



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS**

**ROGÉRIA MÔNICA SEIXAS XAVIER DE ABREU**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA  
PRÓPOLIS VERMELHA DO SEMIÁRIDO PARAIBANO SOBRE *PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA***

**POMBAL-PB  
2018**

**ROGÉRIA MÔNICA SEIXAS XAVIER DE ABREU**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA  
PRÓPOLIS VERMELHA DO SEMIÁRIDO PARAIBANO SOBRE *PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Pombal-PB, como parte integrante dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Sistemas Agroindustriais.

**Área de Concentração:** Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo

**Co-orientador:** Prof. D.Sc. Antônio Fernandes Filho

**POMBAL-PB  
2018**

CAMPUS DE POMBAL

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA DO SEMIÁRIDO PARAIBANO SOBRE *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M.Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 28 / 02 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.<sup>a</sup> D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo  
Orientadora

  
Prof. D.Sc. Antônio Fernandes Filho  
Coorientador

  
Prof. D.Sc. Everton Vieira da Silva  
Examinador Interno

  
Prof.<sup>a</sup> D.Sc. Maria de Carmo Andrade Duarte de Farias  
Examinadora Externa

Pombal - PB, 28 de fevereiro de 2018

Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos.

*Albert Einstein*

A minha inteira dedicação ao meu esposo Vanderi e aos meus filhos Assis neto, Gabriel e Maísa, apoiadores incondicionais de todos os meus projetos, por depositarem em mim toda esperança em dias melhores e a confiança que esse sonho se realizaria.

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, o grande filósofo da existência humana, aquele que sabe todas as coisas, está presente em minha vida em todos os momentos, trazendo-me força, abençoando-se e guiando-me.

Aos meus pais, que me criaram com todo cuidado, zelo e dedicação, são eles os responsáveis pelo meu caráter, pelos valores de respeito, honestidade e humildade que me foram repassados.

Aos meus irmãos Roseane, Marcionila e Francisco José, por acreditarem em mim, por toda força, amor e carinho em vários momentos desta caminhada.

Ao meu esposo Vanderi, por todo apoio na concretização desse sonho, por suportar as minhas ausências e o cansaço, por todo zelo e cuidado com os nossos filhos. Agradeço pelas meditações a mim proporcionadas durante todo esse tempo.

Aos meus filhos, razão da minha vida, motivos pelos quais luto diariamente, por compreenderem as minhas ausências, por fazerem parte de tudo que faz sentido para mim.

A minha orientadora professora Alfredina, pelos ensinamentos, pela disponibilidade em orientar-me. Muito obrigada professora!

Ao professor Antônio Fernandes, pelas orientações, por toda a preocupação no aperfeiçoamento deste trabalho. Foram muitos aprendizados de metodologia, estatística e na área do estudo de microbiologia. Obrigada pela disponibilidade de sempre, pela força, pela aquisição de todos os materiais necessários à pesquisa, pela sua amizade e conselhos.

Ao professor Luiz Jardelino, pela disposição, contribuições e condução do experimento.

Ao professor Cesário, coordenador do Laboratório de microbiologia do Centro de Formação de Professores pela acolhida e por seu modo educado de receber-me.

À professora Maria do Carmo, pelos ensinamentos, força, conselhos, amizade e por acreditar em mim. A sua forma de conduzir as pesquisas é a referência que quero levar para minha vida acadêmica. Muito obrigada professora!

À professora Marta Regina Kerntopf Mendonça, da Universidade Regional do Cariri, pela disposição em ajudar durante todo o processo de secagem do extrato. Muito obrigada professora!

À amiga Eliane Leite, pela ajuda na elaboração deste projeto. Por me ouvir todas as vezes que procurei. Obrigada Eliane por acreditar em mim, quando esse objetivo que concretizo hoje parecia tão distante.

A Andréia, amiga-irmã, companheira, serena, amiga de todas as horas. Mesmo sem dizer nada, sempre senti sua força e respeito por mim. Obrigada pela companhia nas viagens a Pombal, pelos bons momentos, risadas e alegrias compartilhadas.

A Michel, por sua disponibilidade, atenção, no laboratório de Microbiologia e em outros momentos. Com certeza você é um exemplo de resiliência e determinação. Admiro sua disposição em ajudar e sua persistência quando tudo parece difícil. Tenho certeza que ganhei um amigo.

A Marília, funcionária do laboratório de Microbiologia, por toda disponibilidade e ajuda durante a execução do experimento.

A Normando, secretário do mestrado, pela maneira de me tratar todas as vezes que o procurei. Muito obrigada!

Ao Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande, por todo apoio na realização desta pesquisa.

A Edvaldo, pela atenção e fornecimento da própolis vermelha bruta, utilizada na pesquisa.

ABREU, R. M. S. X. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha do semiárido paraibano sobre *pseudomonas aeruginosa*. Dissertação de Mestrado. (**Mestrado em Sistemas Agroindustriais**) - Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar. Universidade Federal de Capina Grande. Pombal - PB, 2018.

## RESUMO

A própolis vermelha é um produto resinoso popularmente consumido no Brasil, melhora a saúde e é considerado um nutraceutical. Sua origem botânica provém da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub, conhecida popularmente como rabo-de-bugio, encontrada nos mangues e costa do mar e dos rios, nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia, estados do Nordeste do Brasil. A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo não fermentador, gram-negativo, presente em diversos ambientes naturais, como no solo, na água, em frutas e vegetais. Possui elevada resistência a antibióticos, capaz de infectar insetos, animais e seres humanos, além de necessidade nutricional mínima. O objetivo geral foi avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha paraibana sobre a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853). E específicos, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da própolis vermelha; verificar a interação do extrato da própolis vermelha em associação com os antibióticos amicacina, benzilpenicilina, ciprofloxacino e oxacilina. O extrato hidroalcoólico da própolis foi diluído em Twim a 80% e água destilada estéril, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços. Para avaliar a atividade moduladora da ação dos antibióticos, utilizou-se a concentração subinibitória do extrato e os antibióticos em concentrações decrescentes, partindo de 1024µg/mL, diluídas sequencialmente até 16µg/mL. A análise estatística foi realizada utilizando o ANOVA. Os resultados dos testes mostraram que o extrato da própolis vermelha paraibana não possui atividade antimicrobiana clinicamente relevante para *P. aeruginosa* (ATCC27853), pois o valor do CIM foi  $\geq 1024$  µg/mL. Os antibióticos amicacina e ciprofloxacino demonstraram atividade antibacteriana contra essa cepa, enquanto que a benzilpenicilina e oxacilina demonstraram não possuir este tipo de ação. Não foi observado efeito sinérgico quando associamos o extrato aos antibióticos. Mediante o fato de o extrato não ter demonstrado ação antibacteriana sobre a referida cepa da *pseudomonas aeruginosa*, cujos motivos não foi possível relatar, sugere-se identificar os componentes químicos da própolis vermelha paraibana, pois pode apresentar variação em virtude da sazonalidade, período de coleta, origens geográficas diferentes, presença de contaminantes, entre outros.

**Palavras-chave:** Própolis vermelha, *pseudomonas aeruginosa*, extrato hidroalcoólico, resistência bacteriana.

## ABSTRACT

Red propolis is a resinous product popularly consumed in Brasil, improves health and is considered as a nutraceutical. Its botanical origin originates from *Dalbergia ecastophyllum* (L) Tau, popularly known as rabo-de-bugio, found in the mangroves and sea and rivers coast, in the States of Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia, states from Brazilian Northeast. *Pseudomonas aeruginosa* is a non-fermentative bacillus, gram negative, present in several natural environments, such as soil, water, fruits and vegetables. It has high resistance to antibiotics, capable of infecting insects, animals and humans, has minimal nutritional need. The general objective was to evaluate the antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of the parapolic red propolis on the *Pseudomonas aeruginosa* stumps (ATCC27853). E specific - to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the red propolis extract; To verify the interaction of the red propolis extract in combination with the antibiotics amikacin, benzylpenicillin, ciprofloxacin and oxacillin. The hydroalcoholic extract of propolis was diluted in Twim at 80% and sterile distilled water, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the 96-well plate microdilution method. To evaluate the modulating activity of the antibiotics the subinhibitory concentration of the extract and the antibiotics in decreasing concentrations were used, starting from 1024  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , diluted sequentially up to 16  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Statistical analysis was performed using ANOVA. The results of the tests showed that the extract of paraiban red propolis does not have clinically relevant antimicrobial activity for *P. aeruginosa* (ATCC27853), since the MIC value was  $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$ . The antibiotics amikacin and ciprofloxacin demonstrated antibacterial activity against this stump, whereas the benzylpenicillin and oxacillin demonstrated to lack this kind of action. No synergistic effect was found when associated with the antibiotic extract. Due the fact that the extract was not placed, the antibacterial action on the *pseudomonas aeruginosa* stump, it was not possible to report the motifs, it is suggested that the chemical components of the red propolis of Paraíba may present the origin of the seasonality, period of collection, different geographic origins, presence of contaminants, among others.

Key-words: Red propoli, *pseudomonas aeruginosa*, hydroalcoholic extract, Bacterial resistance.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Fatores de Virulência Associados a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
<b>Tabela 2:</b> Determinação da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) do extrato de própolis vermelha.....	35
<b>Tabela 3:</b> Determinação da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g}/\text{m}$ ) do extrato de própolis vermelha.....	36
<b>Tabela 4:</b> Esquema de distribuição dos antibióticos em modulação para <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853).....	41
<b>Tabela 5:</b> Esquema de distribuição dos antibióticos em modulação para <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853).....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Arvore filogenética da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
<b>Figura 2:</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; A) com células dispostas isoladamente ou aos pares; B) Envolta em material mucóide capsular em paciente com fibrose cística.....	14
<b>Figura 3:</b> <i>Dalbergia ecastophyllum</i> (L) Taub.....	25
<b>Figura 4:</b> Coleta da secreção resinosa avermelhada.....	25
<b>Figura 5 -</b> Mapa ilustrativo da região onde foi realizada a pesquisa.....	31
<b>Figura 6-</b> Amostra da Própolis vermelha bruta.....	31
<b>Figura 7-</b> Fluxograma da preparação do extrato da própolis vermelha.....	32
<b>Figura 8-</b> <i>Mini-spray dryer</i> MSDi 1.0.....	33
<b>Figura 9:</b> (A e B) Extrato da própolis vermelha em pó.....	33
<b>Figura 10-</b> Fluxograma da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
<b>Figura 11:</b> Fluxograma da atividade moduladora.....	36
<b>Figura 12:</b> Placa avaliada na CIM.....	38
<b>Figura 13:</b> Placa avaliada na CIM.....	38
<b>Figura 14:</b> Placa avaliada no processo de modulação.....	40
<b>Figura 15:</b> Placa avaliada no processo de modulação.....	41
<b>Figura 16:</b> Gráfico criado a partir da análise com o programa ANOVA.....	42

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de Variância, Inglês)

BHI – Brain Heart Infusion

C° - Celsius

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CE - Ceará

CFP – Centro de Formação de Professores

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CTI – Centro de Terapia Intensiva

DPOC – Depressão Pulmonar Obstrutiva Crônica

EEP – Extrato Etanoicos de Própolis

EER - Extrato Etanoicos da Resina da Planta

EPV – Extrato da Própolis de Vermelha

GI – Indicação Geográfica

HIA – Agar Heart Infusion

HVI – Human Immunologic Virus

ICS – Infecções da Corrente Sanguínea

IRAS – Infecções Relacionadas à assistência à Saúde

L/min – Litros por Minuto

m<sup>3</sup>/min – Metros cúbicos por Minuto

µg/ml – Microgramas por mililitros

ml - Microlitros

ml/h – Milímetros Cúbicos por Hora

MMC – Concentração Mínima Microbicida

PB – Paraíba

SENTRY - Antimicrobial Surveillance Program

SST<sub>3</sub> – Sistema de Secreção do Tipo três

UFC/ml – Unidade Formadora de Colônia

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

URCA – Universidade Regional do Cariri

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	13
2.1. Gênero <i>Pseudomonas</i> .....	13
2.2. Determinantes de virulência e componentes estruturais envolvidos na patogenicidade	15
2.3. Principais Infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e Fatores predisponentes .....	18
2.4. Tratamento e resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos antimicrobianos .....	18
2.5. Própolis .....	19
2.6. Própolis Vermelha e sua origem botânica .....	25
3.7. Atividade antimicrobiana da própolis vermelha .....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Tipo de Pesquisa .....	31
3.2. Local da Pesquisa.....	31
3.3. Obtenção do Material botânico .....	32
3.4. Preparação do Extrato .....	32
3.5. Atividade contra bactérias .....	34
3.5.1 Microrganismos.....	34
3.5.2 Antibióticos .....	34
3.5.3. Concentração Inibitória Mínima – CIM.....	35
3.6. Análise estatística .....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1. Rendimento do extrato da própolis vermelha .....	39
4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da própolis vermelha paraibana e dos antibióticos .....	39
4.3 Modulação .....	42
5 CONCLUSÃO.....	46
7 REFERÊNCIAS .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

Mencionada na literatura pela primeira vez em 1892, por Schroeter, a *Pseudomonas aeruginosa* foi chamada de *Bacterium aeruginosium*. A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo não fermentador, pertencente à família *Pseudomonadaceae* presente em diversos ambientes na natureza, tais como a água e o solo, além de frutas e vegetais e capaz de infectar plantas, insetos, animais e seres humanos (GOODERHAM; HANCOCK, 2009). Nesses, age como um patógeno oportunista, causador de infecções em diversos órgãos e tecidos, a exemplo de pele, pulmão, olhos, ouvidos, trato urinário, feridas e queimaduras (WILLIAMS et al., 2010, COOGAN; WOLFGANG, 2012).

As infecções hospitalares, atualmente chamadas de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), diz respeito a uma temática que continua evocando atenção no cenário mundial, enquanto um sério problema de saúde pública, demandando pelo controle, prevenção e tratamento das IRAS. Trata-se de um episódio, não somente biológico, mas histórico e social, que gera impacto direto na segurança da assistência à saúde e constitui um dos principais desafios mundiais para a qualidade dos cuidados em saúde (SILVA, 2008, OLIVEIRA; SILVA; LACERDA, 2016).

No Brasil existe uma crescente busca por novas alternativas que se explica devido a uma série de problemas relacionados à multirresistência, acarretada, na maioria dos casos, por meio do uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos, que levam à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (SILVA, 2008).

Neste contexto, o crescente aumento da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos tem restringido as alternativas de tratamento das infecções relacionadas à assistência à saúde nos hospitais brasileiros, fazendo com que medidas sejam tomadas para solucionar tais problemas, como: a busca de novos terapêuticos, ações preventivas e de erradicação devem ser desenvolvidas para controle do uso de antimicrobianos. Outra forma que tem sido proposta para amenizar tal problema é o desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência da *Pseudomonas aeruginosa* e continuidade dos estudos referentes ao desenvolvimento de novas drogas sintéticas e/ou naturais (NASCIMENTO et al., 2008).

Dentre os produtos naturais estudados, destaca-se a própolis, por apresentar ampla diversidade de compostos ativos (BARBOSA et al., 2010). A utilização da própolis é

ampla, podendo ser aplicada no fechamento de pequenas frechas como também para embalsamar insetos mortos e proteger a colmeia de invasores. Sua composição é um reflexo direto da flora onde as abelhas estão localizadas (CABRAL, 2008). Devido à diversidade da flora brasileira, as própolis do Brasil foram agrupadas em 12 grupos distintos, de acordo com a composição química e atividades biológicas (SILVA, 2008).

Um novo tipo de própolis, proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas, teve sua origem botânica identificada como *Dalbergia ecastaphyllum*, L. Taub, conhecida como rabo-de-bugio, uma espécie de leguminosa nativa dos manguezais alagoanos, na qual produz e exhibe seiva avermelhada (PORTILHO et al., 2013). Denominada de “própolis vermelha”, por causa da sua coloração vermelha intensa, foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira, demonstrando várias atividades biológicas em ensaios *in vitro* (ALENCAR et al., 2007).

Suas propriedades biológicas são atribuídas aos flavonoides e aos ácidos fenólicos, destacando-se as ações: anti-inflamatória, citotóxica, antiaterogênica, cicatrizante, regeneradora de tecido cartilaginoso e pulpar dental, antioxidante e antimicrobiana (CABRAL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2014). É necessário considerar que a própolis tem um baixo custo, por ser de fácil acesso à população, não existindo contraindicações quanto ao seu uso terapêutico, podendo apresentar atividade antibacteriana sobre a *Pseudomonas aeruginosa*.

Esse fato motivou-me para a realização desta pesquisa, além da própolis vermelha ser pouco conhecida e divulgada entre os profissionais da área da saúde. Apesar da relevância apresentada pela própolis, ainda não é acessível para muitos profissionais e, quando o serviço oferece, os mesmos não possuem habilidades técnicas para fazer o seu uso correto.

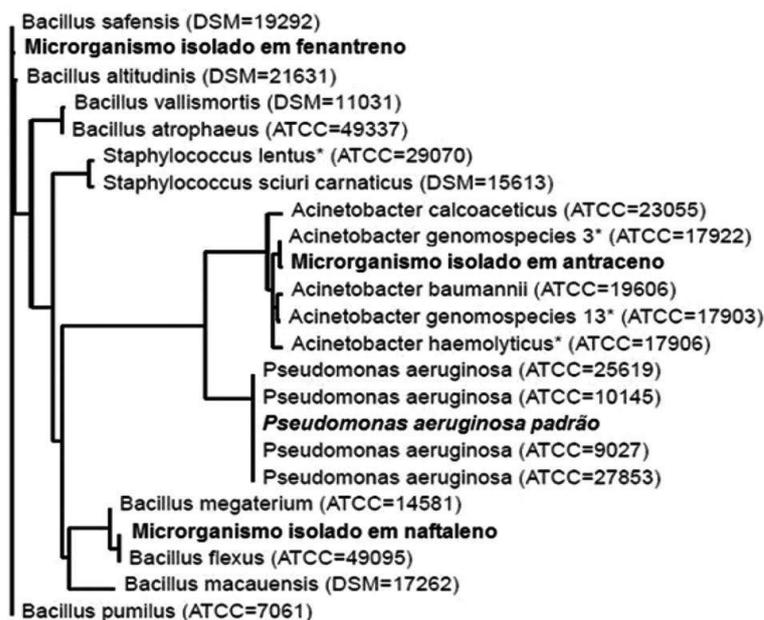
Nesse sentido, este estudo foi desenvolvido com os objetivos de avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; determinar a CIM do extrato da própolis vermelha frente a cepa de *P. aeruginosa*; verificar a ação do EPV isolado e em associação com os antibióticos amicacina, benzilpenicilina, ciprofloxacino e oxacilina.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Gênero *Pseudomonas*

O gênero *Pseudomonas* pertence à família *Pseudomonadaceae* (figura 1). A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo, presente em diversos ambientes naturais, como no solo, na água, em frutas e vegetais. É patogênico, com elevada resistência a antibióticos, sendo capaz de infectar insetos, animais e seres humanos (GOODERHAM; HANCOCK, 2009; COOGAN; WOLFGANG, 2012). Possui necessidade nutricional mínima, sendo capaz de utilizar muitos compostos orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio; consegue tolerar uma ampla variedade de temperatura (4°C a 42°C) e é resistente a maioria dos desinfetantes (SILVEIRA, 2014).

**Figura 1:** Árvore filogenética da *Pseudomonas aeruginosa*

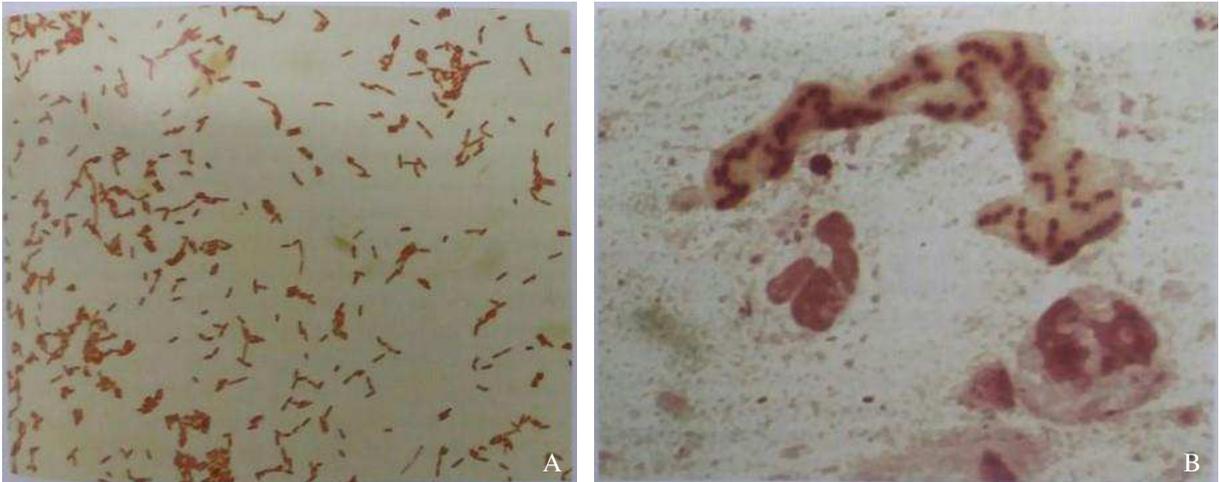


Fonte: PINHATI et al., (2014).

De fácil identificação laboratorial, a *Pseudomonas aeruginosa* cresce sem dificuldade em meios comuns de isolamento, como Agar sangue e MacConkey (figura 2. A e 2. B). Possui odor de uvas característico e produzem pigmentos hidrossolúveis, tais como, pioverdina (pigmento fluorescente também produzido por outras espécies de *Pseudomonas* pertencentes ao Grupo Fluorescente) e um pigmento azul característico, a piocianina. A

combinação destes dois pigmentos é responsável pela cor verde brilhante, característica patognomônica das colônias de *Pseudomonas aeruginosa* (KONEMAN et al., 2008).

**Figura 2:** *Pseudomonas aeruginosa*; A) com células dispostas isoladamente ou aos pares; B) Envolta em material mucóide capsular em paciente com fibrose cística



Fonte: MURRAY (2006)

No homem, comporta-se como microrganismo oportunista, agente de infecção de diferentes órgãos e tecidos, como pele, pulmão, trato respiratório, ouvidos, olhos, além de feridas e queimaduras (WILLIAMS et al., 2010). Em pesquisa do Programa Mundial de Vigilância sobre a resistência a antimicrobianos (SENTRY Antimicrobial Surveillance Program), realizado no período de 1997-2008, a *Pseudomonas aeruginosa* foi identificada como principal agente causador da pneumonia hospitalar na América Latina (JONES, 2010).

Parkins et al. (2010), ao estudarem as causas epidemiológicas das infecções da corrente sanguínea (ICS) por *Pseudomonas aeruginosa*, em uma região do Canadá no período de 2000 a 2006, evidenciaram que 45% dos casos foram de origem hospitalar, 34% obtidos em serviços de saúde e 21% de origem comunitária. Os pesquisadores observaram vários fatores de risco, dentre eles: sexo masculino, idade avançada, transplantados, neoplasias, cardiopatias, infecção pelo HIV, diabetes mellitus, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (PARKINS et al., 2010).

Segundo Martinez et al. (2008), apesar das infecções causadas por estes patógenos serem agudas, a *Pseudomonas aeruginosa* pode ocasionar infecções respiratórias crônicas, principalmente em pacientes com Fibrose Cística ou com DPOC. No ambiente hospitalar, as fontes de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* podem ser de procedência endógena ou exógena. A propagação desse microrganismo pode estar no trato respiratório, sobre o risco de

pacientes sob ventilação mecânica e transplantados de pulmão desenvolverem pneumonia (FREITAS, 2013).

Bonten et al. (1999), ao analisarem a ocorrência endêmica de *Pseudomonas aeruginosa* em um Centro de Terapia Intensiva (CTI), constataram que o trato intestinal foi a fonte endógena mais relevante para a posterior colonização do trato respiratório. Nestes casos, os patógenos chegaram às vias aéreas dos pacientes pela via gastropulmonar, através da colonização da pele e mãos de profissionais de saúde temporariamente colonizados. As fontes de contaminação exógenas foram equipamentos contaminados e outros pacientes colonizados. O uso de antimicrobianos proporciona uma vantagem para o crescimento seletivo da *Pseudomonas aeruginosa*, sendo considerado outro importante fator de risco para a colonização das vias aéreas de paciente (FREITAS, 2013).

No estudo de Ferrareze et al. (2007), foi avaliada a ocorrência de infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em pacientes hospitalizados em um hospital de emergências e, numa totalidade de 68 pacientes portadores de bactérias multirresistentes, 10 (14,7%) eram de *Pseudomonas aeruginosa*. Destes, 8 eram pacientes do sexo masculino, cujas médias de idade e de internação foram respectivamente de 57 anos; 43,7, foi a média de dias de internação e 7 pacientes morreram. Isolaram-se 8 cepas no sangue, cinco na urina, duas em cateteres venosos e uma no líquido, das quais sete sensíveis somente à polimixina e três ao imipenem.

## **2.2 Determinantes de virulência e componentes estruturais envolvidos na patogenicidade**

Vários determinantes de virulência estão envolvidos e participam da patogenia das infecções causadas por essa bactéria. Há os determinantes de virulência ligados à superfície bacteriana, como lipossacarídeo, pilus do tipo IV, proteínas da membrana externa, flagelos e o alginato, bem como fatores secretados pelos microrganismos, como as toxinas, elastases e outras proteases, fosfolipases, fenazinas, ramnolipídeos, siderofóros, exotoxina A e nitrito redutase, entre outros (LAU et al., 2005; SADIKOT et al., 2005; GOODERHAM et al., 2009; WILLIAMS et al., 2010; COOGAN; WOLFGANG, 2012; FREITAS, 2013).

O modo de interação da bactéria com o hospedeiro inicia-se com a adesão das formas livres do microrganismo, as formas planctônicas, as células do hospedeiro ou a superfícies inanimadas, como cateteres e próteses (LAU et al., 2005). Na superfície da bactéria, existe um componente chamado pilus que é responsável por sua adesão ao epitélio respiratório

(FREITAS, 2013). O flagelo fornece ao microrganismo motilidade e atividade cinética (SADIKOT et al., 2005). No entanto, os flagelos também foram identificados como adesinas para componentes diversos do trato respiratório (BUCIOR et al., 2012; FREITAS, 2013).

Segundo Plotkowski et al. (2001) e Freitas (2013), em um estudo *in vitro* foi apontado que proteínas da membrana externa de *Pseudomonas aeruginosa* possuem capacidade de aderir-se a moléculas das membranas de células do epitélio respiratório humano. Outro componente envolvido na patogenicidade da *Pseudomonas aeruginosa* é o alginato, um polímero de polissacarídeo que confere ao microrganismo uma aparência mucóide e funciona como mediador de aderência à mucina, além de promover resistência parcial a mecanismos de defesa do sistema imune inibindo a ligação de anticorpos, a fagocitose e a morte intracelular em leucócitos (JYOT et al., 2011; TRABULSI; ALBERTUM, 2015).

A produção de alginato favorece a durabilidade do microrganismo por longos períodos de tempo, pois impede o acesso de elementos da resposta imune do hospedeiro e de antimicrobianos (WILLIAMS et al., 2010). Essa síntese de alginato permite formar uma matriz hidrofóbica que ancora as bactérias a uma superfície colonizada, ocasionando microcolônias rodeadas de uma matriz exopolissacarídea, formando uma população bacteriana muito organizada chamada biofilme (TRABULSI; ALBERTUM, 2015).

Os biofilmes são encontrados nos ecossistemas naturais e patogênicos e possuem um importante papel em doenças infecciosas. Geralmente os micro-organismos estruturados em biofilmes são resistentes a vários estresses do ambiente, como a ação de agentes biocidas, antibióticos e a mecanismos de defesa humoral e celular do hospedeiro (COSTETON, 1999; DONLAN et al., 2002; JIANG et al., 2006).

A *Pseudomonas aeruginosa* tem a capacidade de adotar estratégias distintas em resposta à sua interação com o ambiente e o hospedeiro. O conhecimento das condições ambientais por meio das vias de sinalização, tais como: estado imune do hospedeiro, integridade dos tecidos, o estado nutricional e a presença de doenças de base como a Fibrose Cística, podem ajudar para o início de um processo infeccioso agudo ou crônico, pelo mesmo microrganismo (FURUKAWA et al., 2006).

A patogênese das infecções agudas inclui a produção de vários determinantes de virulência secretados conforme descrito na tabela 1, como por exemplo, toxinas, proteases, proteínas translocadas pelo sistema de secreção do tipo três (SST3) e ligados à superfície (pilus tipo IV, flagelo). Pouco invasivas e não citotóxicas, as infecções crônicas raramente resultam em disseminação hematogênica e sepse, além de envolverem a formação de biofilme que nas infecções em seres humanos propicia a resistência dos microrganismos aos

antimicrobianos e os protege contra a ação de elementos efetores do sistema imune do hospedeiro (COGGAN et al., 2012; FREITAS, 2013).

**Tabela 1:** Fatores de Virulência Associados a *Pseudomonas aeruginosa*

<b>Fatores de Virulência</b>	<b>Efeitos niológicos</b>
<b>Componentes Estruturais</b>	
Cápsula	Polissacarídeo mucoide, adesão, inibe ação dos antibióticos (p. ex. aminoglicosídeo), suprime a atividade dos neutrófilos e linfócitos.
Pili	Adesão
Lipossacarídeo	Atividade de endotoxina
Piocianina	Impede a função celular, aumenta a liberação de IL-8 levando ao estímulo da resposta inflamatória, medeia o dano tissular através da produção de radicais tóxicos de oxigênio (i. e. peróxido de hidrogênio, superóxido, radicais hidroxila).
<b>Toxinas e Enzimas</b>	
Exotoxina A	Inibe a síntese proteica, produz dano tissular (p. ex. córnea, pele), imunossupressor.
Exotoxina S	Inibe a síntese proteica, imunossupressor.
Citotoxina (leucocidina)	Citotóxico para membranas eucarióticas (p. ex. interfere na função leucocitária, produz dano microvascular pulmonar).
Elastase	Destruição dos tecidos que contém elastina (p. ex. vasos sanguíneos, tecido pulmonar, pele), colágeno, imunoglobulinas e fatores do complemento.
Protease alcalina	Destruição dos tecidos, inativação do INF e TNF- $\alpha$
Fosfolipase C	Hemosilina termolábil, mediador do dano tissular, estimula a resposta inflamatória.
Ramnolipideo	Hemolisina termo estável destrói tecidos que contém lecitina, inibe a atividade ciliar pulmonar.
<b>Resistência antibiótica</b>	Complica a terapia antimicrobiana

Fonte: MURRAY (2006)

### 2.3 Principais Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e Fatores predisponentes

A *Pseudomonas aeruginosa* causa uma série de infecções humanas. Dentre elas, pode-se citar as infecções do Trato Respiratório Inferior (pneumonias, infecção pulmonar crônica na fibrose cística); Trato Respiratório Superior (otite externa, sinusite, conjuntivite, etc.); Sistema Nervoso Central e bacteremia (meningites, abscesso cerebral, septicemia, endocardite); Trato urinário através de cateterismos, cirurgias, transplantes renais); Trato gastrointestinal (enterocolite necrosante, inflamação do seco); Infecções superficiais e tecidos moles (foliculite, celulite, necrose, gangrena) e Infecções ósseas e das articulares (osteomielite, osteocondrite) (BUCIOR et al., 2012; FREITAS, 2013; TRABULSI; ALBERTUM, 2015).

### 2.4 Tratamento e resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos

Dentre as dificuldades encontradas em tratar infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, está a grande resistência aos agentes antimicrobianos. Este fator é tão complexo quanto sua virulência. Além dos mecanismos de resistência intrínsecos e os adquiridos por mutação clássica, podem surgir outros por condições ambientais, chamados de resistência adaptativa (GOODERHAM; HANCOCK, 2009).

Durante muito tempo, a polimixina B e a colistina (polimixina E) foram os únicos antibióticos comercializados que apresentavam atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, porém o seu uso poderia causar nefrotoxicidade. Após algum tempo, ambos os fármacos foram substituídos por gentamicina e carbenicilina. No entanto, os promissores resultados duraram pouco tempo, pois ocorreu resistência também a essas drogas (TRABULSI; ALBERTUM, 2015).

Segundo Gooderham e Hancock (2009), vários agentes antimicrobianos com atividade *antipseudomonas* tem sido produzidos, incluindo as cefalosporinas de terceira geração (cefoperazona, ceftazidima), cefalosporinas, de quarta geração (cefepime e cefpiroma), penicilina de amplo espectro (ticarcilina, piperacilina), monobactâmicos (aztreonam), carbapenems (imipenem e meropenem) e fluoroquinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina). Atualmente, a ceftazidima é o B-lactâmico de referência, já dentre os aminoglicosídeos a amicacina tem apresentado a maior atividade. O uso de fluoroquinolonas tem sido limitado devido ao alto nível de resistência adquirida, por isso, recomenda-se nas infecções severas,

um tratamento sinérgico associando um B-lactâmico (como ceftazidima ou imipenem) com um aminoglicosídeo (geralmente amicacina, gentamicina ou tobramicina) (TRABULSI; ALTERTUM, 2015).

Em relação ao uso de produtos naturais como antimicrobianos, Freire, Alencar e Rosalen (2016) afirmam que a própolis vermelha tem um amplo espectro antimicrobiano em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O extrato etílico, a fração de clorofórmio e/ou alguns compostos isolados da própolis demonstraram uma notável ação antibacteriana contra microrganismos orais como *Actinomyces naeslundii*, bactérias cariogênicas do tipo, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e patógenos periodontais, a exemplo de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas* gengivais, *Prevotella intermedia*, como também contra microrganismos potencialmente envolvidos em infecções sistêmicas ou focais: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Para os pesquisadores, o mecanismo da atividade antimicrobiana da própolis é complexo e pode ser atribuída à presença de vários compostos bioativos, particularmente isoflavonoides.

Marcucci et al. (2001); Lu et al. (2005); Oliveira et al. (2006); Packer e Luz (2007), afirmam que a atividade antibacteriana de própolis brasileira, frente a bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*) e gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), existe. Porém, esta ação é maior quando comparada a gram-negativas.

## 2.5 Própolis

A apicultura é uma das poucas atividades agropecuárias que atende aos três requisitos da sustentabilidade: o econômico, o social e o ecológico. Sendo assim, fornece renda para o apicultor, ocupa mão-de-obra familiar ou contratada e contribui para a preservação da flora nativa, pois é dela que são extraídos o néctar e o pólen, componentes essenciais para a vida das colmeias (OLIVEIRA, 2015).

Diversos produtos são retirados da apicultura que são produzidos pelas abelhas para uso humano. Alguns são resultantes do processamento de materiais coletados na natureza, como o mel, a própolis e o pólen. Outros, porém, são resultados da produção glandular das abelhas como geleia real, cera e o veneno (OLIVEIRA, 2015).

A própolis tem sido utilizada como um produto terapêutico natural há mais de 5.000 anos, apresentando atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antissépticas, anticariogênicas, bactericidas, bacteriostáticas e cicatrizantes. Aristóteles (384 – 322 a.C)

recomendava o seu uso em tratamentos de abscessos, escoriações, e ainda soldados romanos carregavam esse produto como medicamento de emergência nos combates (COSTA; OLIVEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2012).

A palavra própolis é derivada do grego *pro* (em defesa) e *polis* (cidade ou comunidade), isto é, em defesa da comunidade (MARCCUCI, 1996; LUSTOSA et al., 2008). A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico. É produzida pelas abelhas a partir dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores e, além desses, na colmeia, as abelhas adicionam secreções salivares (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; GOMES et al., 2016). A flora disponível na localidade influencia diretamente no tipo, coloração e na quantidade produzida pelas abelhas. Existem ainda outros fatores que estão relacionados com a produção e qualidade da própolis como, localização do apiário, raça das abelhas, materiais utilizados, densidade da colmeia e época do ano (COSTA; OLIVEIRA, 2005).

Mais de 300 compostos químicos já foram identificados na própolis de diversas regiões do mundo, dentre os quais: ácidos graxos e fenólicos, ésteres, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, di-hidroflavonóis, etc.), terpenos, esteroides, aldeídos e ácidos aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno, numa tentativa de se identificar substâncias com poderes medicinais (MARCUCCI et al., 2001; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO, 2002; LEMOS JÚNIOR; LEMOS, 2013).

Segundo Couto e Couto (2002), a coloração e composição da própolis modificam-se conforme a origem do material utilizado como matéria prima, podendo variar entre amarela, parda, vermelho escuro, verde limão, cinza esverdeado e café. A composição da própolis é complexa e consiste basicamente de 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera (ácidos graxos), 10% de óleos voláteis e 5% de pólen e material orgânico entre outros. Os flavonoides e o ácido cafeico são os principais responsáveis pelo poder antibiótico da resina.

As abelhas utilizam essa resina para proteger a colmeia contra a invasão e proliferação de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, como também para regular a temperatura interna em torno de 35°C; embalsamar invasores (insetos) mortos que não possam ser retirados evitando sua decomposição; impermeabilizar as paredes dos favos com fins antissépticos, isolando a colmeia de tudo que possa comprometer a sobrevivência da colônia (BISPO JUNIOR et al., 2012).

No mundo, o consumo da própolis é estimado em cerca de 700-800 toneladas/ ano, e o Brasil é o segundo maior produtor mundial, logo atrás da China. Existe cerca de noventa produtos à base de própolis disponíveis no mercado para consumo. Vão desde a indústria

farmacêutica à cosmética (dentre eles, cápsulas, condicionador, xampu, sabonete, dentifrício, batom, bala, chá, protetor solar, gel pós-barba, creme, pomada, enxaguatório bucal, etc.) (BEZERRA, 2015).

A própolis brasileira tem sido amplamente estudada para elucidar suas várias propriedades biológicas (PARK et al., 2002). Utilizada como um importante fitoterápico devido aos estudos que revelaram seu potencial antibacteriano, anti-inflamatório, antiviral, antifúngico e imunomodulatório (GOMES et al., 2016). Também, apresenta propriedades farmacoterapêuticas que a coloca como possível alternativa ao uso dos antibióticos. No entanto, há necessidade de uma padronização das doses e dos extratos (COELHO et al., 2010). A mais popular e mais estudada é a própolis verde que tem origem da *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), amplamente distribuídas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, nos estados de São Paulo e Minas Gerais (PARK et al., 2002; ARAÚJO 2014).

Em relação às características farmacológicas da própolis, vários estudos nacionais e internacionais confirmam a diversidade de atividades biológicas da própolis e, dentre elas, a antimicrobiana. A ação bacteriostática e bactericida *in vitro* dos extratos de própolis tem sido testada em diferentes linhagens de bactérias (SOARES et al., 2017). Os trabalhos apontam para uma relevante atividade da própolis, principalmente contra bactérias Gram-positivas e ação limitada contra Gram-negativas (MARCUCCI et al., 2001).

Miyares et al. (1988) realizaram um estudo clínico com extrato de própolis *versus* tinidazol que foi feito para demonstrar sua efetividade contra giardíase em 48 crianças e 90 adultos, em dois grupos selecionados aleatoriamente. A própolis foi usada com concentração menor em crianças (10%) e, quando a concentração foi elevada a 30% nos restantes 50 pacientes, houve maior efetividade (60% de cura *versus* 40% com tinidazol) quanto aos resultados.

Um estudo polonês de Szymeja et al. (1989) avaliou a própolis em infecções gripais comuns em 50 pessoas durante o ano de 1987. No grupo experimental, a regressão dos sintomas ocorreu no primeiro dia de tratamento. A recuperação completa deste grupo deu-se em 1 dia (5 pacientes), em 2 dias (16 pacientes) e em 3 dias (3 pacientes). O grupo placebo teve sua plena recuperação em média em 4,8 dias. No grupo própolis, os sintomas duraram 2,5 menos tempo que no grupo controle.

Grange e Davey (1990) realizaram um estudo experimental com própolis, em ágar nutriente que demonstrou inibição completa do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus*. Inibiu parcialmente o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Em *Klebsiella pneumoniae* não houve efeito. Verificou-se ter efeito inibitório preferencial sobre cocos Gram-positivos. Os achados de Grange, Davey (1990) estão na mesma direção dos resultados de MARCUCCI et al. (2001), apontando uma relevante atividade da própolis, principalmente contra bactérias Gram-positivas e ação limitada contra Gram-negativas.

No estudo de Magro-Filho e Carvalho (1994), foram analisados os efeitos de própolis na boca no processo de reparação de feridas cirúrgicas após sulcoplastia pela técnica Kazanjian modificada. Vinte e sete pacientes que foram submetidos à sulcoplastia foram divididos em três grupos: pacientes que não usaram o bochecho, pacientes que usaram bochecho contendo 5% de álcool e pacientes que usaram bochecho contendo própolis em solução aquosa de 5% de álcool. Os pacientes retornaram, respectivamente, em 7, 14, 30 e 45 dias após a cirurgia para avaliação citológica e clínica. Foi concluído que a solução para bochecho contendo própolis repara feridas cirúrgicas intrabucais, exerce efeito analgésico e anti-inflamatório pequeno; e que o veículo utilizado tem menor efeito irritante sobre as feridas cirúrgicas intrabucais.

Santana et al. (1995), em estudo prospectivo em mulheres com cervicite aguda e com esfregaço vaginal positivo para algum tipo de infecção, no qual as pacientes foram randomizadas, o grupo experimental recebeu topicamente própolis a 5% e o grupo controle solução de lugol por 10 dias consecutivos. Verificou-se que todas as pacientes do grupo experimental não apresentaram quaisquer sintomas após o tratamento, 100% dos esfregaços vaginais foram negativos e 90% das pacientes atingiram epitelização total do colo do útero em 10 dias de tratamento.

Na pesquisa de Crisan et al. (1995), foi utilizada a metodologia caso-controle em pré-escolares e escolares e observaram o efeito da própolis na inflamação aguda e crônica das vias aéreas superiores, durante toda a temporada fria de 1994-1995. O monitoramento dos subgrupos investigados foi realizado por observação clínica do estado de saúde e dos sintomas característicos de doenças rinofaríngea aguda ou crônica, bem como por exame laboratorial periódico para a detecção e caracterização viral, bacteriana ou fúngica e do transporte de germes. Os resultados obtidos mostraram efeitos favoráveis desse tratamento local, com redução dos sintomas agudos ou crônicos e diminuição ou supressão da flora viral-microbiana das vias aéreas superiores.

Murray e Worthington, Blinkhorn (1997), em estudo duplo- cego, investigaram a eficácia de solução contendo própolis para bochecho na inibição da formação de placa dentária, comparando com clorexidina e placebo. A clorexidina foi significativamente melhor

que os outros na inibição da placa, enquanto a própolis foi marginalmente melhor que o placebo, mas essa diferença não foi significativa.

Vynograd et al. (2000) compararam a eficácia da pomada de própolis contendo naturais flavonoides com pomadas de aciclovir e placebo. Foram incluídos noventa homens e mulheres com infecções recorrentes de herpes genital tipo II. Trinta indivíduos foram randomizados para cada grupo. O tratamento foi iniciado na fase de bolha. Os participantes foram examinados nos dias 3, 7 e 10 de tratamento, por médicos de 7 diferentes centros. Em cada exame, as lesões foram classificadas em quatro etapas: vesiculares, ulceradas, com crosta e curadas. No 10<sup>o</sup> dia, 24 dos 30 indivíduos do grupo de própolis tinham se curado; no grupo de aciclovir, 14, de 30 pacientes; e, no grupo de placebo, 12 de 30 foram considerados curados ( $P = 0,0015$ ). O processo de cicatrização foi mais rápido no grupo da própolis.

Chen et al. (2004) realizaram na China um estudo experimental cujo objetivo foi testar o efeito apoptótico em células de melanoma humano de seis substâncias extraídas da própolis, chamadas propolinas A, B, C, D, E e F. O tratamento de células de melanoma humano com esses extratos de própolis, durante 24 horas, induziu alterações morfológicas celulares, tais como condensação da cromatina do núcleo e encolhimento celular. Deduziram que as alterações morfológicas celulares são provocadas por apoptose celular.

De acordo com Ota et al., (2011), a atividade antifúngica dos extratos etanoicos da própolis (EEP) de amostras de própolis coletadas em São Paulo foi verificada em 80 cepas de levedura de *Candida*, estando entre elas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, resultando em maior suscetibilidade a *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

A própolis também tem sido utilizada na Medicina Veterinária. Souza, Fischer e Vargas (2013), em revisão realizada na literatura, descreveram estudos realizados sobre a função antimicrobiana da própolis em microrganismos de interesse veterinário. Nos estudos foram analisadas as atividades: antiviral, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária. Os resultados mostraram que a ação antimicrobiana, *in vitro*, assim como a composição de própolis obtida de diferentes regiões, vêm sendo pesquisadas contra diversos agentes de interesse humano e veterinário.

Além disso, a própolis demonstrou efeito contra vários agentes de interesse veterinário *in vitro*, sendo esse efeito dose dependente. Porém, poucos estudos *in vivo* foram desenvolvidos, restando uma grande lacuna a ser preenchida, não somente em relação a outras espécies como também em relação a outras vias de administração.

Outro estudo na área da medicina veterinária foi realizado por Gomes et al. (2016), no qual foi avaliada a atividade antibacteriana do extrato alcoólico da própolis marrom sobre isolados de bactérias Gram-positivas: *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., e isolados de bactérias Gram-negativas: *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. e *Serratia rubidaea* provenientes de processos clínicos infecciosos de animais domésticos, obtidas e armazenadas no Laboratório de Bacteriologia da FAMEZ/UFMS. O extrato de própolis marrom apresentou atividade antimicrobiana com concentração inibitória mínima (CIM), variando de 2,25 a 18,9mg/mL para as bactérias Gram-positivas e 4,5 a 18,9mg/mL para as bactérias Gram-negativas, sendo as bactérias provenientes de bovinos e caninos as mais resistentes. O estudo conclui que a própolis marrom tem ação bactericida, em função da espécie da bactéria e da procedência animal.

Outro tipo de aplicação da própolis tem sido na odontologia. Dessa forma, Stefanello, et al. (2017) avaliaram os efeitos de soluções naturais na formação do biofilme e na prevenção da desmineralização dos dentes. Assim, o estudo piloto, *in situ*, foi realizado com 12 voluntários que utilizaram dispositivos de acrílico removível, contendo 4 blocos de dente cada. A amostra foi dividida em quatro grupos, com três indivíduos em cada grupo, os quais testaram as seguintes soluções: soro fisiológico (Grupo 1), clorexidina 0,12% (Grupo 2), óleo de melaleuca 0,2% (Grupo 3) e extrato de própolis 30% (Grupo 4).

Ao final de 14 dias o biofilme formado foi coletado e semeado em três meios de cultura diferentes, os blocos de dente foram pesados em balança de precisão e testados quanto à microdureza superficial. O crescimento bacteriano nos diferentes meios de cultura foi menor no grupo que utilizou a própolis como solução teste, comparado com as demais substâncias. No grupo que utilizou própolis houve uma tendência a ganho de peso, após o desafio cariogênico, com diferença significativa para os grupos que utilizaram soro fisiológico e clorexidina, que mostraram perda mineral. O óleo de melaleuca não se mostrou efetivo na inibição da formação do biofilme e teve pouca variabilidade nos níveis minerais, na concentração utilizada.

De acordo com Park et al. (2002), em países de clima temperado, são poucas as plantas que produzem a resina apícola, diferentemente do Brasil onde há uma vasta variedade delas. A própolis brasileira foi classificada em 13 tipos, de acordo com suas características físico-químicas e botânicas. Tem sido amplamente pesquisada, considerada a mais popular e mais estudada, porém, a própolis vermelha foi identificada recentemente, recebendo esse

nome por apresentar coloração vermelha intensa e por sua composição química diferir dos demais 12 tipos de própolis brasileiras (ARAÚJO, 2014).

## 2.6 Própolis Vermelha e sua origem botânica

A própolis vermelha é um produto resinoso popularmente consumido no Brasil, melhora a saúde e é considerado um nutraceutical (LOPES et al., 2015). Sua origem botânica provém da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub (Figura 3), conhecida popularmente como rabo-de-bugio, rabo-de-macaco, marmelo-do-mangue, marmeleiro-da-praia, moeda-de-vidreira, entre outros (ARESI, 2011). Uma planta pertencente à família Fabaceae que é considerada a segunda maior família de plantas medicinais. É encontrada nos mangues e costa do mar e dos rios, nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia, localizada no Nordeste do Brasil (DZOYEM et al., 2014; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). A própolis vermelha do estado de Alagoas obteve recentemente a Indicação geográfica (GI) pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), (LOPEZ et al., 2011).

**Figura 3:** *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub



Fonte: Ufrgs (2010)

Denominada de “própolis vermelha” por causa da sua coloração vermelha intensa, (Figura 4) foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira e tem evidenciado várias atividades biológicas em ensaios *in vitro* (ALENCAR et al., 2007). Cabral et al. (2009)

avaliaram extratos com polaridades crescentes obtidos em amostras de própolis vermelha oriundas do Estado de Alagoas. Os extratos etanoicos de própolis (EEP) e suas frações apresentaram forte atividade antioxidante e antibacteriana, estando relacionada com o conteúdo de polifenóis (FIANCO, 2014).

**Figura 4:** Coleta da secreção resinosa avermelhada



Fonte: Globo (2018)

Silva (2008), em estudo realizado, identificou a composição química e atividade biológica do extrato etanoico da própolis vermelha (EEP) e do extrato etanoico da resina da planta (EER). Os resultados demonstraram o mesmo perfil químico entre o EEP e o EER da planta *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., cuja característica foi a alta concentração relativa das isoflavonas 3-hidroxi-8, 9-dimetoxipterocarpin e medicarpina. A própolis vermelha apresenta em sua composição, entre outros compostos químicos, medicarpina, vestitol, isoliquiritigenina, formononetina e dadzeína (LOPEZ et al., 2011).

A própolis vermelha encontrada em diferentes regiões do mundo e diferentes locais geográficos pode diferir na composição química (LOPEZ, et al 2011). A própolis vermelha do Nordeste do Brasil (grupo 13) possui semelhança com a própolis de Cuba, em relação aos flavonóides presentes. Os compostos químicos encontrados na própolis de Cuba são: ácido gálico, isoliquiritigenina, (-)-liquiritigenina, formononetina, biochanina A, (3S)-vestitol, (3S)-7-O-metilvestitol, (3S)-7,4'-diidroxí-2'-metoxiisoflavana, (6aS,11aS)-medicarpina, (6aS,11aS)-homopterocarpina, (6aR,11aR)-vesticarpina, (6aR,11aR)-3,8-diidroxí-9-

metoxipterocarpana, (6aR,11aR)-3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpana, (6aR,11aR)-3,4-diidroxi-9-metoxipterocarpana. (PICCINELLI et al., 2005; DAUGSCH, 2007; MORAES, 2009, PICCINELLI et al., 2011; BEZERRA, 2015).

Os perfis químicos do EEP e do EER, obtidos ao longo do ano através dos testes químicos, apresentaram-se distintos dos perfis dos demais 12 tipos de própolis brasileiras já classificadas e variaram quantitativamente de acordo com a sazonalidade, tendo, ainda, uma potente ação biológica (BEZERRA et al., 2015; BATISTA et al., 2012; NUNES, 2009; ALENCAR et al., 2007; DAUGSCH et al., 2007). Produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera*, as propriedades biológicas da própolis vermelha são atribuídas aos flavonoides e aos ácidos fenólicos, destacando-se as ações: anti-inflamatória, citotóxica, antiestrogênica, cicatrizante, regeneradora de tecido cartilaginoso e pulpar dental, antioxidante, anticancerosa e antimicrobiana (SIQUEIRA et al., 2014; FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

A pesquisa de Frozza et al. (2013) foi pioneira ao abordar os principais compostos do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Sergipe, Nordeste do Brasil, além de sua atividade antioxidante e o efeito citotóxico contra células tumorais. O estudo indicou que a própolis vermelha é composta de moléculas complexas e exibe propriedades biológicas importantes com capacidade de eliminar radicais livres e inibir células tumorais em crescimento.

O neovestitol e vestitol, isolado a partir de própolis vermelha brasileira, inibiu a migração de neutrófilos no rato mostrando assim atividade anti-inflamatória (Bueno-Silva et al. 2013). Teles et al. (2015) avaliaram os efeitos da própolis vermelha no modelo de ablação renal 5/6 (NX). Ratos adultos foram submetidos à NX e, divididos em grupos não tratados (NX) e tratados (RP), (NX + RP), após 30 dias de cirurgia, os ratos apresentavam hipertensão e proteinúria e foram observados por 90 dias a partir do dia da cirurgia. A utilização da própolis vermelhas reduziu, pelo menos parcialmente, a hipertensão, a proteinúria e a retenção de creatinina do soro nos animais NX, bem como os danos glomerular e intersticial expansão. Estes resultados foram acompanhados de uma redução na infiltração de macrófagos e estresse oxidativo. Foi a primeira vez que os efeitos de própolis vermelha na proteção renal foram demonstrados. No entanto, sugerem estudos adicionais para esclarecer completamente mecanismos pelos quais a própolis vermelha exerce seus efeitos benéficos.

Freires, Alencar e Rosalen (2016) tentaram explicar sobre os fármacos nutraceuticais da própolis vermelha brasileira. Em virtude de sua composição química ser muito distinta, a própolis vermelha brasileira apresentou propriedades biológicas e pode ter potencial impacto contra algumas doenças humanas. Portanto, a pesquisa química e biológica demonstrou que

alguns dos compostos da própolis vermelha brasileira têm alto potencial para se tornarem drogas alopáticas ou mesmo fitoterápicas. Além disso, sugere que o extrato da própolis vermelha brasileira possa ser usado como um poderoso e eficaz alimento funcional. No mercado internacional, este tipo de própolis tem chamado a atenção (SILVA et al., 2008) e já demonstrou possuir atividade antibacteriana (ALENCAR et al., 2007; BUENO-SILVA et al., 2013).

### 3.7 Atividade antimicrobiana da própolis vermelha

Quando avaliada a atividade antibacteriana da própolis vermelha, constata-se que o extrato obtido das regiões brasileiras possui melhor ação biológica em comparação aos resultados obtidos com extratos norte-americanos (BISPO JÚNIOR et al. 2012). De acordo com Dausch et al. (2007), as amostras de própolis vermelha brasileira da região Nordeste demonstraram atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), em concentrações próximas a 2,5 µg/ml.

Alencar et al. (2007) evidenciaram que o extrato etanólico e a fração clorofórmica da própolis vermelha brasileira mostraram uma potente atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus mutans* (UA 159). Foram encontradas atividades antimicrobianas em *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans*, bem como ação citotóxica (CABRAL, 2008; SIQUEIRA et al., 2014).

Trabalhos realizados com amostras de própolis vermelha proveniente do litoral norte do estado de Sergipe apresentaram ação antibacteriana (SIQUEIRA, 2009), antifúngica (BITTENCOURT, 2008) antioxidante (CABRAL et al., 2009) e cicatrizante (ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2009).

Cabral et al. (2009) realizaram um estudo no qual fracionaram, avaliaram a composição fenólica e as atividades antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. Os resultados mostraram que a própolis vermelha brasileira possui alta atividade antioxidante e antibacteriana e que o fracionamento produziu subfrações biologicamente mais ativas que as frações.

Righi et al. (2011) determinaram as atividades antioxidantes e antimicrobianas do extrato da própolis vermelha de Maceió – Alagoas. O método utilizado no referido trabalho

foi a macrodiluição em caldo, seguido pelo crescimento microbiano na placa, que permitiu a avaliação da atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivos (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*) e Gram-negativos (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*) e contra os fungos *Candida albicans*. Os resultados mostraram que o extrato inibiu o crescimento de todos os micro-organismos testados. A concentração inibitória mínima (CIM) (256 µg/mL-1) e a concentração mínima microbicida (MMC) (512 µg/mL-1) foram observados contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Esse extrato mostrou a principal MMC (1024 µg/mL-1) contra *Klebsiella pneumoniae*.

O estudo de Bispo Júnior et al. (2012) avaliou a atividade antimicrobiana do extrato etanoico e frações da própolis vermelha obtidas no estado de Alagoas frente a bactérias dos gêneros *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Proteus sp.*, *Salmonella sp.*, *Escherichia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Klebsiella sp.* De acordo com os resultados, o extrato etanoico da própolis vermelha apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas gram-positivas (100%), gram-negativas (62,5%) e fúngicas (100%). Foram observados excelentes resultados, principalmente para a fração acetanólica na qual a concentração inibitória mínima (CIM) se compara aos valores encontrados para as bactérias gram-positivas. Portanto, as frações de própolis vermelha exibiram excelentemente a atividade antimicrobiana, principalmente frente a microrganismos gram-positivos e *Candida albicans*. Também foi observado que a fração acetanólica destacou-se como um promissor produto biotecnológico.

Siqueira et al. (2014) avaliaram a ação antimicrobiana do extrato de própolis vermelha, coletada na região nordeste do Estado de Sergipe contra cepas de *Enterococcus faecalis*. As amostras de própolis vermelha foram coletadas em Brejo Grande - SE, Brasil, e identificadas segundo suas características sensoriais, a granulometria e requisitos físico-químicos, o teor de flavonoides no extrato seco foi determinado. Soluções de própolis vermelha (EEP) foram preparadas nas concentrações de 1%; 2,5%; 5% e 7,5%. A cepa bacteriana de referência utilizada foi *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212. A atividade antibacteriana foi verificada por meio de testes *in vitro* (teste de difusão em disco e determinação da concentração bactericida mínima – CBM) e *ex vivo* (utilizando dentes humanos extraídos).

No teste *ex vivo*, os dentes contaminados foram divididos em três grupos com dez dentes cada. O grupo 1 foi tratado com própolis a 7,5% (concentração determinada no teste CBM); o grupo 2 foi tratado como controle positivo, com solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, e o grupo 3 foi utilizado como controle negativo, sendo tratado apenas com solução

salina NaCl 0,9%. O extrato de própolis promoveu halo de inibição quando comparado ao da solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, variando entre 12 e 16 mm. Não houve crescimento bacteriano após irrigação do conduto radicular com a solução de EEP a 7,5%. Os pesquisadores concluíram que a própolis coletada apresentou médio teor de flavonoides (1,8%) e características físico-químicas coerentes com as exigidas pelo Ministério da Agricultura. Na concentração de 7,5% de própolis vermelha, foi observado um maior potencial antibacteriano quando comparado aos demais grupos.

Em estudo realizado por Bezerra et al. (2015), sobre leveduras vaginais e a ação antifúngica do extrato da própolis vermelha coletadas em apiário de João Pessoa - Paraíba, os autores revelaram que houve ação antifúngica do extrato de própolis, com inibição em 81,25% das amostras analisadas. Porém, infere-se que embora a concentração de própolis mais efetiva tenha sido a 25%, nas demais concentrações, também se observou ação antifúngica, sobretudo, considerando que foram cepas diferentes em pacientes diferentes, com respostas diversificadas, devido às particularidades. A tendência de positividade da ação antifúngica do extrato de própolis vermelha não foi crescente ao se aumentar ou diminuir a concentração do extrato da própolis.

Bezerra et al. (2015) identificaram atividade antifúngica do extrato de própolis vermelha paraibana frente a leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade bucal em pacientes atendidos na Estratégia de Saúde da Família. Observaram que o seu processo inibitório contra *Candida* pode ter sido influenciado pela concentração de álcool presente no extrato, como não foi a prova de que a menor concentração do extrato de própolis tinha maior registro antifúngico, em comparação para a maior concentração. Para testar esta hipótese, sugere-se que a investigação seja realizada com extratos de própolis e, ao mesmo tempo, com o álcool em ambas as concentrações diferentes e condições ambientais. Portanto, esse estudo oferece subsídios para outros profissionais avaliarem este fato, realizando trabalhos com extratos preparados com diferentes substâncias e concentrações, a fim de testar a ação antimicrobiana destes.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

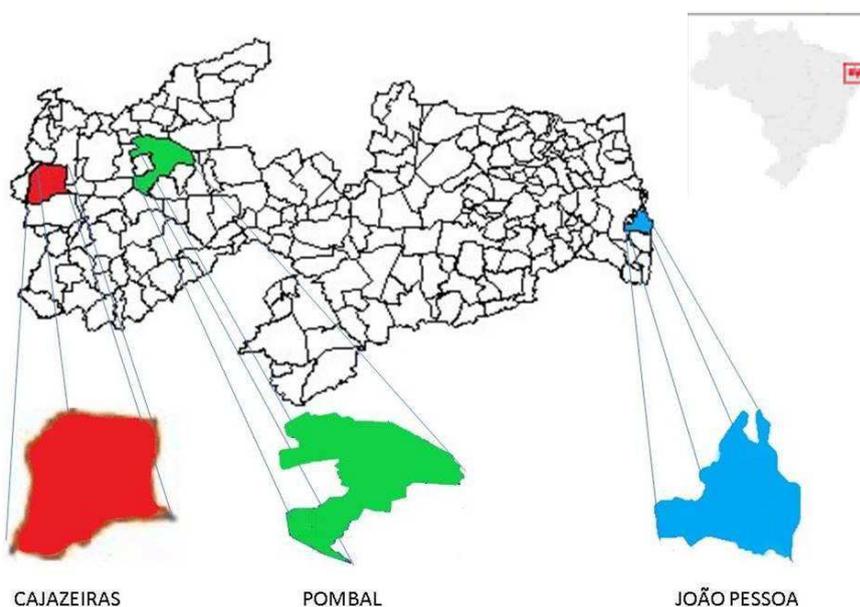
#### 3.1 Tipo de Pesquisa

Tratou-se de uma pesquisa do tipo exploratória, procedimento técnico experimental com abordagem quantitativa. O método experimental consiste, especialmente, em submeter os objetos de estudo à influência de certas variáveis, em condições controladas e conhecidas pelo investigador, para observar os resultados que a variável produz no objeto. Não seria exagero considerar que parte significativa dos conhecimentos obtidos nos últimos três séculos deve-se ao emprego do método experimental, que pode ser considerado como o método por excelência das ciências naturais (PRODANOV, 2013).

#### 3.2 Local da Pesquisa

Esta pesquisa foi realizada em parceria com o Campus da UFCG de Pombal-PB e o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Formação de Professores (CFP), da UFCG - Campus Cajazeiras-PB (figura 5), além do Laboratório de Microbiologia da Universidade Regional do Cariri – CE, por se tratar de laboratórios que dispõem de toda tecnologia para o desenvolvimento do estudo, no que concerne a um aparato de equipamentos, materiais e profissionais capacitados para atuarem na pesquisa.

**Figura 5** - Mapa ilustrativo da região onde foi realizada a pesquisa



**Fonte:** Adaptado doo Google (2018)

### 3.3 Obtenção do Material botânico

A amostra da própolis vermelha (figura 6) foi obtida no apiário EDIMEL localizado na cidade de João Pessoa – PB, região Nordeste do Brasil.

**Figura 6:** Amostra da própolis vermelha bruta



Fonte: da própria pesquisa

### 3.4 Preparação do Extrato

O material apícola, 50g de própolis vermelha, foi pesada, macerada, para posteriormente, em um recipiente de vidro transparente, ser embebida em 250mL de etanol absoluto e 250mL de água destilada, por um período de 72h. Em seguida, a solução foi filtrada para reter a parte sólida e encaminhada para Universidade Regional do Cariri (URCA). A secagem do extrato foi realizada através da técnica de *spray drying* (secagem por atomização) com o uso do equipamento *Mini-spray dryer* MSDi 1.0 (figura 8) (Labmaq do Brasil), utilizando bico aspersor de 1,2 mm, nas seguintes condições operacionais: a) controle de fluxo: 500 mL/h; b) temperatura de entrada:  $120\pm 2^\circ\text{C}$ ; c) temperatura de saída:  $74\pm 2^\circ\text{C}$ ; d) vazão de ar de atomização: 45 L/min; e) vazão do soprador:  $1,4\text{ m}^3/\text{min}$ . O processo de secagem (figura 7), por atomização, consiste na mudança de um produto que se encontra no estado fluido para o estado sólido em forma de pó (figura 9. A e 9. B), através de sua passagem em um meio aquecido, numa operação contínua (MASTERS, 1991).

**Figura 7:** Fluxograma da preparação do extrato da própolis vermelha



Fonte: Da própria pesquisa

**Figura 8:** *Mini-spray dryer* MSDi 1.0



**Figura 9:**  
(A e B)  
Extrato da  
própolis  
vermelha  
em pó

### **3.5 Atividade contra bactérias**

#### **3.5.1 Microrganismos**

Os experimentos foram realizados com as linhagens padrões bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e multirresistentes como todas obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Formação de Professores (CFP/UFCG). Os estoques de culturas foram mantidos em Agar Heart Infusion (HIA) e armazenados em refrigerador.

#### **3.5.2 Antibióticos**

Para avaliar a atividade moduladora da ação antibiótica do extrato da própolis vermelha, foram utilizadas essas classes de antibióticos (amicacina, benzilpenicilina, ciprofloxacino, oxacilina).

### 3.5.3 Concentração Inibitória Mínima – CIM

A concentração inibitória mínima (CIM  $\mu\text{g/mL}$ ) foi determinada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI 100%) pelo método de microdiluição, usando uma suspensão de 10<sup>5</sup> (Unidade Formadora de Colônia) UFC/mL (para escala de Mcfarland 0,5) e uma concentração do extrato da própolis vermelha 1024 $\mu\text{g/mL}$  diluída sequencialmente pelo título 1:2 (JAVADPOUR et al., 1996).

Seguindo os ensaios, foi preparado o meio de distribuição em tubos estéreis utilizando 100  $\mu\text{L}$  do inóculo em 900  $\mu\text{L}$  do meio de cultura líquido BHI. Posteriormente, o conteúdo do tubo foi transferido para placa de microdiluição de 96 poços, em sentido horizontal, utilizando 100  $\mu\text{L}$  em cada poço, perfazendo 09 poços. Em sentido vertical foi utilizado 100  $\mu\text{L}$  em cada poço, perfazendo 08 poços. Após essa etapa, foi realizada a microdiluição das substâncias (extrato da própolis e antibióticos) sendo 100  $\mu\text{L}$  nesse meio até penúltima cavidade (1:1). Na última cavidade não foi adicionada por ser o controle de crescimento.

As concentrações variaram de 1024 $\mu\text{g/mL}$  a 16  $\mu\text{g/mL}$ . As placas foram incubadas em estufa de crescimento à 37°, por 24h. Após o período de incubação foi realizada a leitura das placas por visualização de mudança de cor do meio caracterizado pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). A leitura desse experimento teve como característica a mudança de cor do meio de azul para vermelho, indicando a presença de crescimento bacteriano e a permanência em azul, a ausência de crescimento (figura 10). Para a avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8 para PA-ATCC 27853. Os testes foram realizados em triplicata (tabela 2 e 3).

**Figura 10-** Fluxograma da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Fonte: Da própria pesquisa

**Tabela 2:** Determinação da concentração inibitória mínima (µg/mL) do extrato de própolis vermelha

Extrato da própolis			Amicacina			Ciprofloxacina		
1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
512	512	512	512	512	512	512	512	512
256	256	256	256	256	256	256	256	256
128	128	128	128	128	128	128	128	128
64	64	64	64	64	64	64	64	64
32	32	32	32	32	32	32	32	32
16	16	16	16	16	16	16	16	16
CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN

Fonte: Da própria pesquisa

**Tabela 3:** Determinação da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato de própolis vermelha

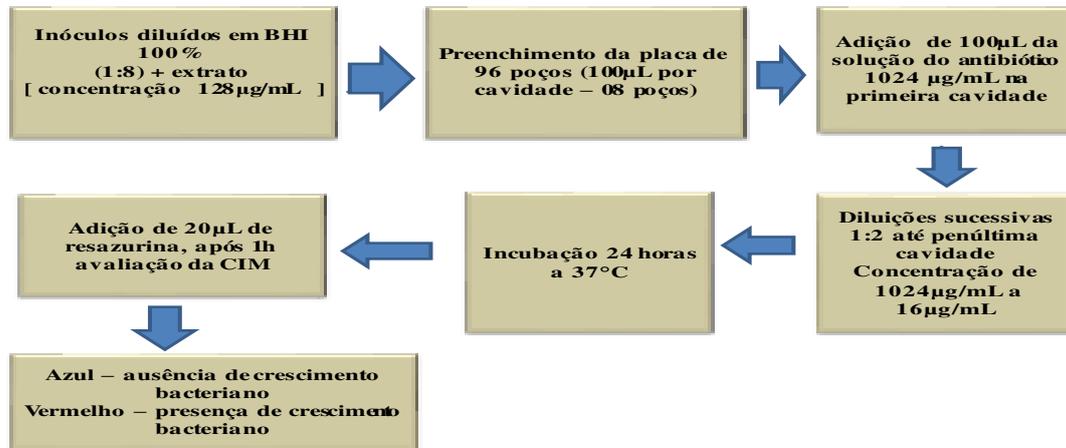
Benzilpenicilina				Oxacilina							
1024	1024	1024		1024	1024	1024					
512	512	512		512	512	512					
256	256	256		256	256	256					
128	128	128		128	128	128					
64	64	64		64	64	64					
32	32	32		32	32	32					
16	16	16		16	16	16					
CN	CN	CN		CN	CN	CN					

**Fonte:** Da própria pesquisa

### 3.5.4 Modulação

Para avaliar a atividade moduladora da ação de antibióticos, os testes foram realizados em triplicata. Cada poço da placa de microdiluição continha o extrato da própolis vermelha em concentração subinibitória de forma constante e os antibióticos em concentrações decrescentes, partindo de  $1024\mu\text{g/mL}$ , diluídas sequencialmente 1:2 até  $16\mu\text{g/mL}$ , sendo misturadas em caldo BHI 100%, esse preparado com água destilada estéril. Em cada poço, foi adicionado  $100\mu\text{L}$  de caldo BHI 100% como  $128\mu\text{g/mL}$  do extrato da própolis vermelha e inóculo bacteriano ( $10^5$  UFC/mL). No primeiro poço, foi adicionado  $100\mu\text{L}$  de uma solução do antibiótico com  $1024\mu\text{g/mL}$  procedendo a diluição sequencial com título 1:2 nos poços seguintes. As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24h e o crescimento bacteriano foi avaliado pelo uso da resazurina (figura 11).

**Figura 11:** Fluxograma da atividade moduladora



Fonte: Da própria pesquisa

### 3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos em valores de média e  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi realizada usando o ANOVA e duas vias com teste de múltipla comparação (Bonferroni), com auxílio do *GraphPad Prism* versão 7.0. Quando o valor de F foi significativo, comparações post hoc foram feitas pelo teste de Newman-Keuls. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Rendimento do extrato da própolis vermelha**

A massa inicial do extrato da própolis foi 50g. Ao final, na forma de pó, obteve-se 4,926g, gerando um rendimento de 9,852%. Para diluir o extrato, utilizou-se 0,5µg, 1ml de Twin à 80% e 4ml de água destilada em recipiente estéril.

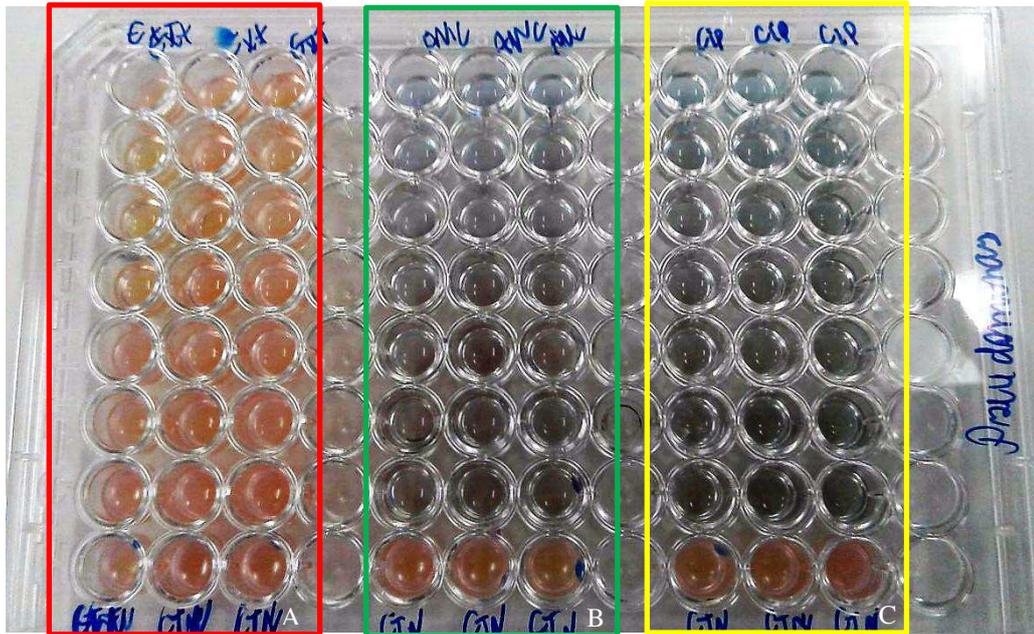
### **4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da própolis vermelha paraibana e dos antibióticos**

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima do extrato da própolis vermelha paraibana revelaram um valor da CIM  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$  (Figura 12.A) para a bactéria testada, indicando não haver atividade antimicrobiana clinicamente relevante, de forma isolada. Nota-se que nos poços identificados em ordem decrescente: 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CN (Controle Negativo), a coloração foi considerada como rosa, pela visão a olho nu, constatando a presença de crescimento bacteriano em todos os poços, ou seja, em todas as concentrações.

Em relação aos antibióticos testados, observou-se atividade antimicrobiana da amicacina (figura 12.B) e do ciprofloxacino nas (figura 12.C) em todas as concentrações : 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CN (Controle Negativo); na qual a coloração visualizada foi azul em todos os poços, indicando inibição de crescimento bacteriano ou atividade antimicrobiana, dos referidos antibióticos.

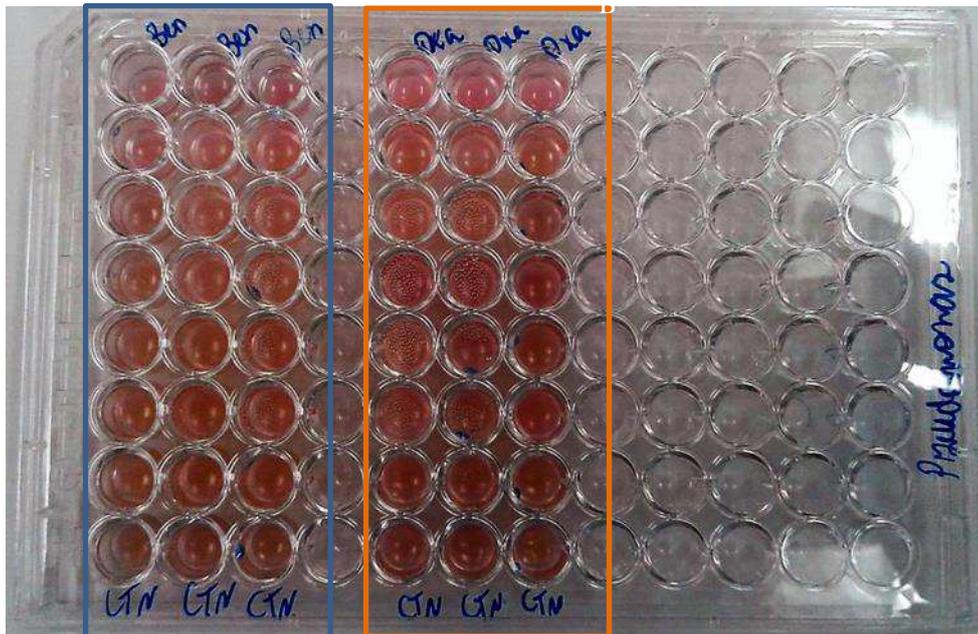
Nos antibióticos benzilpenicilina (figura 13.A) e oxacilina (figura 13.B), observou-se mudança da cor do meio de azul para vermelho, indicando presença de crescimento bacteriano e a não atividade antimicrobiana das substâncias testadas em todos os poços, em todas as concentrações 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CN (Controle Negativo).

**Figura 12:** Placa avaliada na CIM



Fonte: Da própria pesquisa

**Figura 13:** Placa avaliada na CIM



Fonte: Da própria pesquisa

Pesquisas realizadas anteriormente, revelaram que a própolis vermelha brasileira possui uma grande quantidade de compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, e estes compostos fenólicos descobertos nas própolis vermelhas, estão associados à atividade antibacteriana (CABRAL et al., 2009; ALENCAR; FREIRES; ROSALEM, 2016).

Em estudo realizado por Righi et al. (2011), o extrato de própolis vermelha brasileira apresentou atividade antimicrobiana, contra bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*), a pesquisa mostrou inibição do crescimento de todos os micro-organismos testados. A concentração inibitória mínima (CIM) (256µg/mL) e a concentração mínima microbicida (MMC) (512µg/mL) foi observada contra *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato mostrou a principal MMC (1024µg/mL) contra *Klebsiella pneumoniae*.

Bispo-Junior et al. (2012) e Lopez et al. (2011), quando analisaram a CIM de própolis vermelhas dos estados de Alagoas, Sergipe e Paraíba, demonstraram que as amostras da própolis vermelha mostraram valores de CIM de 512µg /mL contra ambas as linhagens de *P. aeruginosa* utilizadas no estudo (PA03 e PA24).

Regueira Neto et al. (2017) investigaram o efeito do período seco e chuvoso sobre a atividade antibacteriana, a composição química e ação antibacteriana da própolis vermelha pernambucana isolada e em associação com medicamentos padrão Os extratos foram testados isoladamente e em associação com antibióticos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores de CIM, contra *E. coli* variaram de 128µg/mL à 512µg/mL (EC 06 e EC ATCC) exibiu valores de CIM de 512µg/mL contra ambas as cepas de *P. aeruginosa* (PA03 e PA24). Os testes revelaram que a própolis vermelha coletada no estado de Pernambuco é eficaz contra estirpes de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Os estudos descritos acima afirmam que o extrato hidroetanólico da própolis vermelha brasileira possui atividade antibacteriana contra vários microrganismos. Os mesmos diferem dos resultados desta pesquisa, na qual não foi demonstrada atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha paraibana sobre *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853).

Nesta pesquisa, não foi possível relatar os motivos pelos quais o EPV não inibiu o crescimento da bactéria, porém, Nunes et al. (2009) afirmam que a composição química da própolis apresenta variação em virtude da sazonalidade; as abelhas visitam arbustos e subarbustos durante período chuvoso e espécies lenhosas, durante a estiagem. Fatores associados à técnica de extração, origens geográficas diferentes, época de extração da resina,

presença de contaminantes podem levar a variações nos resultados microbiológicos entre diferentes grupos de pesquisa.

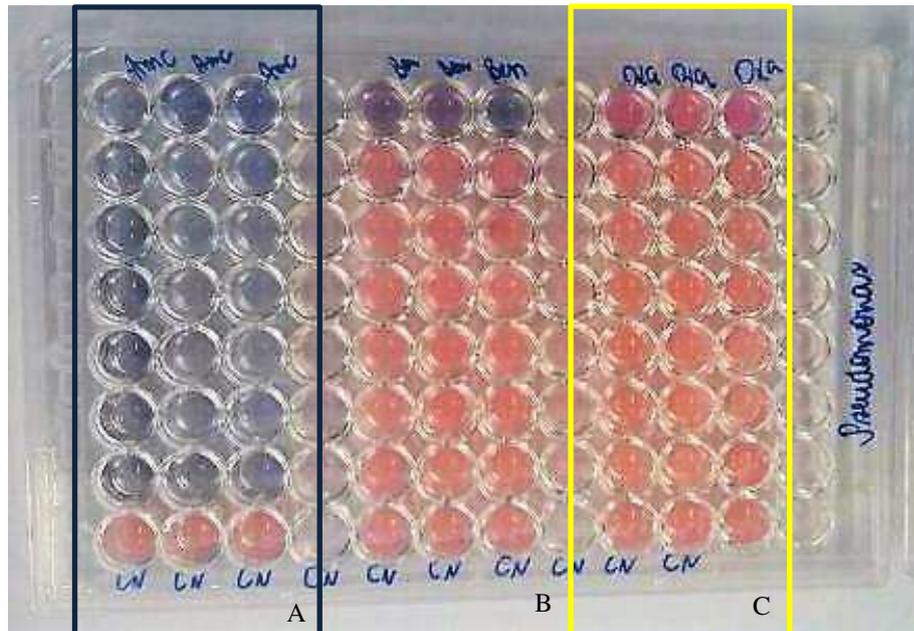
No que se refere aos resultados da determinação do CIM dos antibióticos, amicacina, ciprofloxacino, benzilpenicilina e oxacilina, observou-se nos dois primeiros antibióticos testados a inibição do crescimento bacteriano por meio da coloração azul apresentada nos poços, em todas as concentrações. Nos demais antibióticos, benzilpenicilina e oxacilina, ocorreu crescimento bacteriano evidenciado pela alteração da coloração do meio de azul para vermelho.

Nos últimos anos, vários estudos pretendem elucidar substâncias ou extratos eficientes que possam superar ou diminuir a resistência microbiana aos antibióticos. Com isso, pode ser gerada uma série de informações importantes e vários produtos naturais mostraram-se eficazes nesse sentido (JOUNG et al., 2012; LACERDA NETO, 2013). A pesquisa por moduladores de resistência de origem natural representa uma nova e importante dimensão na problemática da resistência microbiana (SIBANDA e OKOH, 2010).

### **4.3 Modulação**

Os resultados do teste da modulação demonstraram que a amicacina (14.A) e ciprofloxacino(15), associados à concentração subinibitória do EPV (CIM/8), não apresentaram sinergismo ou antagonismo frente à *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O resultado foi idêntico à ação dos antibióticos testados isoladamente. Em todas as concentrações dos antibióticos, (1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CN (Controle Negativo), houve inibição do crescimento bacteriano demonstrado pela coloração azul em todas as concentrações, reforçando a ação já demonstrada dos antibióticos sobre esta cepa bacteriana.

Os antibióticos benzilpenicilina (14.B) e oxacilina (14.C), associados também a concentração subinibitória do EPV, não apresentaram sinergismo, antagonismo e nem efeito bactericida, demonstrado anteriormente quando os antibióticos foram testados isoladamente. A resistência da bactéria a estes medicamentos, nas seguintes concentrações de 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16, foi observada através da mudança do meio de azul para vermelho.

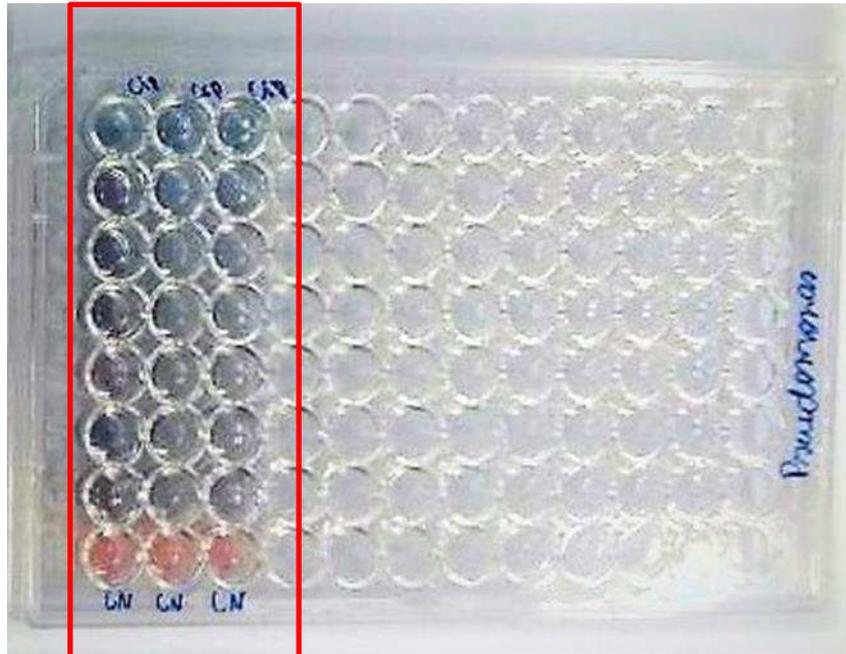
**Figura 14:** Placa avaliada no processo de modulação

Fonte: Da própria pesquisa

**Tabela 4:** Esquema de distribuição dos antibióticos em modulação para *P. aeruginosa* (ATCC 27853)

Extrato + Amicacina				Extrato + Benzilpenicilina				Extrato + Oxacilina			
1024	1024	1024		1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	
512	512	512		512	512	512	512	512	512	512	
256	256	256		256	256	256	256	256	256	256	
128	128	128		128	128	128	128	128	128	128	
64	64	64		64	64	64	64	64	64	64	
32	32	32		32	32	32	32	32	32	32	
16	16	16		16	16	16	16	16	16	16	
CN	CN	CN		CN	CN	CN		CN	CN	CN	

Fonte: Da própria pesquisa

**Figura 15:** Placa avaliada no processo de modulação

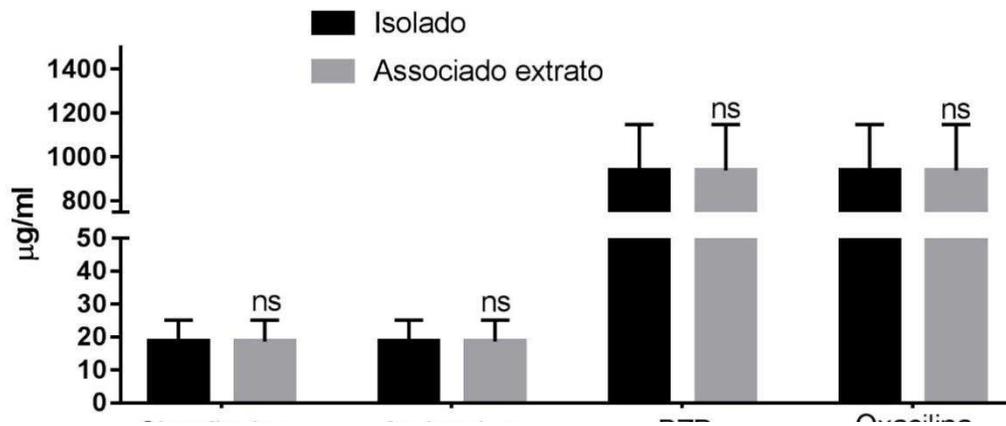
**Fonte:** Da própria pesquisa

**Tabela 5:** Esquema de distribuição dos antibióticos em modulação para *P. aeruginosa* (ATCC 27853)

Extrato + Ciprofloxacino										
1024	1024	1024								
512	512	512								
256	256	256								
128	128	128								
64	64	64								
32	32	32								
16	16	16								
CN	CN	CN								

**Fonte:** Da própria pesquisa

**Figura 16:** Gráfico criado a partir da análise com o programa ANOVA



Fonte: ANOVA

## 5 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcolico da própolis vermelha paraibana não possui atividade antibacteriana sobre a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

A concentração inibitória do extrato da própolis vermelha não possui atividade clinicamente relevante para *P. aeruginosa* (ATCC27853), pois o valor do CIM  $\geq$  1024  $\mu\text{g/mL}$ .

Os antibióticos amicacina e ciproxacino demonstraram atividade antibacteriana contra esta cepa, enquanto que a benzilpenicilina e oxacilina demonstraram não possuir este tipo de ação.

O extrato da própolis vermelha paraibana, associado aos antibióticos, não mostrou sinergismo e nem antagonismo.

## 7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. et al. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology (Print)**. v.27, p. 1105-1110, 2009.

ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **J. of Ethnopharmacol.**, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-83, 2007.

ARAÚJO, F. M. E. Caracterização química e atividade leishmanicida dos estratos hidroetanólicos de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Sergipe, 2014.

ARESI, C. Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural: Estudo bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta paul. enferm.** [online]. v. 22, n.3, p. 318-22, 2010.

BATISTA, L. L. V. et al. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 39, n. 6, p. 515-20, 2012.

BEZERRA, A. M. F. et al. Action of Propolis on Microorganisms of the Oral Cavity: an Integrative Review. **International Archives of Medicine**. v. 08, n.118, p. 1-13, 2015.

BEZERRA, K. K. S. et al. Vaginal Yeasts and the Antifungal Action of Red Propolis Extract. **International Archives of Medicine**, v. 8, n. 154, 2015.

BISPO JUNIOR, W. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas. **Ciências Biológicas e da Saúde**. Londrina, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

BITTENCOURT, F. O. Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha. **Dissertação de mestrado**. Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, 2008.

BONTEN, M. J. M. et al. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care Units – implication for infection control. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 160, p. 1212-9, 1999.

BUCIOR, I. et al. *Pseudomonas aeruginosa* pig and flagella mediata distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. **PloS Pathogens**. v. 4, p.1-18, 2012.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitiol isolated from brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, n. 19, p. 4546-4550, 2013.

CABRAL, Y. S. R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da Própolis vermelha brasileira. **Dissertação de mestrado**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba/SP, 2008

CABRAL, Y. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**. v. 32, n. 6, p.1523-7, 2009.

CHEN, C. N. et al. Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. **Evid Based Complement Alternat Med**. v.1, n.2, p.175-85, 2004.

COELHO, M. S. et al. A própolis e sua utilização em animais de produção. **Archs Zootecnia**. v.59, p.95-112, 2010.

COOGAN, K. A.; WOLFGANG, M.C. Global Regulatory Pathways and Cross-talk Control *Pseudomonas aeruginosa* Environmental Lifestyle and virulence Phenotype. **Curr Issues Mol Biol**. v. 14, p. 47-70, 2012.

COSTA P. S. C, OLIVEIRA J. S. **Manual Prático de Criação de abelhas**. Viçosa Ed. Aprenda Fácil. p. 309-342, 2005.

COSTETON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, p 1318-22, 1999.

COUTO R. H. N.; COUTO L. A. **Apicultura: Manejo e Produtos**. Jaboticabal: Ed. FUNEP/FCAV Unesp; cap. 5, p. 106 -115, 2002.

CRİŞAN, I. et al. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Rom J Virol**, v.46, n. 3-4, p.115-33, 1995.

DAUGSCH, A. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas. **Tese de doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. 2007.

DONLAN, R. W.; COSTENTON J. W.; Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.** v.15, p.167-93, 2002.

DZOYEM, J. P.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. **Complementary and Alternative Medicine.** v. 14, n.1, p. 147, 2014.

FERRAREZE, M. V. G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem. **Acta Paul de enferm.** v. 20, p. 7-11. 2007.

FIANCO, A. L. B. Estudo sobre a atividade antifúngica e antioxidante de extratos de própolis obtidos com CO<sub>2</sub> supercrítico. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifca Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

FREIRES, I. A.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, [s.l.]. **Elsevier BV.** v. 110, p.267-279, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>.

FREITAS, A. D. Estudo de atributos de virulência e resistência a antimicrobianos em amostras de *P. aeruginosa*. **Tese de Doutorado**. Universidade do estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências médicas. 2013.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.]. **Elsevier BV.** v. 52, p.137-142, fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>.

FURUKAWA, S.; KUCHMA, S. L.; O'TOOLE, G. A. Keeping their options open: acute versus persistent infections. **J Bacteriol.** p. 1211-7, 2006.

GLOBO, <<http://gazetaweb.globo.com/portal/noticia.php?c=1176>> Acesso em: 20 fev. 2018

GOODERHAM, W. J., HANCOCK, R. E.W. regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory in *P. aeruginosa*. **Rev microbial.** v. 33, p. 279-94, 2009.

GOOGLE, <<https://www.google.com.br/imghp?hl=pt-BR&tab=wi>> Acesso em: 20 fev. 2018

GOMES, M. F. F. et al. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesq. Vet. Bras.** v. 36, n.4, p.279-282, 2016.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J R Soc Med.** v. 83, n. 3, p.159-60, 1990.

JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

JIANG, R. et al. Network motif identification in stochastic networks. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.103, n.25, p.9404-9, 2006.

JONES, R. N. Microbial Etiologies of Hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilador-associated bacterial pneumonia. **Clin Infect Dis.** v, 51, n.1, p.1-7, 2010.

JOUNG, D. K. et al. Antibacterial and synergistic effects of *Kochia scoparia* extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research.** v. 6, n. 10, p. 2449-2454, 2012.

JYOT, J. et al. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: in vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. **J Infect Dis.** v. 203, n.10, p.1369-77, 2011.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido - 6ª Ed.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ; 2008.

LACERDA NETO, L. J. Avaliação da atividade antibacteriana e gastroprotetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* WITTM. **Dissertação de Mestrado.** URCA. Ce. 2010.

LAU, G.W.; HASSETT, D. J.; BRITIGAN, B. E. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. **Trends in Microbiology.** v.13, p. 389-97, 2005.

LEMOS JÚNIOR, H. P., LEMOS, A. L. A. Própolis. **Rev. Diagn. Tratamento.** v. 18, n. 1. p. 24-6, 2013.

LOPES, B.G.C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**. v. 119, n. 3, p.677-687, 2 ago. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12874>.

LOPEZ, A.M.Q, et al. “**Normas de produção da Própolis Vermelha de Alagoas**”, Mimeo, Documento enviado ao INPI para solicitação da Indicação Geográfica, modalidade Denominação de Origem - Mista, Maceió, 2011.

LUSTOSA S. R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. bras. farmacogn.** v.18, n.3, 2008.

MAGRO-FILHO, O.; CARVALHO, A. C. Tropical effect of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. Cytological and clinical evaluation. **J Nihon Univ. Sch Dent, Tokio**, v.36, n.2, p.102-111, 1994.

MARCUCCI M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**; p. 529-35, 1996.

MARCUCCI, M.C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. v.74, p.105-112, 2001.

MARTINEZ, S. L. et al. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. **Clin Infect Dis**. v.47, p.1526- 33, 2008.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. Longman Scientific & Technical, New York. 1991.

MIYARES, C. et al. Ensayo terapéutico con un preparado a base de propoleo propolisina en la giardiasis del humano. **Acta Gastroenterol Latinoam**. v.18, n.3, p.95-201, 1988.

MORAES, C. S. Isolamento e identificação de formononetina da própolis de João Pessoa-PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas. **Tese de Doutorado**. Universidade estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas-SP, 2009.

MURRAY M. C.; WORTHINGTON, H.V.; BLINKHORN, A. S. A. Study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. **J Clin Periodontol**. v. 24, n.11, p.796-8, 1997.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia medica. 5. ed. Rio de Janeiro (RJ): **ELSEVIER**. p. 948, 2006,

NASCIMENTO, E. A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n.3, p.379-386, 2008.

NUNES, L. C. C. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.* v. 19, n. 2B, 2009.

OLIVEIRA A. C, et al. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 101, n. 5, p. 493-7, 2006.

OLIVEIRA, H. M.; et al. Políticas de controle e prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde no Brasil: análise conceitual. **Rev Esc Enferm USP**. v.50, n.3, p. 505-511. 2016. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v50n3/pt\\_0080-6234-reeusp-50-03-0505](http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v50n3/pt_0080-6234-reeusp-50-03-0505).

OLIVEIRA, K. A. M. et al. Atividade antimicrobiana e quantificação de flavonoides e fenóis totais em diferentes extratos de própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 211-22, 2012. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/10827/12168>>

OTA, C. et al. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, v. 44, n. 9-10, p. 375-378, 2011.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PARK, Y. K.; et al. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.9, p. 2502-2506, 2002.

PARKINS, M. D. et al. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* blood stream infection. **Infection**. v. 38, p.25-32, 2010.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím Nova**. v. 25, n.2, p.321-6, 2002.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. American Chemical Society v. 59, n. 12, p.6484-6491, 2011. <http://dx.doi.org/10.1021/jf201280z>

PICCINELLI, A. L. et al. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9010-9016, 2005.

PINHATI, Fernanda R.; et al. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. *Química Nova*, Rio de Janeiro, 01 ago. 2014. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=249](http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=249)>. Acesso em: 20 fev. 2018.

PLOTKOWSKI, M. C. M. et al. Role of heparin sulphate proteoglycans for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarized airway epithelial cells. **J Med Microbiol**. v. 50, p. 183-90, 2001.

PORTILHO, D. R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**. Araguaína, v. 6, n. 2, Pub. 1, abr. 2013. Disponível em: <http://www.itpac.br/arquivos/Revista/62/1.pdf>

PRODANOV, C. C.; FREITAS, E. C. “**Metodologia do trabalho científico: Métodos e Técnicas da Pesquisa e do Trabalho Acadêmico**”. 2ª. Edição, Novo Hamburgo: Feevale, p. 37, 2013.

REGUEIRA NETO, M. S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Elsevier**. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.052>

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of The Science of Food And Agriculture**. v.91, n. 13, p.2363-2370, 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4468>.

SADIKOT, R. T. et al., Pathogen-host interactions in pseudomonas aeruginosa-infected endothelial cell. **Braz J Microbiolol**. v. 34, p. 25-6, 2005.

SANTANA, E. P. et al. Parasitismo vaginal y cervicitis aguda: Tratamiento local con propóleo. Informa preliminar [Vaginal parasitic conditions and acute cervicitis: Local treatment using propolis. Preliminary report. **Rev Cuba Enferm**. v.11, n.1, p.51-6, 1995.

SIBANDA, T.; OKOH, A. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, n. 25, 2010.

SILVA, B. B. Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP. 2008

SILVEIRA, M. C. Caracterização do ambiente genético dos genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos, blaSPM-1 e rmtD, em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes ao clone ST277, epidêmico no Brasil. **Dissertação Mestrado**. Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. 2014.

SIQUEIRA, A. B. et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 48, p.90–96, 2009.

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

SOARES, A. L. F. et al. Identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis. **Rev. Gestão em foco**. Ed. 9º, 2017.

SOUZA, F. B. R.; FISCHER, G.; VARGAS, G. D. Efeito antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário. **Science and animal health.** v.1, n.1, p.24-37, 2013.

STEFANELLO, R. et al. Efeitos do extrato de própolis e do óleo de melaleuca na formação do biofilme e na desmineralização dental: estudo in situ. **RFO. Passo Fundo**, v. 22, n. 1, p. 31-37, 2017.

SZMEJA Z. Wartosc lecznicza flawonoidów w zakazeniach wywolanych przez Rhinoviruses [Therapeutic value of flavonoids in Rhinovirus infections]. **Otolaryngol Pol.** v. 43, n. 3, p.180-4, 1989.

TELES, Flávio et al. Brazilian Red Propolis Attenuates Hypertension and Renal Damage in 5/6 Renal Ablation Model. **Public Library of Science (PLoS)**. v. 10, n. 1, p.1-15, 21, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116535>.

TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 8. ed., São Paulo: Atheneu, 2015.

UFGRS. <[http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open\\_sp.php?img=4399](http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4399)> Acesso em: 20 fev. 2018.

VYNOGRAD, N. et al. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**. v. 7, n.1, p.1-6, 2000.

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defense in lung diseases. **Respirology**. v. 15, p.1037-56, 2010.