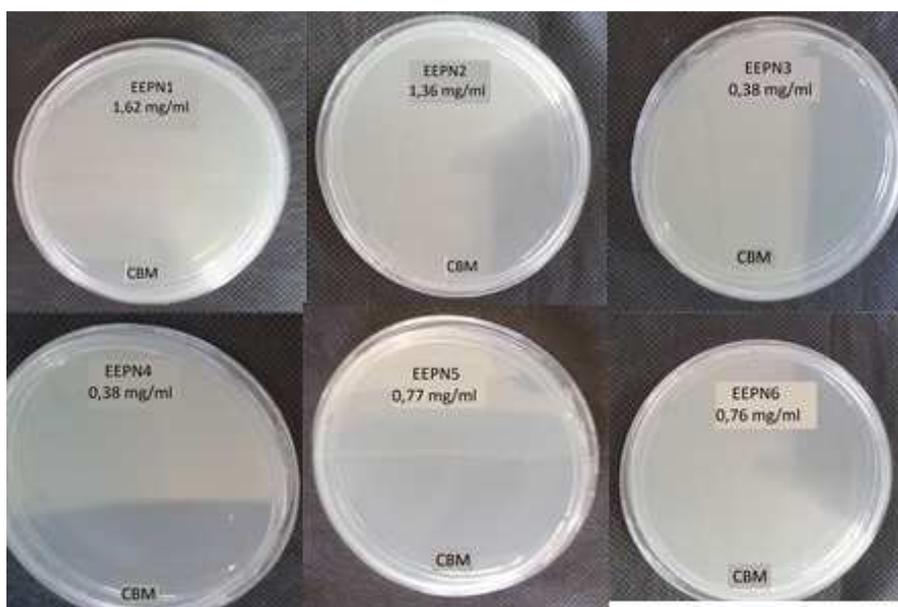


Figura 12– Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, frente a *S. aureus*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da sementeira das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C.

Para os extratos com o tempo de maturação superior a 180 dias, os valores de CBM variaram entre 2,6 e 0,67 mg/ml (Figura 13). Como observado abaixo, os resultados alcançados com as amostras 3, 4, 5 e 6 foram melhores quando comparado as demais amostras, com CBM de 0,68, 0,67, 0,69 e 0,67 mg/ml, respectivamente. Enquanto, que as amostras 1 e 2 obtiveram valores de CBM de 1,62 e 2,6 mg/ml, respectivamente.

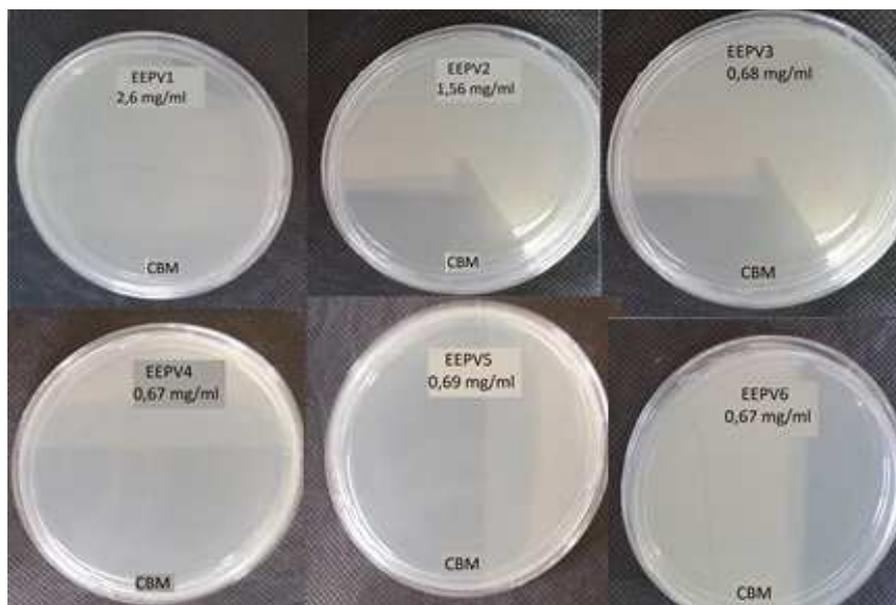


Figura 13– Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia superior à 180 dias, frente a *S. aureus*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C.

Ao serem relacionados os valores de CBM entre as amostras, observa-se que o própolis menor tempo de depósito na colmeia se mostrou mais eficaz no combate ao *S. aureus* do que os extratos com este tempo de depósito prolongado, sendo que as amostras 1, 2, 3 e 4 do EEPN foram as que obtiveram menores valores de CBM.

O DMSO à 7,5% não interferiu no crescimento do micro-organismo testado, no entanto o cloranfenicol, na concentração de 250 µg/ml, foi capaz de inibir totalmente o crescimento do *S. aureus* (Figura 14).



Figura 14– Resultado do teste de controle realizado para amostra de *S. aureus*, com o controle positivo usando cloranfenicol e controle negativo DMSO.

### 5.1.2. *Enterococcus faecalis*

Os dados obtidos com os testes feitos com o *E. faecalis* mostraram que os extratos com um menor tempo de depósito em colmeia obtiveram uma CIM compreendido entre os valores de 2,73 à 0,76 mg/ml, sendo os extratos 4 e 6 mostraram melhores ser mais eficaz, com as concentrações de CIM de 0,77 e 0,76 mg/ml, respectivamente, seguido pelo extrato 1 com a CIM de 0,81 mg/ml. As maiores concentrações de CIM foram obtidas com os extratos 3, 5 e 2 com concentração de 1,50, 1,54 e 2,73 mg/ml (Figura 15).

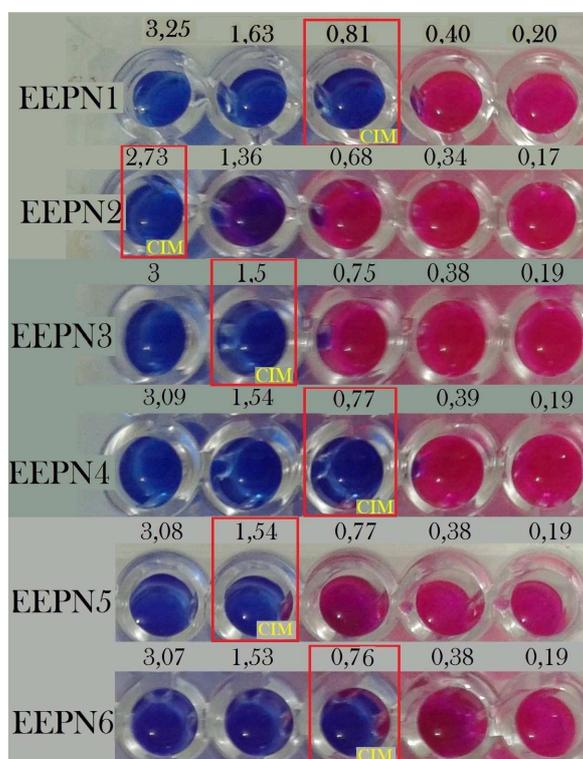


Figura 15 – Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *E. faecalis*. Os valores estão expressos em mg/ml.

As CIM das amostras do EEPV variou entre 2,72 à 1,34 mg/ml (Figura 16). As amostras 4, 5 e 6 apresentaram valores de CIM bem próximos, 1,34, 1,37, 1,34 mg/ml, respectivamente. A amostra 2 apresentou CIM de 1,56 mg/ml, com um valor relativamente próximos as anteriores, e finalmente, as amostras 1 e 3 foram as que

mostraram menor eficazes em eliminar a cepa de *E. faecalis*, com CIM de 2,60 e 2,72 mg/ml, respectivamente.

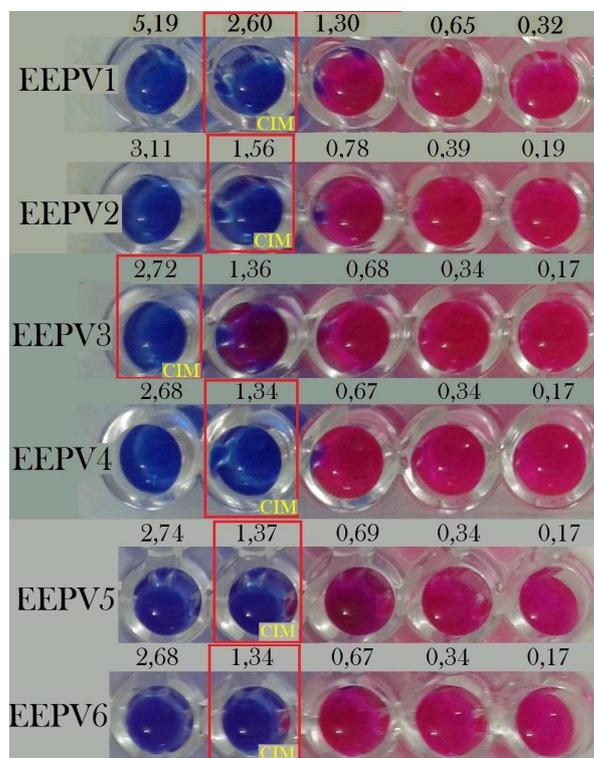


Figura 16– Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia superior a 180 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *E. faecalis*. Os valores estão expressos em mg/ml.

Os valores de CBM encontrados para os extratos de própolis com um tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, variou entre 3,1 à 1,5 mg/ml, com exceção das amostras 2 e 5, nas quais não foi possível a determinação da CBM (Figura 17). Com a análise dos resultados encontrados para o extrato Novo, pode-se distinguir quais obtiveram melhores resultados, sendo estes as amostras 1 e 3 apresentaram concentrações de 1,62 e 1,5 mg/ml respectivamente, demonstrando os melhores resultados. Por outro lado, as amostras que obtiveram resultados não tão expressivos, foram as amostras 4 e 6, com valores de CBM de 3,10 e 3,07 mg/ml, respectivamente.

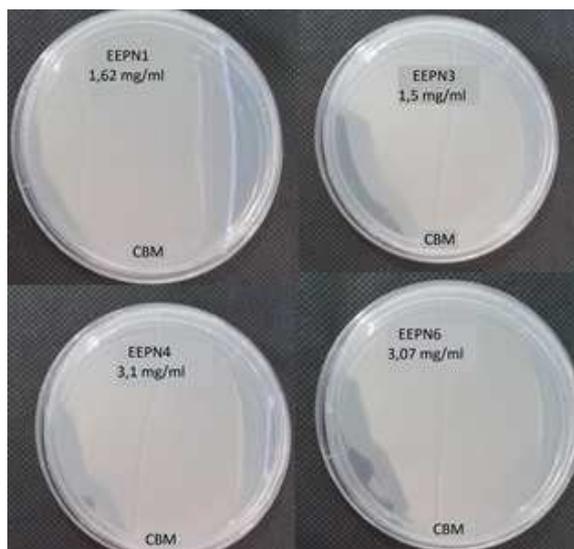


Figura 17 – Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, frente a *E. faecalis*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C.

Concomitantemente foram feitos os testes das amostras com um tempo maior de depósito em colmeia, resultando em valores CBM entre 3,11 e 2,68 mg/ml (Figura 18). Dentre os resultados obtidos, ficou constatado que as amostras 1 e 5 deste extrato não tiveram efeito bactericida nas concentrações analisadas. Entretanto, as amostras 3, 4 e 6 demonstraram resultados próximos entre si, com CBM de 2,72 a 2,68 e 2,68 mg/ml, respectivamente, com exceção da amostra 2 que obteve uma CBM de 3,11 mg/ml.

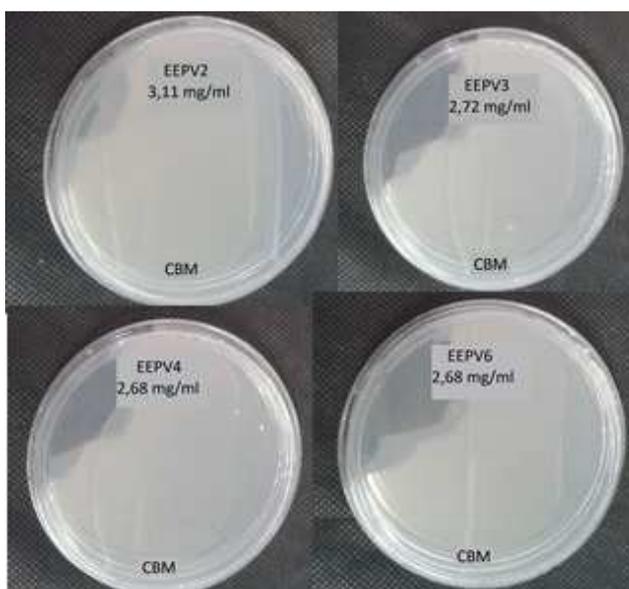


Figura 18 – Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia superior à 180 dias, frente a *E. faecalis*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C.

Correlacionando os valores encontrados para os testes anteriores da CBM, dos dois grupos de extrato de própolis analisados, com exceção dos extratos 5 que não foram eficazes, as amostras com tempo maior de depósito obtiveram efeito mais acentuado sobre a cepa de *E. faecalis*.

O cloranfenicol foi capaz de inibir totalmente o crescimento do *E. faecalis* e o DMSO não alterou o crescimento da bactéria, na concentração estudada (Figura 19).



Figura 19– Resultado do teste de controle realizado para amostra de *E. faecalis*, com o controle positivo usando cloranfenicol e controle negativo DMSO.

### 5.1.3. *Micrococcus luteus*

Os resultados obtidos ao final dos testes feitos com o *M. luteus* mostraram que as concentrações da CIM variaram entre 0,68 à 0,38 mg/ml para as amostras do EEPN (Figura 20). Nesses extratos, pôde-se observar que os resultados encontrados neste teste foram semelhantes, com exceção da amostra 2 que obteve a CIM de 0,68 mg/ml, enquanto as demais amostras obtiveram valores de CIM variando entre 0,38 a 0,40 mg/ml.

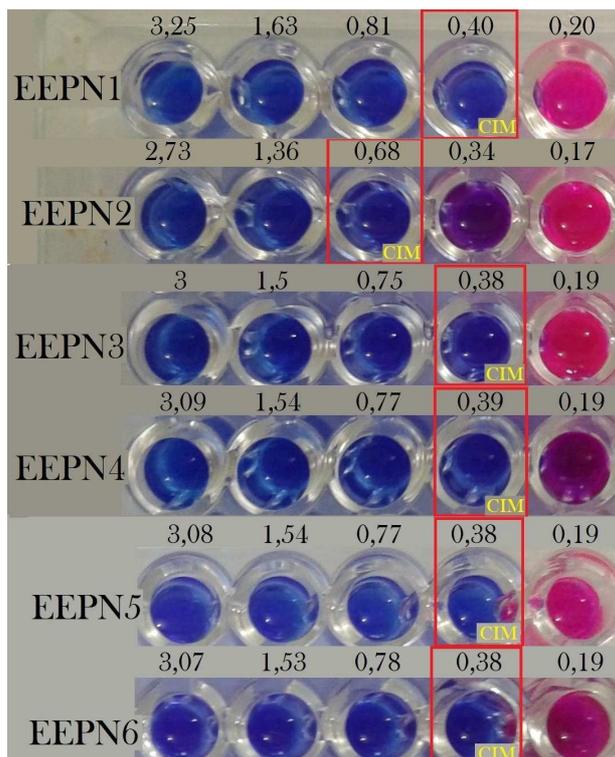


Figura 20 – Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *M. luteus*. Os valores estão expressos em mg/ml.

Enquanto isso, nos testes feitos com os EEPV foram encontrado valores entre 0,65 e 0,34 mg/ml (Figura 21). As amostras 3, 4, 5, e 6 obtiveram o mesmo valor de CIM de 0,34 mg/ml. Enquanto, a amostra 2 obteve a CIM de 0,39 mg/ml, e a amostra 1 de 0,65 mg/ml.

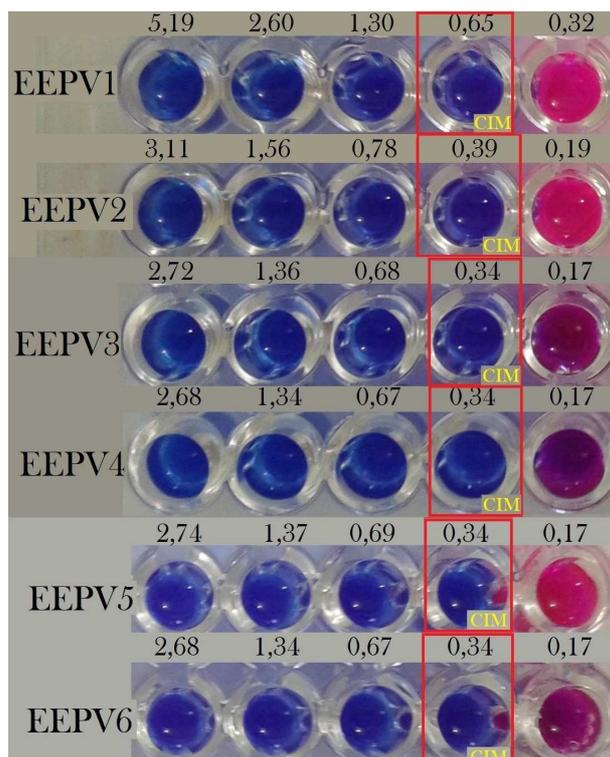


Figura 21 – Valores da CIM, para as amostras com tempo de depósito em colmeia superior a 180 dias, obtidos através de ensaio colorimétrico usando a resazurina, em microplaca contendo *M. luteus*. Os valores estão expressos em mg/ml.

Resumidamente, com exceção da amostra 1 do EEPN, que se mostrou mais eficaz ao combater o *M. luteus*, quando comparado ao EEPV, as demais amostras do extrato Velho foram mais eficazes, embora as amostras 3, 4, 5 e 6 tenham obtido os valores de CIM muito próximos.

Os resultados de CBM para as amostras de própolis coletadas com até 40 dias de produzida revelaram valores que estão compreendidos entre o intervalo de 1,54 à 0,38 mg/ml (Figura 22). Nesse sentido, a amostra 6 se mostrou mais eficaz que as outras amostras analisadas, obtendo valor de CBM de 0,38 mg/ml. As amostras 1, 3 e 4, obtiveram valores de CBM próximos de 0,81, 0,75 e 0,77 mg/ml, respectivamente. As amostras menos eficazes foram as 2 e 5 com valores de CBM de 1,36 e 1,54 mg/ml, respectivamente.

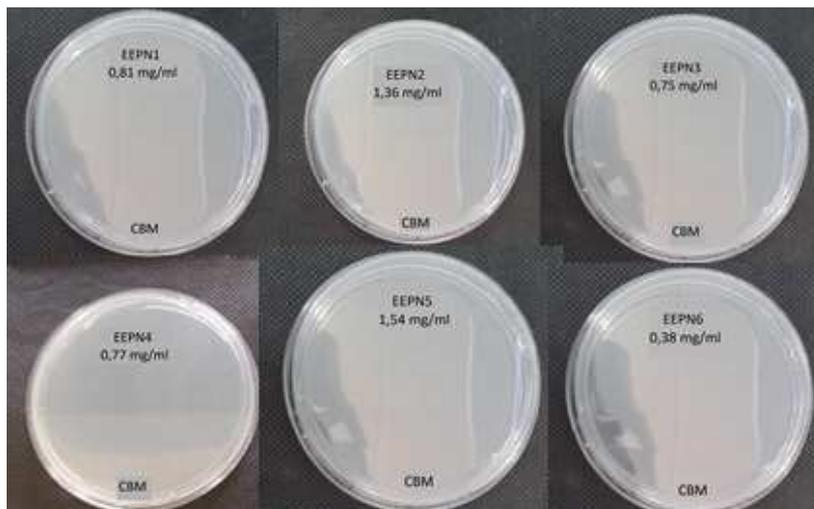


Figura 22 – Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia de até 40 dias, frente a *M. luteus*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C.

Foi feita também a leitura dos resultados obtidos para as amostras com um tempo de depósito maior que 180 dias, obtendo-se os valores dentro do intervalo de 1,56 à 0,67 mg/ml (Figura 23). Dentro as amostras, as com melhores resultados foram a 3, 5 e 6 com CBM de 0,68, 0,69 e 0,67 mg/ml, respectivamente. Por outro lado, as menos eficazes foram as amostras 1, 2 e 4, com valores de CBM de 1,30, 1,56 e 1,34 mg/ml, respectivamente, valores que foram praticamente duas vezes maiores que as demais amostras.

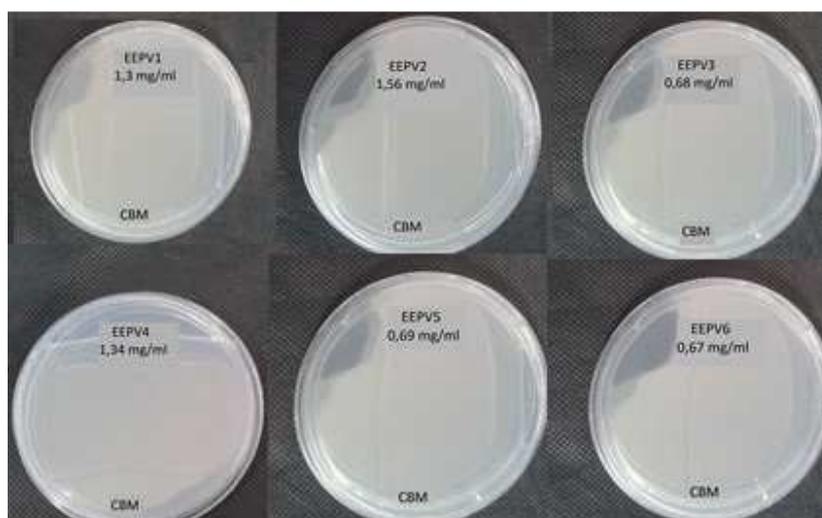


Figura 23 – Valores de CBM, das amostras com tempo de depósito em colmeia superior à 180 dias, frente a *M. luteus*. A CBM foi obtida após o ensaio de microdiluição e coloração por resazurina, através da semeadura das concentrações em placas de petri contendo AMH e incubados durante 24 horas à 35° C.

De forma geral, os resultados obtidos com a própolis com o tempo de depósito de até 40 dias demonstraram que estas amostras foram mais eficazes na ação bactericida.

Os testes de controle mostraram que o DMSO, na concentração estudada, não interferiu no desenvolvimento do micro-organismo, todavia o cloranfenicol alcançou o resultado esperado, inibindo totalmente o crescimento do *M. luteus* (Figura 24).



Figura 24 – Resultado do teste de controle realizado para amostra de *E. faecalis*, com o controle positivo usando cloranfenicol e controle negativo DMSO.

#### 5.1.4. *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*

Os resultados obtidos com a *P. aeruginosa* e a *E. coli* demonstraram que as diferentes concentrações dos extratos de própolis não foram capazes de inibir o crescimento dessa bactéria no ensaio de microdiluição, como pode-se verificar na Figura 25 abaixo. O controle positivo usando a penicilina+estreptolisina (10000UI/10mg) foi capaz de inibir totalmente o crescimento da bactéria e o DMSO em uma concentração de 10%, não alterou o crescimento dos micro-organismos.

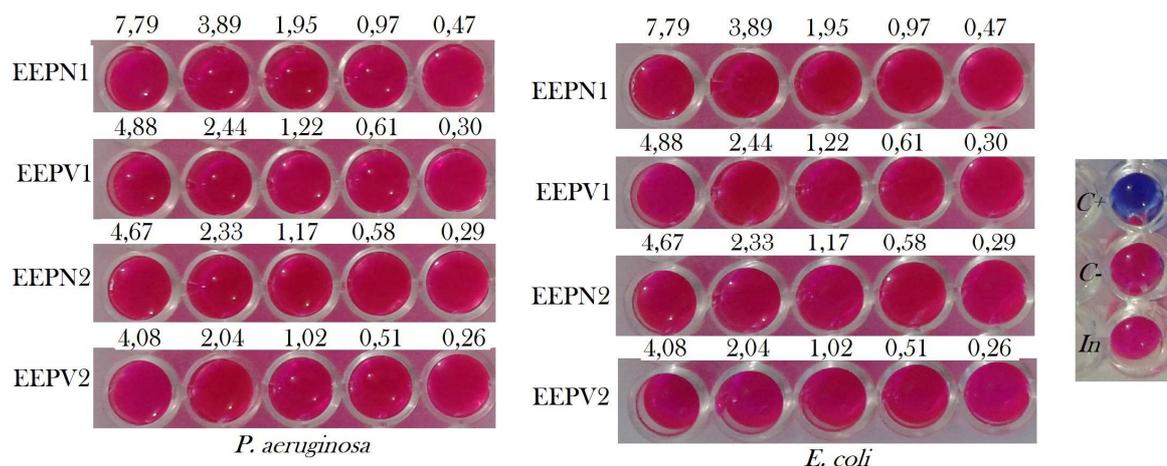


Figura 25 – Amostra dos resultados de microdiluição com coloração de resazurina, dos extratos EEPN1, EEPV1, EEPN2 e EEPV2 frente a *P. aeruginosa* e *E. coli*, os valores estão expressos em mg/ml.

A partir dos resultados ficou evidenciada a atividade antimicrobiana da própolis frente aos micro-organismos estudados, com exceção da *P. aeruginosa* e *E. coli*. Os resultados de CIM e CBM obtidos foram expressos na tabela abaixo.

	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<b>EEP N1</b>	0,40	1,62	0,81	1,62	0,40	0,81	>4,88	>4,88	>4,88	>4,88
<b>EEP V1</b>	1,30	2,6	2,6	>5,19	0,65	1,30	>7,89	>7,89	>7,89	>7,89
<b>EEP N2</b>	0,68	1,36	2,73	>2,73	0,68	1,36	>4,08	>4,08	>4,08	>4,08
<b>EEP V2</b>	0,78	1,56	1,56	3,11	0,39	1,56	>4,67	>4,67	>4,67	>4,67
<b>EEP N3</b>	0,38	0,38	1,5	1,5	0,38	0,75	>4,0	>4,0	>4,0	>4,0
<b>EEP V3</b>	0,34	0,68	2,72	2,72	0,34	0,68	>3,62	>3,62	>3,62	>3,62
<b>EEP N4</b>	0,39	0,39	0,77	3,1	0,39	0,77	>4,1	>4,1	>4,1	>4,1
<b>EEP V4</b>	0,34	0,67	1,34	2,68	0,34	1,34	>3,57	>3,57	>3,57	>3,57
<b>EEP N5</b>	0,39	0,77	1,54	>3,08	0,39	1,54	>4,1	>4,1	>4,1	>4,1
<b>EEP V5</b>	0,69	0,69	1,37	>2,74	0,34	0,69	>3,65	>3,65	>3,65	>3,65
<b>EEP N6</b>	0,38	0,76	0,76	3,07	0,38	0,38	>4,09	>4,09	>4,09	>4,09
<b>EEP V6</b>	0,67	0,67	1,34	2,68	0,34	0,67	>3,57	>3,57	>3,57	>3,57

Concentrações em mg/ml

Tabela 03: Resultados encontrados de CIM e CBM, para os micro-organismos testados.

## 5.2. Discussão

A própolis vem sendo usada a séculos pelos mais diversos povos da antiguidade, principalmente pela sua ação eficaz no combate a infecções e cicatrização de feridas e queimaduras (MARCUCCI, 1996). Recentemente a própolis tornou-se objeto de estudo acadêmico em várias universidades ao redor do globo, sendo descobertas inúmeras outras atividades associadas a ela, dentre elas podem ser citas a atividade antioxidante (KALOGEROPOULOS et al 2009; MOHAMMADZADEH et al 2007; SULAIMAN et al 2011), atividade antitumoral (BURDOCK 1998; SFORCIN 2007), a modulação da resposta imune (CUESTA et al 2005; SFORCIN 2007) e atividade antimicrobiana (PEREIRA et al 2002; KUMAZAWA et al 2004; SOUZA et al 2007; QUINTERO-MORA et al 2008).

Devido a estas descobertas, o cultivo de abelhas com este intuito e a comercialização deste produto aumentou, acontecendo assim uma valorização da própolis, em especial aquela com um aspecto de nova, quando colida após poucos dias de produzida, e consecutivamente a própolis que com um tempo mais prolongado na colmeia ser descartada, por não ser esteticamente aceita para comercialização pois apresenta uma aparência mais ressecada e opaca (SCHMIDT, 2010). Este trabalho tem o objetivo de verificar se esta diferença entre os períodos de deposito do própolis na colmeia interferem na sua atividade antimicrobiana.

SCHMIDT (2010) analisou a composição química das mesmas amostras de própolis com tempos de maturação diferenciados usadas neste estudo, e relatou que na própolis com um menor tempo de deposito em colmeia, o teor de compostos fenólicos foi ligeiramente superior às amostras com um tempo maior de deposito, entretanto não mostrou diferença no teor de flavonoides, mostrando assim que não existem diferenças notáveis na composição nos tipos de própolis com diferente maturação. Por outro lado, SCHMIDT (2010) verificou que as amostras de própolis Velha, de forma quantitativa, demonstraram possuir quantidade mais elevada de flavonoides do que a própolis Nova. Além disso, esse autor mostrou que todas as amostras testadas tinham em sua composição a presença de ácido comúncio, dihidrocamferida e Artepillina C. Esse último componente já foi constatado apresentar atividade antimicrobiana, além de poder ser considerada um marcador

para a chamada própolis verde, podendo Artepillina C ser considerada uma das substâncias associadas aos resultados antimicrobianos obtidos (SALATINO et al 2005; NASCIMENTO et al 2008; SCHMIDT, 2010).

A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo destacada sua ação frente as bactérias gram-positivas, em especial sobre *S. aureus* (MARCUCCI, 1995; GRANGE & DAVEY, 1990). Fernandes e cols. (2006) analisaram 3 amostras de própolis Brasileiras, de localidades distintas, ficando evidenciado a maior ação sobre a bactéria *S. aureus* quando comparado ao *Enterococcus sp.* e bactérias gram-negativas, resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, assim como por outros autores como Grange e Davey (1990), Vargas e cols. (2004), Uzel e cols. (2005) e Kalogeropoulos e cols. (2009) que analisaram 12 amostras de própolis, onde somente duas destas tiveram algum tipo de efeito sobre bactérias Gram-negativas.

A maior eficácia contra as bactérias gram-positivas já era esperada, pois vários estudos demonstraram que estas são mais sensíveis à própolis quando comparadas as bactérias gram-negativas (MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005; SFORCIN, 2009). A resistência das bactérias gram-negativas provavelmente está ligada à presença de uma membrana celular quimicamente mais complexa, uma maior quantidade de lipídios e também a presença de lipopolissacarídeo na parede externa da célula, sendo este um dos fatores que determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses micro-organismos (VARGAS et al 2004; Pinto et al 2011).

Além disso, os micro-organismos Gram-negativos dispõem de fatores de virulência que colaboram para essa maior resistência podendo ser citados a bomba de efluxo, onde a bactéria consegue de forma ativa expulsar uma substância do meio periplasmático para o exterior da célula. Além disso, essas bactérias apresentam enzimas, que conseguem inativar antimicrobianos através da quebra de suas estruturas, e também podem modificar a permeabilidade da membrana impedindo a entrada destas moléculas na célula (MARTINEZ, 2006; GUARNERI, 2011).

Ao mesmo tempo, já é conhecido, pelos pesquisadores, o efeito mais pronunciado da própolis sobre *S. aureus* entre o grupo dos Gram-positivos (MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005; KALOGEROPOULOS et al 2009; SFORCIN, 2009). Nesse sentido, CHANG e cols. (2005) e FERNANDES JR (2006) relataram que a própolis coletada de locais diferentes se mostrou eficaz contra micro-organismos gram-positivos, principalmente *S. aureus*. A sensibilidade acentuada do *S. aureus*, pode ser explicada pela ação da galangina, um dos compostos presentes na própolis que atua induzindo a perda de potássio pela célula, causando assim danos diretos e indiretos à membrana citoplasmática e enfraquecendo a parede celular, acarretando posteriormente, na lise osmótica. Além disso, esse composto pode interferir na produção de fatores de virulência como a lipase e a formação de biofilme (CUSHNIE e LAMB, 2005; DE VECCHI e DRAGO, 2007).

Embora o *E. faecalis* tenha apresentado sensibilidade aos diferentes extratos de própolis nesse estudo, alguns autores como Stepanovic e cols (2003), relataram que esse micro-organismo gram-positivo é um dos mais resistentes à própolis. Os melhores resultados para o *S. aureus* quando comparado ao *E. faecalis* são confirmados pelo estudo de UZEL e cols. (2005), que analisaram esses dois micro-organismos e as mesmas cepas utilizadas neste estudo, e obtiveram resultados quatro vezes melhores para o *S. aureus*, semelhantes aos nossos dados. Os resultados semelhantes entre o *M. luteus* e o *S. aureus* já eram esperados graças as semelhanças estruturais destes e pelo fato de pertencerem à mesma família (ANVISA, 2008)

Pouco se sabe sobre os mecanismos de ação das substâncias que compõem a própolis, entretanto para algumas delas já é conhecido esse mecanismo, como a ação da galangina sobre o *S. aureus*, além da quercetina que mostra uma atividade inibitória sobre o DNA girase, e a CAPE sobre a produção de enzimas bacteriana (DE VECCHI e DRAGO, 2007; CAETANO, 2010). Estes efeitos citados anteriormente podem ser complementados com a inibição da divisão celular, motilidade celular e a inibição da síntese proteica, do RNA polimerase além da perturbação metabólica causada por flavonoides (MIRZOEVA et al 1997; DE VECCHI e DRAGO, 2007; SANCHES; 2012).

Embora existam outras substâncias que apresentem atividade antimicrobiana, como a pinocebrina, apigenina e a Artepillina C, o mecanismo de ação ainda não foi elucidado, há também autores que defendem que a ação da própolis não é devido a uma única substância, mas sim devido à alta complexidade e a atividade sinérgica das substâncias (MARCUCCI, 1996; FERNANDES JUNIOR et al 2006; FARNESI, 2007; SFORCIN, 2009).

Apesar de alguns estudos mostrarem que a *P. aeruginosa* e *E. coli* estão entre os poucos micro-organismos gram-negativos sensíveis ao efeito do extrato de própolis (MARCUCCI, 1995; BERRETTA, 2007). Autores relatam que a própolis pode inibir a motilidade destas bactérias, mostrando ação antimicrobiana dos EEP avaliados (BULMAN et al 2011). Por outro lado, Farnesi (2007) mostrou que algumas amostras de própolis usadas não demonstraram atividade antimicrobiana frente estas bactérias.

## 6. CONCLUSÃO

- Os EEPs somente apresentaram ação antimicrobiana sobre as bactérias gram positivas, não apresentando ação frente a *P. aeruginosa* e *E. coli*.
- O *S. aureus* e *M. luteus* foram os micro-organismos mais sensíveis do estudo realizado, apresentando concentrações de CIM e CBM inferiores às outras bactérias analisadas, tendo o *M. luteus* obtido os resultados mais significativos.
- O *E. faecalis*, quando comparado ao *S. aureus* e *M. luteus*, mostrou-se mais resistente à própolis, entretanto, mesmo assim foi verificada a suscetibilidade dessa bactéria frente aos extratos analisados.
- De forma geral a própolis EEPN, mostrou os melhores resultados, entretanto algumas amostras do EEPV se destacaram, quando comparados com a própolis nova.
- Apesar dos apiários estarem localizados em uma mesma região os resultados mostraram-se diferentes, até mesmo para pontos de coleta bem próximos uns dos outros.
- Fazendo-se uma comparação entre os extratos e os micro-organismos analisados, o EEPN1 obteve o melhor resultado para o *E. faecalis*, o EEPN3 frente o *S. aureus* e o EEPN6 para o *M. luteus*.

Com isso, a partir destes dados, pode-se concluir que os fatores sazonais e geográficos também podem interferir na ação antimicrobiana da própolis, já que influenciam, diretamente, na produção dos metabolitos secundários pelas plantas que serão coletadas pelas abelhas. Apesar da própolis nova mostrar melhores resultados, a própolis velha obteve resultados semelhantes as em alguns casos até melhores, ficando então evidenciada que a própolis com um tempo maior de depósito em colmeia, também deve ser usada, e não descartada.

## 7. REFERÊNCIAS

ABREU, A. P. L.; **Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde**. 71 f. Dissertação (Mestrado profissional em Farmacologia Clínica), Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2008.

ADELMANN, J.; **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana e antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ALENCAR, S. M. et al; Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 113, p278-283, 2007.

ALVES, E. G.; Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 5, p1224-1229, 2008.

ANVISA, disponível em:  
[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/intr\\_sta.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_sta.htm) acessado em: 10/02/2013, 2008.

ARAUJO, J.C. et al; Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**. Vol. 33, p55-64, 2004.

BANKOVA, V.; Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 100, p114-117. 2005a.

\_\_\_\_\_; Recent Trends and Important Developments in Propolis Research. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, Vol. 2(1), p29-32, 2005b.

BARREIRO, E. J.; Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 13(1), p29-39, 1990.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; Isolados de fungos ocratoxigênicos da secção *circundati* (grupo *Aspergillus ochraceus*) associados a grãos de café verdes. **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, I, 2000. Disponível em: <<http://www.sapc.embrapa.br/index.php/view-details/i-simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil/79-isolados-de-fungos-ocratoxigenicos-da-seccao-circundati-grupo-aspergillus-ochraceus-associados-a-graos-de-cafe-verdes1>> Acesso em: 20/11/2011.

BERRETTA, A. A.; **Pesquisa pré-clínica e clínica e um gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EEP-AF) para a redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes queimados**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BEVILACQUA, I. M. et al; A clorexidina como alternativa no tratamento de infecções endodônticas: revisão da literatura. **Rev. biociên.**, Vol.10 (3), p139-145, 2004.

- BUCHAUL, R. B.; Historico da fitoterapia. **Cadernos de Fitoterapia**, 2001.
- BULMAN, Z. et al; A novel property of propolis (bee glue): Anti-pathogenic activity by inhibition of N-acyl-homoserine lactone mediated signaling in bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 138, p788-797, 2011.
- BURDOCK, G. A.; Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, Vol. 36, p347-363, 1998.
- BURIOL, L.; **Extratos etanólicos e oleosos de própolis: quantificação e atividade biológica**. 84 f. Dissertação (mestrado em Química Aplicada) Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2008.
- CAETANO, A. C.; **Fenil ester do ácido caféico melhora a resposta ao estresse oxidativo em modelo animal de obesidade induzida por dieta hiperlipídica**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piraciaba, 2010.
- CARELLI, G. et al; Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Vol.13, n.1, p110-115, 2011.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, Vol. 21 (1), p99-105, 1998.
- CHANG LU, L.; WEN CHEN, Y.; CHUN CHOU, C.; Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 102, p213-220, 2005.
- CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standart – ninth Edition. CLSI document M07-A9, 2012.
- COELHO, C. P.; **Avaliação de tratamento homeopático em suínos infectados por *Escherichia coli***. Tese (Doutorado em Epidemiologia experimental e aplicada em zoonoses). Universidade São Paulo, São Paulo, 2010.
- CUESTA, A. et al; In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, Vol. 18, p71-80, 2005.
- CUNHA, L. V. et al; A própolis no combate a tripanossomatídeos de importância médica: Uma perspectiva terapêutica para Doença de Chagas e Leishmaniose. **Rev. Pat. Trop**, Vol. 40 (2), p105-124.abr.-jun. 2011.
- CUSHNIE, T.P.; LAMB, A. J.; Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 101, p243–248. 2005.

DAUGSCH, A.; **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

DAZA PEREZ, R. M.; Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importância em la tomada de decisiones em la práctica diaria. **Inf Ter Sist Nac Salud**, 22, p57-67, 1998.

DUARTE, M. C. T.; Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil, **Multiciência**, Vol 7, 2006.

ELIZABETSKY, E.; Etnofarmacologia. **Cienc. Cult.**, Vol. 55(3), p35-36, 2003.

FALAGAS, M. E.; KOPTERIDES, P.; Risk factor for the isolation of mult-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. **Journal of Hospital Infection**, Vol. 64, p7-15, 2006.

FARNESI, A. P.; **Efeito da própolis de abelhas africanizadas e meliponídeos em micro-organismos**. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FERRARA, A. M.; Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. **Int. Journal of Antimicrobial Agents**, Vol. 27, p183-195, 2006.

FERNANDES JUNIOR, A.; 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.

FIGUEIREDO, E. A. P. et al; *Pseudomonas aeruginosa*: Frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Rev. Bras. Ter. Int.**, Vol. 19 (4), p 421-427, 2007.

FINGER, D.; **Estudo da composição química do extrato oleoso de própolis da região de Prudentópolis**. Dissertação (mestrado em Química Aplicada) Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2009.

FREITAS, I. J. S.; **Colonização bacteriana nasal em recém-nascidos prematuros e suas mães em duas unidades de terapia intensiva neonatal**. 55 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Materno-Infantil) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2009.

FUNARI, C. S.; **Análise de própolis da Serra do Japi, determinação de sua origem botânica e avaliação de suas contribuições em processos de cicatrização**. 153 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Departamento de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GELATTI, L. C. et al; *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **An. Bras. Dermatol.**, Vol. 84 (5), p501-506, 2009.

GUARNERI, R.; **Estudos de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes e produtores de Metallo- $\beta$ -Lactamases**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W.; Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**. Vol. 83, p159-160, 1990.

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Disponível em: <<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/QuemSomos/Paginas/INSA.aspx>>, Acesso em 13/06/2011.

JAMET, E. ET al; Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**, p1-8, 2012.

KALOGEROPOULOS, N. et al; Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**, Vol. 116, p452-461, 2009.

KIMOTO, T.; Ação Antitumoral do Artepillin-C. **Própolis Kenkou Tokuhon 1**, Vol. 3, p45-48, 2001. Disponível em: <[http://www.bioessens.com/atividade\\_antitumor.htm](http://www.bioessens.com/atividade_antitumor.htm)>, Acesso em: 08/04/2012.

KLOOS, W. E.; MUSSELWHITE, M. S.; Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **Appl. Microbiol.**, Vol. 30 (3), 381-95 , 1975.

KOOKEN, J. M; FOX, K. F.; FOX, A.; Characterization of *Micrococcus* strains isolated from indoor air. **Mol. and cell. probes**, Vol 26, 1-5, 2012.

KUMASAWA, S. et al; Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Vol. 84(3), p329–339, 2004

LIBÉRIO, S. A. et al; The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 125, p1-9, 2009.

LUSTOSA, S. R. et al; Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. Bras. Farmacognosia**, Vol. 18(3), p447-454, Jul./Set. 2008.

MALACARNE, B.; **Ocorrência de *C. tropicalis* no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, estudo de sua suscetibilidade a antifúngicos com propostas de métodos modificados para aprimoramento dos testes *in vitro***. 123 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

MARCUCCI, M. C.; Própolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p83-99, 1995.

\_\_\_\_\_; Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim.Nova*, Vol. 19(5), p529-536, 1996.

MARGEE, J. T. et al; *Micrococcus* and *Stomatococcus* sp. from human infections. **Jour. of Hosp. Inf.**, Vol. 16, p67-73, 1990.

MARTINEZ, L. M.; Mecanismos de aquisição de resistencia a los antibióticos. **Jano**. 20 - 26, p75-80, 2006.

MATOS NETO, M.; **Avaliação *in vitro* da eficácia de técnicas endodônticas de preparo mecânico na redução de *Enterococcus faecalis***. 65 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2007.

MELO, S. K.; **Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas do parque estudar Rio Doce em Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006.

MENDES, C. M. F.; Avaliação da atividade *in vitro* do cefetamet e outros agentes antimicrobianos diante de bactérias isoladas de infecções do trato respiratório. **Rev. Ass. Med. Brasil**, Vol. 43(1), p47-52. 1997.

MENEZES, H.; Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, Vol. 72, n.3, p.405-411, jul./set., 2005

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P. C.; Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiol. Res.**, Vol. 152, p239-246, 1997.

MOHAMMADZADEH, S. et al; Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**, Vol. 103, p729–733, 2007.

MONODANE, T. et al; *Micrococcus luteus* cells and cell walls induce anaphylactoid reactions accompanied by early death and serum cytokines in mice primed with muramyl dipeptide. **Imun. and Med. Microbiol.**, Vol. 17, p49-55, 1997.

MONTEIRO, M. C. et al; A New Approach to Drug Discovery: High-Throughput Screening of Microbial Natural Extracts against *Aspergillus fumigatus* Using Resazurin. **Journal of Biomolecular Screening**, Vol. 17(4), p542-549, 2012.

MONTEJANO, H.A. et al. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**. n. 64. p. 117-124, 2005.

NASCIMENTO, E. A. et al; Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Rev. Bras. Farmacog.**, Vol. 18(3), p379-386, 2008.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Vol. 11 (1), 142-201, 1998.

ODA, J. M. et al; Ação do extrato de própolis na Leishmaniose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p111-121, jan./jun. 2011.

OLIVEIRA, A. C. P. et al; Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 101(5), p493-497, 2006.

OLIVEIRA, A. F. G. F.; **Contributo para o estudo qualitativo de carnes secas e salgadas de ovino e caprino. Composição química e análise microbiológica. Efeito da espécie.** 92 f, Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2011.

PARADELA, T. C.; KIGA-ITO C. Y.; JORGE A. O. C.; *Enterococcus faecalis*: Considerações clínicas e microbiológicas. **Rev. Odontologia da UNESP**, Vol. 36 (2), p163-168, 2007.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; Classificação das própolis brasileira a partir de suas propriedades físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, n. 58, 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm>>, Acesso em: 10/04/2012.

PARK, Y. K. et al; Comparação das Características Físico-Químicas das Própolis Produzidas na Região Sub-Tropical da América do Sul: Evidência Fitoquímica de sua Origem Botânica. **Mensagem Doce**, São Paulo, v.61, p.2-10, 2001.

PEREIRA, A. S; SEIXAS, F. R.; AQUINO NETO, F. R.; Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 2, p321-326, 2002.

PINTO, A. C. et al; Produtos naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 25, Supl. 1, p45-61, 2002.

PINTO, L. M. A.; TAIRONI, N. R.; CARVALHO, L. B.; Propriedades, uso e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol. VIII (3), p76-100, 2011.

POPOVA, M. et al; Antibacterial Activity of Turkish Propolis and its Qualitative e Quantitative Chemical Composition. **Phytomedicine**, Vol.12, p221-228, 2005.

QUADROS, A. U. et al, Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiol.**, Vol. 56, 349–352, 2011.

QUINTERO-MORA, M. L. et al; Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, Vol. 25, p22-26, 2008.

REIS, C. M. F. et al; Atividade anti-inflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico e própolis. **Ver. Bras. Farmacog.**, Vol. 9(10), p43-52, 2000.

ROBINS-BROWNE, R. M; HARTLAND, E. L.; Advances in pediatric gastroenterology and hepatology. **Journal of Gast. And Hepat.**, Vol. 17, 467-475, 2002.

RODRIGUESA, A. E.; Diagnostico da arquitetura do ninho de *Melipona scutellaris* L.. **Mensagem Doce**, n. 78, 2004. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/78/artigo3.htm>>, Acesso em: 10/04/2012.

SALATINO, A. et al; Origin and chemical variation os Brazilian própolis. **eCAM**, Vol. 2(1), p33-38, 2005.

SCAZZOCCHIO, F. et al; Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, Vol. 161, p327-333, 2006.

SCHMIDT, E. M.; **Análise da composição em compostos fenólicos e mineral da própolis de Prudentópolis: aplicações da análise multivariada.** 127 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2010.

SCHNUCH, A.; Contact allergy to farnesol in 2021 consecutively patch tested patients. Results of the IVDK. **Contact Dermatitis**. Vol. 50, p117–121, 2004.

SFORCIN, J. M.; Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 113, p1–14, 2007.

\_\_\_\_\_; **Própolis e Imunidade: Comprovações Científicas.** São Paulo: Ed. UNESP, 2009.

SILVA, M. I. G.; **Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú-Ceará.** 2003. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

SILVA, R. A. et al; Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1842-1848, 2006.

SILVA, E. C. F. et al; *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb.**, v.52 (2), 2007.

SIMÕES, C. M. O; et al; **Farmacognosia da planta ao Medicamento**, 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p1002, 2004.

SOARES, M. C. S. T.; **Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ.** 78

f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

SORIA, X.; CARRASCOSA, J. M.; Flora cutânea normal e infección bacteriana secundaria. **Actas Dermosifiliogr.**, Vol. 98 (1), p15-21, 2007.

SOUZA, C.A.I.; SCARCELLI, E.; Agressão por microrganismos da microbiota endógena. **Arq. Inst. Biol.**, Vol. 67(2), p.275-281, 2000.

SOUZA, J. P. et al; Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Rev. Bras. Farmacognosia**, Vol. 17(1): 85-93, Jan./Mar. 2007.

STEPANOVIC, S. et al; In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiol. Res.**, Vol. 158, p353–357, 2003.

SULAIMAN, G. M. et al; Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. **Food and Chemical Toxicology**, Vol.49, p2415–2421, 2011.

VALENCIA, D. et al; Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chemistry**, Vol. 131, p645–651, 2012.

VARGAS, A. C. et al; Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p159-163, jan-fev, 2004.

VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G. M. T.; Antibiogramas de linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de diferentes ambientes aquáticos. **Rev. Pat. Trop.**, Vol. 35 (3), 241-244, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO A. C.; MACIEL, M. A. M.; Plantas medicinais: Cura segura?. **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, p519-528, 2005.

UZEL, A.; Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, Vol. 160, p189-195, 2005.

YAMANAKA, E. H. U.; **Incidência, fatores de virulência e resistência a antibióticos de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp isolados como indicadores de contaminação fecal em água de consumo de fontes alternativas de Curitiba e região metropolitana**, 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Departamento de Patologia Básica e Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná, 2011