

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

CAMILA DIEDRICH

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS
POR ABELHAS *Apis mellifera* SELECIONADAS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PATO BRANCO
2015**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

CAMILA DIEDRICH

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS
POR ABELHAS *Apis mellifera* SELECIONADAS**

Pato Branco – PR
2015

CAMILA DIEDRICH

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS
POR ABELHAS *Apis mellifera* SELECIONADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Dr^a Solange Teresinha Carpes

Co-orientador: Dr^a Tatiane L. C. Oldoni

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS PRODUZIDAS POR ABELHAS *Apis mellifera* SELECIONADAS** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **10.2.215-B** de 2015.

Fizeram parte da banca os professores.

Solange Teresinha Carpes

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Amália Soares dos Reis

AGRADECIMENTOS

Ao meu anjo e companheiro Cleber S. Schauss, por acreditar na minha capacidade, me apoiar em todos os momentos e não deixar faltar chocolate em casa.

Aos meus pais, Marcos e Marli, pelo apoio, carinho e incentivo desde sempre, e aos meus irmãos, Marcos Júnior e Ana Carolina pelo companheirismo e cafés compartilhados.

Às Professoras Dr^a. Solange Teresinha Carpes e Dr^a Tatiane Luiza Cadorin Oldoni, pela orientação, co-orientação, atenção e paciência durante todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Qualidade Agroindustrial – LAQUA, em especial à Roberta Roncatti, pelo espaço cedido, dedicação e amizade.

Aos professores da Coordenação de Química, pelo conhecimento compartilhado durante os anos de graduação.

Aos colegas Sheila C. O., Suelen A., Matheus A. C., Anaclara P., Cristiane M., Amália S. R., Letícia D.S e Thariane B., pela parceria na pesquisa, ajuda e amizade.

Aos meus amigos da UTFPR, Sheila C. O., Leticia S., Aline P., Juliano S., Aline C. L., Thiago C. Marília E. R. e Ricardo V, pelo apoio e palavras de incentivo.

Aos meus amigos de intercâmbio, em especial Carolina A., Ana Luisa C. P. M., e Daniela R., por serem a minha família no Canadá.

Por fim, à todos aqueles que de alguma maneira fizeram parte da minha vida durante os anos de graduação.

EPÍGRAFE

“De acordo com as leis da aviação, uma abelha não poderia voar de maneira alguma. Suas asas são pequenas demais para levantar seu corpo gordinho do chão. Mas a abelha, é claro, voa assim mesmo. Porque as abelhas não dão a mínima para o que os humanos acham impossível”.

Bee Movie

RESUMO

DIEDRICH, Camila. Atividade Antimicrobiana de Extratos de Própolis Produzidas por Abelhas *Apis melífera* Geneticamente Seleccionadas. 2015. 33 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2015.

A própolis, produzida pelas abelhas como agente protetor da colmeia, vem sendo utilizada desde a antiguidade por várias civilizações. Entre os componentes da própolis, encontram-se os compostos fenólicos, responsáveis pelas atividades antioxidante e antimicrobiana da própolis. A Universidade Tecnológica Federal do Paraná – câmpus Dois Vizinhos vem trabalhando na melhoria da qualidade do mel, produzido por abelhas seleccionadas *Apis mellifera*. Este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir de própolis produzidas em 2013 e 2015. Após a obtenção do extrato nas condições ótimas de extração, foi desenvolvida a atividade antimicrobiana dos mesmos frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori* pelo método de microdiluição em microplacas de 96 poços para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Para os extratos com poder de inibição, os valores de CIM variaram entre 0,31 a 2,5 mg.mL⁻¹ para o *Staphylococcus aureus* e de 1,25 a 5,0 mg.mL⁻¹ para a *Salmonella bongori*. Os extratos 2015 foram mais eficazes que os extratos 2013 quando determinada a CBM para o *Staphylococcus aureus*, obtendo-se CBM entre 0,31 a 0,63 mg.mL⁻¹. Nenhum dos extratos foi eficiente no efeito bactericida da *Salmonella bongori*. Os resultados obtidos demonstraram valores de CIM próximos aos encontrados na literatura, sendo as bactérias *Staphylococcus aureus* mais sensíveis aos extratos do que as bactérias *Salmonella bongori*.

Palavras-chave: Microdiluição, concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima.

ABSTRACT

DIEDRICH, Camila 2015. Antimicrobial Activity of Propolis Extract Produced by Genetically Selected *Apis mellifera* Bees. 2015. 33 f. Course Conclusion Work (Industrial Chemistry Bachelor) – Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2015.

The propolis, produced by bees as a protector agent of the hive, has been used since antiquity for several civilizations. Among the propolis components, are the phenolic compounds, responsible for the antioxidant and antimicrobial propolis activities. The Federal Technological University of Paraná – campus Dois Vizinhos has been working in the development of better quality honey, produced by selected *Apis mellifera* bees. The objective of this study was to verify the antimicrobial activity of the extracts obtained in 2013 and 2015, following the 2³ factorial planning conducted for previews works using this propolis. After the extract obtainment, using the optimal extraction conditions, its antimicrobial activity was studied against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella bongori* using the microdilution in 96-wells method for the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) determination. For the extracts that showed inhibition power, the MIC values varied between 0,31 and 2,5 mg.mL⁻¹ for *Staphylococcus aureus* and between 1,25 and 5,0 mg.mL⁻¹ for *Salmonella bongori*. When the MBC was determined for *Staphylococcus aureus*, the 2015 extracts were more effective than the 2013 extracts, obtaining MBC between 0,31 and 0,63 mg.mL⁻¹. None of the extracts was efficient in the bactericidal effect of the *Salmonella bongori*. The results showed MIC values close to the ones found in the literature, being *Staphylococcus aureus* more sensitive to the extracts than *Salmonella bongori*.

Keywords: Microdilution, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Amostra de própolis triturada. | 21 |
| Figura 2 Aspecto do extrato etanólico de própolis obtido. | 22 |
| Figura 3 Resultados obtidos com os extratos 2013 para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> | 25 |
| Figura 4 Resultados obtidos com os extratos 2013 para a bactéria <i>Salmonella bongori</i> | 26 |
| Figura 5 Resultados obtidos com os extratos 2015 para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> | 27 |
| Figura 6 Resultados obtidos com os extratos 2015 para a bactéria <i>Salmonella bongori</i> | 27 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima dos extratos etanólicos de própolis EEP (CIM) | 24 |
| Tabela 2 Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos etanólicos de própolis – coleta 2013..... | 29 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 13 |
| 2.1 A ABELHA <i>APIS MELLIFERA</i> | 13 |
| 2.2 A PRÓPOLIS..... | 14 |
| 2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 16 |
| 2.4 FORMAS DE DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS | 19 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS | 20 |
| 3.2 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS..... | 21 |
| 3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)..... | 22 |
| 3.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 22 |
| 3.3.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM) | 23 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 24 |
| 4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)..... | 24 |
| 4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 24 |
| 4.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM) | 28 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 30 |

1 INTRODUÇÃO

O uso da própolis vem sendo registrado desde a antiguidade pelas civilizações inca, romana, grega e egípcia (BACAXIXI et al., 2011) devido as suas propriedades antibacteriana, antifúngica e antioxidante (SILVA et al., 2013). O termo própolis tem sua origem nas palavras gregas *pro* (em defesa) e *polis* (cidade) (INOUE et al., 2007). Na colmeia, esse material, que é formado por flores, pólen, galhos, brotos e exsudados de árvores e secreções salivares das abelhas, tem função de proteção tanto contra agentes externos e fechamento de aberturas quanto no isolamento térmico e desinfecção do ambiente interno da colmeia (NETO et al., 2002; LONGHINI et al., 2007).

Embora a composição química da própolis, e por consequência suas características farmacológicas, variem de acordo com as condições climáticas e de vegetação da região onde a colmeia é formada (PORTILHO et al., 2013), sabe-se que a mesma consiste basicamente em resinas, ceras, vitaminas, sais minerais, compostos fenólicos, ácidos graxos, álcoois aromáticos, ésteres e compostos voláteis, alterando-se suas proporções. (PINTO et al., 2001; SILVA et al., 2006). Dentre essas substâncias destacam-se os compostos fenólicos, compostos de grande interesse biológico, indicados como responsáveis pelo desempenho antimicrobiano e antioxidante da própolis (SILVA et al., 2006; FUNARI e FERRO, 2006).

Os produtos gerados pela abelha *Apis mellifera* vêm sendo amplamente estudados em virtude da importância desses compostos na economia de determinadas regiões do país, uma vez que o Brasil desempenha papel importante na produção de distintas variedades de mel (BACAXIXI et al., 2011) e própolis - usualmente comercializada na forma de seu extrato alcoólico. Por conseguinte, relevantes pesquisas no melhoramento desse produto têm sido efetuadas quanto a genética das abelhas produtoras, visto que o peso da abelha rainha é fator determinante na produção de mel (SILVA et al., 2013; FERNANDES JÚNIOR, 2006).

A atividade antimicrobiana vem sendo determinada em diversos tipos de própolis em diferentes regiões do Brasil. Sendo a própolis responsável pelo ambiente asséptico da colmeia, espera-se desta alguma atividade frente a microrganismos.

Deste modo, este trabalho teve como objetivo analisar a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos da própolis produzidas por abelhas *Apis*

mellifera selecionadas contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A ABELHA *Apis mellifera*

Embora se estima que mais de 40 mil espécies de abelhas ainda não foram identificadas, 20 mil espécies de abelhas são conhecidas. Destacando-se destas, cerca de 2% foram identificadas como produtoras de mel, entre elas a *Apis mellifera*, que vem despertando interesse de pesquisadores nas últimas décadas. A abelha *Apis mellifera* encontrada no Brasil é um híbrido proveniente da abelha africana, *Apis mellifera scutellata* que acidentalmente cruzou com as abelhas oriundas da Europa, como a *Apis mellifera caucásica*, a *Apis mellifera ligustica* e a *Apis mellifera carnica* (CARPES, 2008; OLDONI, 2007).

Entre as características que a abelha africanizada traz encontram-se a tolerância a doenças, a adaptação a climas frios e a alta produtividade, inclusive durante as temporadas de inverno. Contudo, este híbrido herda algumas características agressivas das abelhas africanas, mais difíceis de lidar do que as espécies europeias, exigindo ao apicultor maior cuidado e proteção no manejo das colmeias (EMBRAPA, 2003).

Sendo a abelha africana de maior produtividade, a introdução da mesma nos apiários brasileiros acarretou em relevante aumento da produção de mel, pólen e geleia real, além de auxiliar na polinização de culturas como maçã, pera, café e frutas cítricas, introduzindo a apicultura a produtores de todo o país (MELLO, SILVA e NATAL, 2003). Outro produto sintetizado pelas abelhas é a própolis, que possui significativo valor comercial agregado e também produzido em maior quantidade pelas abelhas africanizadas quando comparada à produção das abelhas europeias (MANRIQUE e SOARES, 2002).

2.2 A PRÓPOLIS

Os produtos medicinais de origem natural vêm sendo utilizados pelo homem desde os primórdios da civilização, como auxiliares no tratamento e curas de diversas doenças (BARBOSA et al, 2009). Com o desenvolvimento da medicina e o aprimoramento das ciências modernas, estes compostos de origem natural passaram a ser estudados profundamente e suas atividades foram descobertas, bem como, seus possíveis usos foram sendo desmitificados e empregados cada vez mais seguramente no cotidiano dos consultórios médicos, possibilitando então a produção de compostos ativos de plantas em laboratórios, acompanhando a demanda crescente exigida pelo aumento constante da população (VARGAS et al., 2004).

Embora a maioria dos produtos utilizados na medicina seja produzida por laboratórios de alto nível científico, atualmente existe grande interesse em tratamentos com produtos naturais (PACKER e LUZ, 2007; RUAS, 2010; VARGAS et al., 2004). Esses produtos podem ser encontrados tanto em farmácias de grandes centros, quanto em feiras livres de cidades menores e até mesmo em pequenos vilarejos. Os produtos como chás, gargarejos, compressas, pomadas, infusões para banhos entre outros são alguns exemplos de aproveitamento de componentes oriundos da natureza como plantas e a própolis (NETO et al., 2002).

A própolis consiste em um material resinoso de coloração variada entre amarelo-esverdeado ao negro (INOUE et al., 2007) coletada por abelhas de diversas espécies, entre elas a *Apis mellifera*, a partir de exsudados de árvores, brotos e flores e os adiciona ao pólen e secreções salivares (PORTILHO et al., 2013; SILVA et al, 2013). Seu emprego vem sendo registrado desde os tempos de civilizações antigas como os gregos e romanos, que a utilizavam como cicatrizante, e os egípcios, que empregavam a própolis no embalsamento dos mortos (FUNARI e FERRO, 2006).

As abelhas utilizam a própolis como meio de proteção, tanto de agentes externos como insetos e no fechamento de aberturas na colmeia para proteger a mesma do frio e calor excessivos, quanto de agentes internos, como no combate ao crescimento de micro-organismos através da desinfecção e do eventual revestimento de animais mortos que não podem ser retirados de seu interior (FERNANDES JUNIOR et al., 2006; MARCUCCI, 1996). Deste modo, a própolis proporciona a colmeia um ambiente asséptico, protegido e de temperatura suportável (FUNARI e FERRO, 2006).

Devido a diversidade da flora e variações climáticas entre as regiões do vasto território brasileiro, a própolis produzida no Brasil foi classificada em 13 grupos distintos, de acordo com as suas características e atividades biológicas, provenientes das diferenças na sua composição química (ALENCAR et al., 2009).

A composição química e a coloração da própolis variam de acordo com a vegetação e clima do ambiente onde a colmeia está localizada (PORTILHO et al., 2013), além da espécie que a produz também interferir nas suas propriedades (BARBOSA et al., 2009; NETO et al., 2008). Contudo, sabe-se que a mesma é formada geralmente por resinas, ceras, ésteres, ácidos graxos, aldeídos, aromáticos, compostos fenólicos, minerais, açúcares e vitaminas (PINTO et al., 2001), componentes que agregam a própolis atividades de grande interesse farmacológico, como antioxidante, antibacteriana e antifúngica (ALENCAR et al., 2009; OLDONI, 2007; PINTO et al., 2001).

Na indústria farmacêutica, a própolis vem sendo largamente utilizada no preparo de extratos etanólicos e usualmente comercializados como tal (PEREIRA, 2008). Já no que diz respeito a indústria de cosméticos, a própolis tem seu uso principal na formulação de creme dental, cremes cosméticos (antienvhecimento) (SOUZA e GONÇALVES, 2008), sabonetes e outros cosméticos com ação antimicrobiana. No que se diz respeito ao uso na indústria de alimentos, a própolis é largamente utilizada como aditivo antioxidante de produtos de origem animal (SANTOS et al., 2003) e vegetal (PEREIRA, 2008), além do uso como antimicrobiano em ração animal (FREITAS et al., 2009).

De acordo com PEREIRA (2008), para que a própolis possa ser utilizada na formulação de alimentos, esta deve estar na forma de extrato para garantir que seus componentes sejam digeríveis. A autora afirma ainda que o teor de álcool no extrato deve ser baixo para garantir a qualidade do produto final, diferentemente da indústria farmacêutica.

Lacerda (2012) define antioxidante como uma substância que, mesmo presente em menor concentração do que os substratos oxidáveis, previne ou retarda a oxidação do mesmo. Portanto, sendo a oxidação importante processo na produção de radicais livres nos alimentos e organismos vivos, a presença de antioxidantes desativa os radicais livres, evitando mudanças indesejadas nos produtos alimentícios.

Muitos estudos vêm sendo realizados com a própolis na substituição de antioxidantes sintéticos como o BHA (butil-hidroxianisol), BHT (butil-hidroxitolueno),

TBHQ (terc-butil-hidroquinona) e PG (propil galato) pois pesquisas científicas apontam uma alta toxicidade destes aditivos alimentares (SOARES, 2002). Desta forma, a própolis também vem sendo utilizada na conservação de alimentos, substituindo outros compostos antioxidantes como o tocoferol (Vitamina E), betacaroteno (pró-vitamina A) e vitamina C (ácido ascórbico), também de origem natural, porém extraídos a partir do uso de solventes orgânicos mais eficientes e mais tóxicos, além do alto custo na separação. Além disso, o uso de aditivos naturais permite a redução do teor de nitritos adicionados aos produtos cárneos (ALVES, 2009).

Entre os principais grupos de antioxidantes estão os Compostos Fenólicos – constituídos por grupos benzênicos com hidroxila substituinte que age como antioxidante. Os compostos fenólicos são divididos em dois grupos principais: Ácidos Fenólicos e os Flavonóides. Os Flavonoides são responsáveis pela potente ação antioxidante da própolis e também estão relacionados à cor adquirida pela própolis, os mais comuns encontrados na própolis são a crisina, galanzina, ermanina, a quercetina e a isaspininina (SILVA et al, 2013; OLDONI, 2007).

Os Ácidos Fenólicos são mais abundantes na própolis brasileira do que os flavonoides, sendo também atribuídos a estes as propriedades antioxidantes da própolis (PINTO et al., 2001). Entre os ácidos fenólicos encontrados em amostras de própolis estão ácido gálico, vanílico e ferúlico (SILVA et al., 2013).

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Além dos compostos antioxidantes, a própolis é vista como importante agente antimicrobiano, sendo que estudos comprovam a influência da sazonalidade na própolis e suas características específicas variadas de acordo com a flora encontrada na região onde a colmeia se encontra (ROSALEN et al, 2007; SILVA et al, 2006).

A atividade antimicrobiana pode ser definida como a capacidade de uma substância que, uma vez adicionada ao meio em que determinado microrganismo se encontra, inibe ou inviabiliza o seu crescimento (PELISSARI, 2008).

De acordo com Mendonça (2011), é garantida à própolis a sua ação antimicrobiana, independentemente de sua origem, pois a mesma age na proteção e desinfecção da colmeia, garantindo um ambiente asséptico, na proteção contra fungos e bactérias.

As bactérias são organismos simples, unicelulares procariontes, autótrofas ou heterótrofas, aeróbias ou anaeróbias. São encontradas em todos os tipos de ambiente, desde que haja condições de umidade e temperatura para que a sua reprodução aconteça (BRASIL, 2004). Estes microrganismos podem ser divididos em gram-positivas e gram-negativas, de acordo com a estrutura da parede celular da célula bacteriana (BRASIL, 2004). Nas bactérias gram-positivas a parede celular é mais simples do que nas paredes celulares das bactérias gram-negativas, fazendo com que os antibióticos tenham acesso mais fácil ao interior da célula bacteriana, tornando as bactérias gram-negativas de maior dificuldade no controle de seu crescimento e, conseqüentemente, as infecções geradas por estes microrganismos (FERNANDES JR, 1995; PINTO et al, 2001).

Embora algumas espécies de bactérias sejam de grande importância industrial, outras são patogênicas a outros organismos vivos, inclusive ao ser humano, ocasionando infecções de diferentes níveis (PINTO et al.,2001). Por este motivo, faz-se necessário o desenvolvimento de materiais que possam inibir seu crescimento, contendo assim estas infecções.

Tratando-se da atividade antibacteriana da própolis, pesquisas utilizando distintos tipos de própolis indicam a ação mais eficiente de seus extratos quando frente a bactérias gram-positivas (como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus cereus*) do que quando comparadas com as gram-negativas (exemplos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Aerobacter aerogenes* e *Escherichia coli*) (FERNANDES JR et al, 2006; PINTO et al, 2001).

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

O uso prolongado de bactericidas sintéticos acarretou no aparecimento de bactérias mutantes mais resistentes a alguns medicamentos de uso mais comum, através da adaptação destes microrganismos a presença destes (PEREIRA et al.,2002). Deste modo, faz-se necessário a pesquisa constante de novos compostos

antimicrobianos (PEREIRA et al.,2002), tanto fármacos complexos como os de origem simples, como os extratos de plantas e própolis (VARGAS et al, 2004). Por conseguinte, com o desenvolvimento de novas metodologias de extração de vegetais e a formulação de novos fármacos, o estudo da atividade antimicrobiana de novos compostos é de suma importância no combate a doenças de origem microbiana.

A atividade antimicrobiana da própolis vem sendo largamente estudada através da avaliação da ação de seus extratos alcoólicos, aquosos e oleosos da mesma, variando o solvente de acordo com o uso específico do produto final.

De acordo com Rozatto (2012), um bom solvente na extração de compostos bioativos deve ser de baixa toxicidade, rápida absorção fisiológica do extrato e de fácil evaporação do solvente. Na extração de compostos bioativos de própolis pode-se alterar diversos parâmetros em função das diferentes metodologias empregadas atualmente, tais como a concentração do solvente, a temperatura e o tempo de extração (ESTEVINHO et al., 2012). Além disso, pode-se empregar diferentes métodos de extração dos compostos de interesse na própolis, tais como os métodos de maceração (PORTILHO et al., 2013), extração sólido líquido em Soxhlet (SILVA et al., 2013) e supercrítica (ANDREO e JORGE, 2006). Outro parâmetro que pode ser variado na preparação do extrato é o tipo de solvente utilizado, tais como hexano, clorofórmio, etanol, metanol e água (AGUIAR et al., 2008).

No que se diz respeito a temperatura, os extratos podem ser obtidos através de metodologias que empregam uso de temperatura ou que ocorrem a temperatura ambiente, (ANDREO e JORGE, 2006). A temperatura influencia nas taxas de difusão da amostra no solvente, bem como na solubilidade da mesma, tendo relevância significativa no processo de extração. Em temperaturas muito baixas, pode não ocorrer a completa extração dos compostos bioativos da amostra, já quando a temperatura ultrapassa determinado valor, pode acontecer a degradação desses compostos de interesse (OLDONI et al., 2015; ANDREO e JORGE, 2006).

Outro fator que também influencia nas condições de extração é o tempo de reação da mistura, pois quando este período é muito longo pode ocorrer a oxidação dos compostos de importância biológica do extrato ((OLDONI et al., 2015; ANDREO e JORGE, 2006).

A concentração do solvente interfere na solubilidade dos compostos de interesse contidos na amostra, fazendo-se necessária o estudo da solubilidade da amostra específica em cada concentração (LONGHINI, 2007).

Contudo, devido a variada composição da própolis e de acordo com a origem e o tipo da mesma, não há como apontar a metodologia mais eficiente pois, a extração pode ser influenciada por diversos fatores como, no caso da própolis, a origem da mesma e suas características químicas (ANDREO e JORGE, 2006).

2.4 FORMAS DE DETERMINAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS

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

Segundo Ostrosky et al. (2008), entre os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana de uma amostra estão os métodos de difusão em placas e de diluição em caldo. Os métodos de difusão em placas consistem em métodos de disco de papel filtro - onde é realizada a adição de discos de papel filtro embebidos de solução inibidora em placa de Petri contendo meio de cultura inoculado do microrganismo de estudo e posterior medida do halo de inibição formado (PORTILHO et al., 2013) - e o método de orifício em ágar, onde o crescimento do microrganismo pode ser observado através de um orifício no ágar acrescido de solução inibidora (PACKER, 2007; TRINDADE et al., 2007). Esses métodos são de fácil execução e reprodutíveis, mas limitam-se a microrganismos de crescimento rápido (ROZATTO, 2012).

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

Já o método de micro diluição em caldo, por sua vez, é de baixo custo e tem reprodutibilidade, além de ser considerado 30 vezes mais sensível que os outros métodos descritos (OSTROSKY et al., 2008; ROZATTO, 2012). Esta técnica utiliza

placas de 96 poços com volume entre 0,1 e 0,2 mL e permite a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através do uso de absorbâncias conhecidas ou reveladores como a resazurina - que se reduz em resazurina na presença de células de microrganismos vivos, perdendo a coloração azul intensa e passando por tons de violeta até a coloração rosa, de acordo com a concentração de células viáveis (ROZATTO, 2012). Na determinação da CIM, é considerado inibitória a concentração do extrato quando não há mudança na coloração azul da resazurina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de própolis foram cedidas pela professora Fabiana Martins Costa, UTFPR *câmpus* Dois Vizinhos. As mesmas foram coletadas por raspagem dos coletores instalados nas colméias de abelhas *Apis mellifera* nos anos de 2013 e 2015. A própolis (Figura 1) foi separada de materiais como folhas e animais mortos, para então ser congelada, moída com auxílio de nitrogênio líquido, pesada e armazenada em temperatura de -6 °C para o preparo dos extratos. A partir dos estudos de planejamento fatorial realizados por Oldoni et al. (2015), foi possível determinar as melhores condições de extração da amostra, sendo estas aplicadas ao estudo da atividade antimicrobiana do extrato obtido.



Figura 1 Amostra de própolis triturada.
Fonte: Oliveira e Andolfato (2014).

3.2 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS

Os extratos foram obtidos através da extração sólido-líquido e a melhor condição de extração foi determinada por meio do planejamento fatorial 2^3 . As variáveis independentes como temperatura, tempo e tipo de solvente foram analisadas e avaliadas em termos de teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante expressos em mg EAG (Equivalente em ácido gálico) e μmol de Trolox /g de própolis, respectivamente (OLDONI et al., 2015).

Deste modo, a melhor condição de extração definido para este trabalho foi o extrato de própolis obtido com 2 g de própolis, 15 mL de etanol 80%, e extraído durante 45 minutos na temperatura de 70 °C em banho de aquecimento. Após esta etapa o extrato bruto foi filtrado em papel de filtro e o sobrenadante armazenado sob refrigeração para posterior análises (Figura 2). Foram analisadas 4 amostras de extratos obtidos no ano de 2013 e 4 amostras de extratos obtidos em 2015.

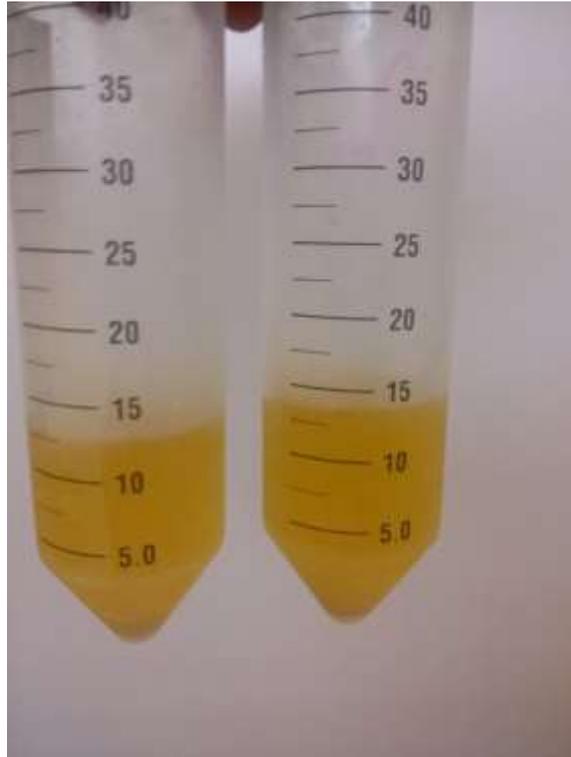


Figura 2 Aspecto do extrato etanólico de própolis obtido.
Fonte: autoria própria

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A atividade antibacteriana da própolis foi definida pelo método de microdiluição em microplacas descrito por Cabral (2008). A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de diluição em microplacas definido por Ostrosky et al. (2008) e Cabral (2008), que consistem na adição do microrganismo em estudo em meio de cultura adicionado de diversas concentrações do extrato etanólico de própolis.

O extrato etanólico de própolis teve sua concentração inibitória mínima determinada para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva e *Salmonella bongori*, bactéria gram-negativa, ambas patogênicas.

3.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM dos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella bongori* ATCC 43975 foi realizada em microplacas de 96 poços com concentrações de extratos etanólicos variados de 5 mg.mL⁻¹ a 0,16 mg.mL⁻¹. O meio de cultura utilizado foi o caldo BHI (Caldo infusão cérebro-coração).

Os microrganismos foram ativados a partir das células liofilizadas em caldo BHI por 24 horas, a temperatura de 37 °C e posteriormente repicadas em placas de ágar BHI por 24 horas, à 37 °C. Posteriormente, colônias individuais foram adicionadas com alça de platina à uma solução de NaCl 0,89% esterilizado, homogeneizadas em agitador tipo Vortex e a mistura foi ajustada em espectrofotômetro para o valor de absorbância de 0,135 a 660 nanômetros, que corresponde a 1-2 x 10⁸ UFC.mL⁻¹ na escala de Mc Farland. Foi inoculado o volume de 50 µL da suspensão em 50 mL de caldo BHI, obtendo-se a concentração de 1-2 x 10⁵ UFC.mL⁻¹.

Em cada poço da microplaca de análise, foram adicionados 190 µL de caldo BHI inoculado, e 10 µL dos extratos etanólicos nas variadas diluições. Os controles utilizados foram: a) meio de cultura inoculado, para avaliar o crescimento microbiano; b) meio de cultura inoculado e 10 µL de etanol 80% (v/v), utilizado na preparação dos extratos; c) meio de cultura inoculado e 10 µL de etanol 100%, para verificar o comportamento dos microrganismos frente ao etanol; d) meio de cultura inoculado e clorafenicol 0,12% (m/v), como controle positivo. Os extratos foram avaliados em triplicata. As microplacas foram dispostas em incubadora BioSan PST -60HL-4 por 24 horas a 37 °C.

3.3.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada a partir dos resultados positivos obtidos na CIM, utilizando-se placas de Petri contendo ágar BHI. Uma gota proveniente de cada poço com resultado positivo na microplaca foi inoculada na placa de Petri com o auxílio de um tubo capilar. As placas foram mantidas em estufa por 24 horas a 37 °C. A Concentração Bactericida Mínima foi considerada a menor concentração sem o crescimento bacteriano visível no ágar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

As concentrações dos extratos obtidos através da diluição seriada de razão 2 variaram de 5,00 mg.mL⁻¹ a 0,156 mg.mL⁻¹. Foi considerada a ausência de bactérias viáveis nos poços em que não houve mudança de cor do corante resazurina.

4.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram analisados os extratos de 2013 e 2015 frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori*. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos em triplicata da concentração inibitória mínima dos quatro extratos coletados em 2013, denominados A, B, C, D, e dos extratos coletados no ano de 2015, denominados E, F, G, H, respectivamente, para os dois microrganismos estudados.

Tabela 1- Concentração Inibitória Mínima dos extratos etanólicos de própolis EEP (CIM)

| EEP* | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Salmonella bongori</i> |
|------|------------------------------|---------------------------|
| A | > 5 | > 5 |
| B | > 5 | > 5 |
| C | 0,313 a 0,625 | > 5 |
| D | 1,250 a 2,500 | 2,500 a 5,000 |
| E | < 0,156 | 1,250 a 2,500 |
| F | > 5 | > 5 |
| G | 1,250 a 2,500 | > 5 |
| H | > 5 | > 5 |

* EEP: Extrato Etanólico de Própolis - Concentrações de 0,156 a 5 mg.mL⁻¹.

Os extratos A, B, F e H não apresentaram poder de inibição contra *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) nas concentrações testadas (0,156 a 5 mg/mL), sendo assim a CIM > 5 mg.mL⁻¹. Os extratos C, D, E e F inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* em concentrações entre 0,31 e 0,63 mg.mL⁻¹

entre 1,25 e 2,50 mg.mL⁻¹, menor que 0,156 mg.mL⁻¹ e entre 1,25 e 2,50 mg.mL⁻¹, respectivamente. Na análise com a *Salmonella bongori* (Gram-negativa), apenas os extratos D e E inibiram o crescimento do microrganismo, sendo a CIM entre 2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹ e entre 1,25 e 2,50 mg.mL⁻¹, respectivamente. Para os demais extratos, a CIM é considerada > 5 mg.mL⁻¹. As Figuras 3 e 4 apresentam o esquema utilizado na determinação da CIM para os extratos da coleta 2013 contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori*, respectivamente.

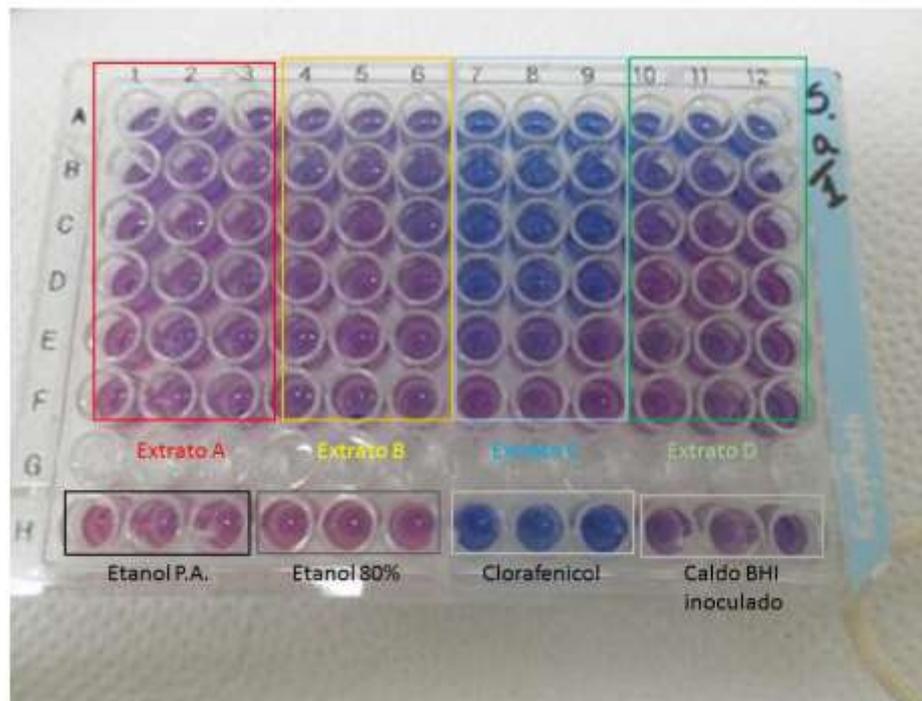
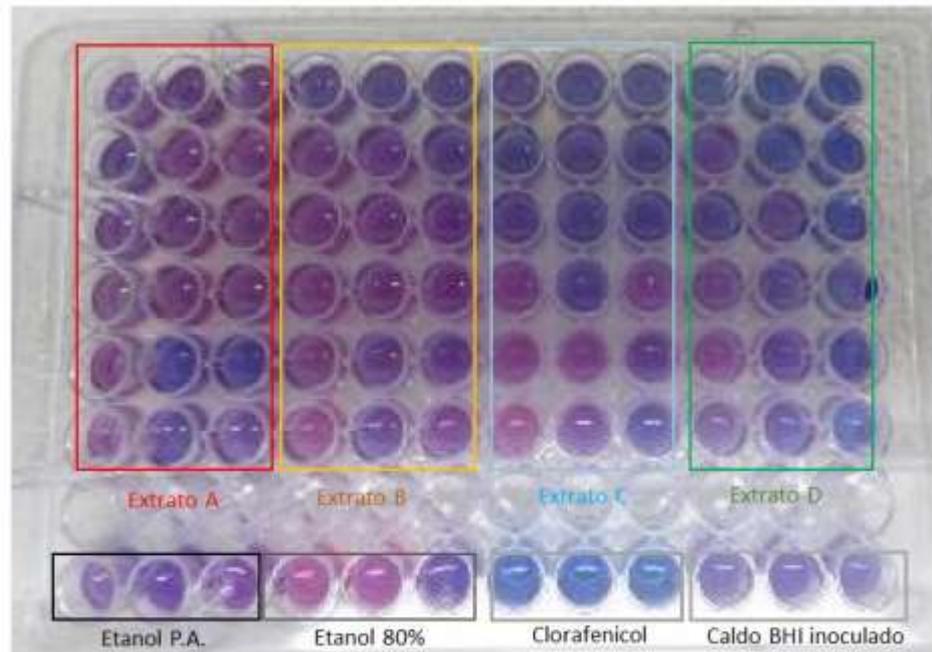


Figura 3 Resultados obtidos com os extratos 2013 para a bactéria *Staphylococcus aureus*.
Fonte: autoria própria.



**Figura 4 Resultados obtidos com os extratos 2013 para a bactéria *Salmonella bongori*.
Fonte: autoria própria.**

As Figuras 5 e 6 apresentam os resultados obtidos na determinação da CIM para os microrganismos *Staphylococcus aureus* (Figura 5) e *Salmonella bolgori* (Figura 6).

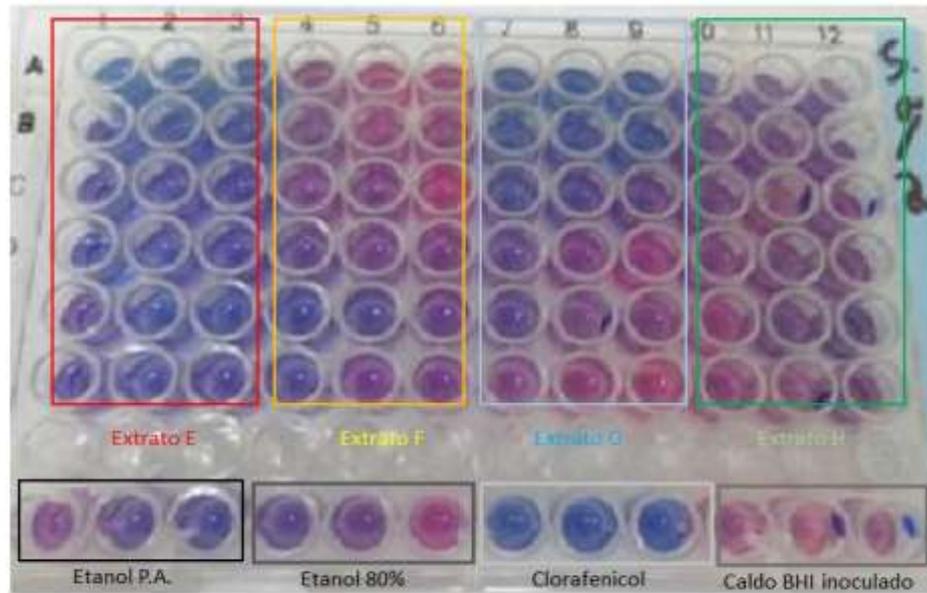


Figura 5 Resultados obtidos com os extratos 2015 para a bactéria *Staphylococcus aureus*.
Fonte: autoria própria.

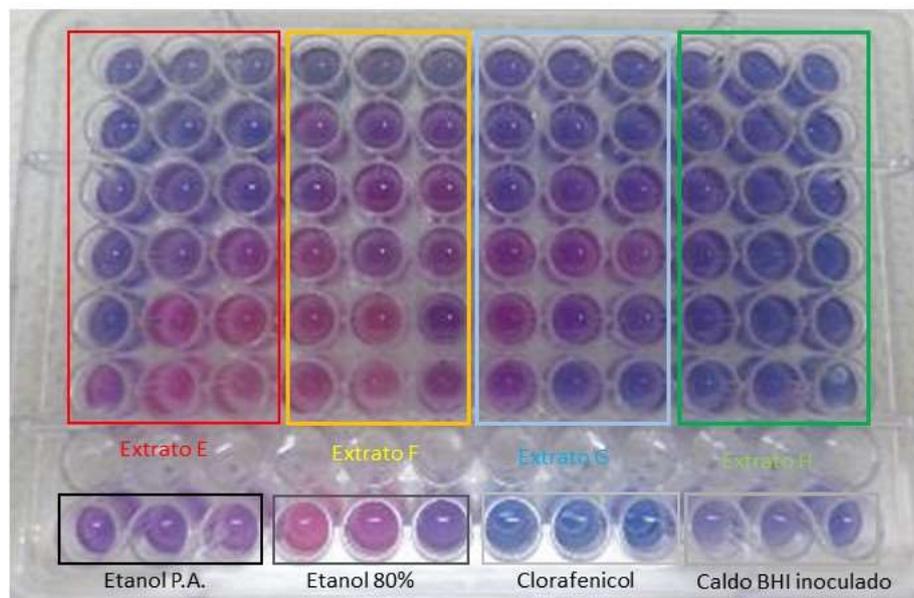


Figura 6 Resultados obtidos com os extratos 2015 para a bactéria *Salmonella bongori*.
Fonte: autoria própria.

Alencar et al. (2009) verificaram valores de CIM entre 0,63 e 1,25 mg.mL⁻¹ para o *Staphylococcus aureus*. Fernandes Júnior et al. (2006) verificaram maior sensibilidade das bactérias gram-positivas aos extratos etanólicos do que as bactérias Gram-negativas, resultado semelhante aos dados obtidos por Vargas et al. (2004), onde a porcentagem das bactérias gram-positivas sensíveis ao extrato de própolis foi significativamente maior comparado às gram-negativas. Os autores também atribuem a melhor ação da própolis contra as bactérias Gram-positivas à ação dos flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na resina que atuam na estrutura na parede celular através de mecanismos diferentes, sendo que as paredes celulares das bactérias Gram-negativas são mais complexas quimicamente, sendo constituídas de lipopolissacarídeos, que, segundo Vargas et al. (2004), determinam a toxicidade e patogenicidade das bactérias.

4.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Na determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), as suspensões provenientes das microplacas de 96 poços utilizadas na determinação da CIM foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar BHI. Foram considerados positivas as suspensões que não apresentaram o crescimento de células viáveis vistas na placa. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos na determinação da CBM para os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori*. Os extratos A, B, C e D foram obtidos a partir da própolis coletada em 2013 e mantidos sob refrigeração, enquanto que os extratos E, F, G e H foram produzidos a partir da própolis coletada em 2015.

De acordo com a Tabela 2, nenhum dos extratos foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* (Gram-Positiva), sendo considerada a CBM maior que 5,00 mg.mL⁻¹ para todos os extratos. O mesmo resultado foi obtido com o microrganismo *Salmonella bongori* (Gram-negativa), também sendo considerada a CBM maior que 5 mg.mL⁻¹.

Tabela 2 Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos etanólicos de própolis – coleta 2013.

| EEP* | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Salmonella bongori</i> |
|------|------------------------------|---------------------------|
| A | > 5 | > 5 |
| B | > 5 | > 5 |
| C | > 5 | > 5 |
| D | > 5 | > 5 |
| E | > 5 | > 5 |
| F | > 5 | > 5 |
| G | > 5 | > 5 |
| H | > 5 | > 5 |

* EEP: Extrato Etanólico de Própolis - Concentrações de 0,156 a 5 mg.mL⁻¹.

Alencar et al (2009) obtiveram resultados de CBM (2,5 e 5,0 mg.mL⁻¹) mais elevada quando comparada à CIM (0,625 e 1,25 mg.mL⁻¹), resultados semelhantes aos descritos por Cabral (2008). Os dois autores também descreveram maior sensibilidade dos microrganismos Gram-positivos aos extratos de própolis vermelha. Vargas et al. (2004) e Pinto et al. (2001) atribuem essa diferença de sensibilidade a parede celular do microrganismo, sendo a parede celular das bactérias Gram-negativas quimicamente mais complexa, devido a sua constituição lipídica mais abundante. Além disso, pode-se verificar maior poder de inibição dos extratos obtidos da coleta de 2015 do que nos extratos oriundos da coleta 2013 – armazenados sob refrigeração.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sendo esta própolis produzida por abelhas *Apis mellifera* que foram selecionadas para aumento na produção de mel e não sendo conhecido seu comportamento frente aos microrganismos, havia a necessidade de se estudar suas características antimicrobianas e compará-las com a própolis de abelhas não selecionadas.

Outro fator relevante na pesquisa, foi a utilização de extratos otimizados quanto a extração dos compostos bioativos. Além disso, pode-se concluir que as CIM e a CBM de alguns extratos foram mais eficientes do que os descritos em outros estudos encontrados na literatura, enquanto que outros não apresentaram inibição. Esse fenômeno deve-se aos diferentes tipos de própolis encontrados na região e nas diferentes estações do ano.

A partir dos resultados obtidos para a CIM e CBM dos extratos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella bongori* foi possível observar a estabilidade dos extratos de própolis mantidos sob refrigeração, embora menos eficientes do que os extratos 2015, alguns deles ainda continham poder de inibição frente aos microrganismos estudados.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, Severino M. de. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- ALVES, Elisângela. **Atividade Antioxidante de Extratos de Própolis Comercializados em Santa Maria – RS e Aplicação em Linguça Toscana Refrigerada**. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2009.
- ANDREO, Denise; JORGE, Neuza. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B.Ceppa**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- BRASIL, 2004. ANVISA. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo V. Brasil, 2004.
- BACAXIXI, Pamela et al. A importância da apicultura no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, São Paulo, n. 20, 2011.
- BARBOSA, Maria H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, Uberaba, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.
- CABRAL, I. S. R. **Isolamento e Identificação de Compostos com Atividade Antibacteriana da Própolis Vermelha Brasileira**. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2008.
- CARPES, Solange T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis Mellifera* I. da região sul do Brasil**. 2008. 249 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- CARPES, S. T.; CABRAL, I. S. R.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Caracterização do Potencial Antimicrobiano dos Extratos de Pólen Apícola da Região Sul do Brasil. **Revista Alimentos Nutrição**. v.20, n.2, p.271-277, 2009.
- EMBRAPA. **Produção de Mel**. Sistemas de produção, v. 3, jul. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>> Acesso em: 10 mar. 2015.
- ESTEVINHO, Leticia M.; DIAS, Luís G.; PEREIRA, Ana P. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4246–4253, 2012.

FERNANDES, Ary J., LOPES, Marcelo M. R., COLOMBARI, Viviani., MONTEIRO, Aydir C. M., VIEIRA, ELIANE P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis Mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Revista Ciência Rural**. v.36, n.1, p.294-297, 2006.

FERNANDES JUNIOR, A. SUGIZAKI, M. F., FOGO, M. L., FUNARI, S R. C., LOPES, C. A. M. In Vitro activity of Propolis against Bacterial and Yeast Pathogens Isolated from Human Infections. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. V. 1, n. 2. Botucatu, 1995.

FREITAS. J. A. de.; ANTONANGELO, R. P.; RIBERITO, J. L.; JOSLIN, M.; NOGUEIRA, S. R. P.; SOUZA, J. C. Extrato Etanólico de Própolis na Alimentação de Vacas Leiteiras. **Revista Brasileira de Saúde**. Prod. Ani. v.10, n.2, p. 333-343, 2009.

INOUE, Tiemi H. et al. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v. 15, n. 2, pg. 65-69, 2007.

LACERDA, Risia C. C. **Avaliação da composição química e atividade antioxidante da própolis de Apis Mellifera visando à preservação ambiental do ecossistema envolvido**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em ciências e tecnologia de alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012

LONGHINI, Renata, RAKSA, Sheila M., OLIVEIRA, Ana Carla P., SVIDZINSKI, Terezinha I. E., FRANCO, Selma L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v.17, n.3, p.388-395, 2007.

MANRIQUE, A. J.; SOARES, A. E. E. Início de um Programa de Seleção de Abelhas Africanizadas para a Melhoria na Produção de Própolis e seu Efeito na Produção de Mel. **Revista Interciência**. V.26, n.6, p. 312-316. Jun, 2002.

MELLO, H. S. H. de; SILVA, E. A. da; NATAL, D. Abelhas Africanizadas em Área Metropolitana do Brasil: Abrigos e Influências Climáticas. **Revista Saúde Pública**. V.37, n.2, p.237-241, 2003.

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

NETO, Francisco R. de A.; SEIXAS, Fernando R. M. S.; PEREIRA, Alberto S. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Revista Química Nova**. v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

OLDONI, T. L. C., OLIVEIRA, C., ALDOLFATO, S., KARLING, M., CALEGARI, M. A., SADO, R.Y., MAIA, F. M. C., ALENCAR, S. M., LIMA. V. A. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Processo of Bioactive Coumpounds from Propolis Produced by Selected Bees *Apis mellifera*. **Journal of Brazilian Chemistry. Society**. v.26, n.10, p.2054-2062. 2015.

OLDONI, Tatiane L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*. 2007. 104 f.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”. Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, Sheila C. de, ANDOLFATTO, Suelen. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) UTFPR. Pato Branco, 2014.

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

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

PELISSARI, Grace P. **Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melampodium divaricatum* (rich. in pers.) dc. (asteraceae). 2008. 176 f.** Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

PEREIRA, Eugenia C., FALCÃO, Emerson P. da S., SILVA, Nicácio H da., GUSMÃO, Norma B de., RIBEIRO, Sheyla M., HONDA, Neli K. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do Líquen *Heterodermia leucomela* (L.) **Poelt. ActaFarm Bonaerense.** v.21, n.1, p.43-49. 2002.

PEREIRA, D. A. **Extração Aquosa de Própolis e Secagem em Leite de Espuma para Uso em Alimentos. 2008.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, 2008.

PINTO, M. S., FARIA, J. E. DE., MESSAGE, D., CASSINI, S. T. A., PEREIRA, C. S., GIOSSO, M. M. Efeito de Extratos de Própolis Verde Sobre Bactérias Patogênicas Isoladas do Leite de Vacas com Mastite. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Ciência Animal.** V. 38, n.6. São Paulo, 2001.

PORTILHO, Débora R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC,** v. 6, n. 2, abr. 2013.

ROSALEN, P. L.; CASTRO, M. L.; ALENCAR, S. M., IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudoeste e do Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Revista Química Nova.** V.30, n.7, p. 1512-1516, 2007.

ROZATTO, Mariana R. **Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*.** Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. UNESP. Araraquara, 2012.

RUAS, Gabriele, W. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de lisozimas**. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, São Paulo, 2010.

SANTOS, A. V. dos; TEIXEIRA, A. S.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F.; GUIMARÃES, A. M.; GIACOMETTI, R. A. Valos Nutritivo do Resíduo de Própolis Para Frangos de Corte. **Revista Ciência Agrotecnológica**. v.27, n.5. 2003.

SILVA, Ellen C. C. da, MUNIZ, Magno P., NUNOMURA, Rita de C. S., NUNOMURA, Sergio M., ZILSE, Gislene A. C. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Revista Química Nova**, v.36, n. 5, p. 628-633. 2013.

SILVA, Rosilene A. da., RODRIGUES, Adriana E., RIBEIRO, Maria C. M., CUSTÓDIO, Angela R., ANDRADE, Norma, E. D. PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Revista Ciência Rural**. v.36, n.6, p.1842-1848. 2006.

SOARES, S. E. Áciso Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista Nutrição**. v.15, n.1. 2002.

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

TRINDADE, Rita, C., NASCIMENTO, Paula, F. C., NASCIMENTO, Analuiza C., RODRIGUES, Angelo R. A., SANTOS, Antonio M. B. J. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacologia**. n. 17, p. 108-113, 2007.

VARGAS, Agueda C. de, LOGUERCIO, Andrea P., WITT, Niura M., COSTA, Mateus M., Silva, Mariana S. e, VIANA, Luciane R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Revista Ciência Rural**. v.34, n.1, p.159-163. 2004.